

Technik der
Impfstoffe und Heilsera

Technik der Impfstoffe und Heilsera

Von

Dr. A. Marxer

Leiter des bakteriologischen Institutes der chemischen Fabrik auf Aktien
vormals E. Schering in Berlin



Braunschweig

Druck und Verlag von Friedr. Vieweg & Sohn

1915

Alle Rechte vorbehalten.

ISBN 978-3-663-03127-7 ISBN 978-3-663-04316-4 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-663-04316-4

Copyright, 1915, by Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, Germany.
Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1915

Vorwort

Vorliegendes Werkchen ist aus meinem Beitrag, dem Kapitel „Heilsera“, in Muspratts Chemie, Ergänzungsband III, entstanden. Ich war darin bemüht, das Wesentliche der bekannten Technik der Impfstoffe und Heilsera in übersichtlicher Weise zu behandeln. Um ein rasches Nachschlagen zu ermöglichen, habe ich die alphabetische Reihenfolge des Stoffes gewählt. In der Einleitung ist in Kürze soweit auf das Theoretische der Immunitätslehre eingegangen, als zum Verständnis des Hauptteiles nötig ist. Der Anhang enthält in gedrängter Form eine Zusammenfassung über die Überempfindlichkeit.

Charlottenburg, im August 1915.

Der Verfasser.

Inhaltsübersicht.

	Seite
Geschichtliches und Theoretisches	1
A. Impfstoffe.	
I. Allgemeiner Teil	17
Allgemeine Technik der Antigen-(Impfstoff)-Bereitung	17
Chemisch-physikalische Eigenschaften der Antigene	30
II. Spezieller Teil	35
Bradsot	35
Cholera	36
Coliinfektionen	39
Diphtherie	154
Ferkeltyphus	84
Geflügelcholera	39
Gonokokkeninfektionen	40
Heufieber	41
Kälberruhr	41
Kälberpneumonie (septische)	64
Lungenseuche	41
Lyssa	41
Maul- und Klauenseuche	44
Milzbrand	44
Ozaena	46
Pest	46
Pirosomeninfektionen	52
Pneumokokkeninfektionen	53
Pocken	53
Rauschbrand	56
Rinderpest	59
Rotz	60
Ruhr	61
Schweinerotlauf	61
Schweineseuche	63
Spirosomeninfektionen	64

	Seite
Staphylokokkeninfektionen	65
Streptokokkeninfektionen	66
Tetanus	67
Trichophytie	67
Trypanosomeninfektionen	68
Tuberkulose	69
Typhus	81
Ulcus molle	84

B. Heilsera.

I. Allgemeiner Teil	85
Allgemeine Technik der Antikörpergewinnung	85
Chemisch-physikalische Eigenschaften der Antikörper	99
Allgemeine Vorschriften für die Herstellung und Prüfung antikörperhaltiger Seren	106
II. Spezieller Teil	110
I. Antitoxische Sera	110
Botulismus	110
a) Toxin	110
b) Antitoxin	114
Cholera	117
a) Toxin (Endotoxin)	117
b) Antitoxin (Antiendotoxin)	124
Diphtherie	128
a) Toxin	128
b) Antitoxin	151
Ferkeltyphus	247
Heufieber	174
a) Toxin	174
b) Antitoxin	177
Kälberruhr	247
Rauschbrand	178
a) Toxin	178
b) Antitoxin	183
Ruhr	185
a) Das Dysenterietoxin (Endotoxin)	185
b) Das Dysenterieantitoxin (Antiendotoxin)	191
Schlangengiftserum	198
a) Toxin	198
b) Antitoxin	205

	Seite
Tetanus	208
a) Toxin	208
b) Antitoxin	224
Typhus	240
a) Toxin (Endotoxin)	240
b) Antitoxin (Antiendotoxin)	244
2. Antiinfektiöse Sera	248
Gefügelcholera	248
Kälberpneumonie (septische)	295
Maul- und Klauenseuche	249
Meningokokkenserum	251
Milzbrand	260
Pest	264
Pneumokokkenserum	269
Rabizides Serum	277
Rinderpest	278
Schafpocken	282
Schweinepest	284
Schweinerotlauf	287
Schweineseuche	293
Streptokokkenserum	295
Anhang	308
Serumkrankheit (Anaphylaxie, Allergie, Überempfindlichkeit)	308

Geschichtliches und Theoretisches.

Gegen zahlreiche Infektionskrankheiten besteht bei ganzen Klassen und Arten ein natürlicher Schutz. So ist der Mensch gegen Rinderpest völlig refraktär, die Tiere bekommen keine Masern, das Rind ist unempfindlich gegen Rotz. Die natürliche Immunität in den angeführten Fällen kann durch keine Maßnahmen aufgehoben werden, sie ist eine absolute, während gegenüber den meisten Krankheiten nur ein relativer natürlicher Schutz besteht. Man bezeichnet ihn daher besser als erhöhte Widerstandsfähigkeit. Der Frosch, der sonst gegen Milzbrand resistent ist, läßt sich erfolgreich infizieren, wenn er längere Zeit bei einer Temperatur von 35° gehalten wird. Andere den natürlichen Schutz aufhebende Maßregeln sind Temperaturherabsetzung, Überanstrengung und Hungernlassen. Durch künstliche Herabsetzung der Temperatur werden Hühner und Tauben für Milzbrand empfänglich. Dasselbe erreichten Canalis und Morpurgo durch längeres Hungernlassen. Eine nicht selten vorkommende scheinbare natürliche Immunität bei einzelnen Rassen und selbst bei einzelnen Individuen kann meist durch große Infektionsdosen gebrochen werden. Dieselben Maßnahmen, die im Experiment die Schutzkraft des Körpers herabzusetzen vermögen, können dies erfahrungsgemäß auch bei natürlicher Infektion. Andererseits wird im allgemeinen die Resistenz gegen die verschiedensten Krankheiten erhöht, wenn einem Organismus die angeführten Schädlichkeiten ferngehalten werden. Wir wissen, daß bei den schrecklichsten Epidemien immer einzelne Individuen verschont bleiben. Dieses Verschontbleiben ist jedoch meist nur scheinbar und beruht, wie zahlreiche Untersuchungen der neueren Zeit bewiesen haben, selten auf einer natürlichen Immunität. Vielmehr sind die Betreffenden

sehr häufig wohl von einer Infektion befallen worden, jedoch nur unmerklich erkrankt, aber dadurch geschützt worden. Es ist übrigens eine alte Erfahrungstatsache, daß das Überstehen einer Krankheit gegen dieselbe Infektion einen Schutz hinterläßt. Diese erworbene Immunität künstlich herbeizuführen, war das Bemühen, als 1721 die Variolation vom Orient nach Europa gebracht wurde. Da von den Pocken (Variola) beinahe jeder Mensch befallen wurde und bekanntermaßen fast niemand zweimal erkrankte, hatte man von Leichtkranken den Pustelinhalt auf Fäden getrocknet, um damit andere in die Haut zu impfen. Das Wichtigste bei dieser Impfung war das Einbringen des Infektionsmaterials in die Haut statt in die Schleimhaut, der natürlichen Eintrittspforte des Pockenvirus. Bei dieser Impfmethode kam es zu vielen Impfverlusten und zu einer steten Ausbreitung der Seuchenherde. Einen bedeutenden Fortschritt brachte die Einführung der Pockenimpfung des Menschen mit Vakzine durch Jenner. Die Kuhpocke (Vakzine) ist abgeschwächte menschliche Pocke. Jenner hat also rein empirisch die Immunisierung mit lebendem, abgeschwächtem Virus inauguriert. Hierdurch angeregt, versuchte man später gegen viele Krankheiten in ähnlicher Weise einen Schutz zu erzielen. Man verwandte dazu Blut, Nasenschleim und anderes infektiöses Material aus lokalen Krankheitsherden. Prinzipiell fußen unsere Immunisierungsmethoden auf derselben Grundlage, die Jenner veranlaßte, die Kuhpocken als Impfstoff gegen Variola zu verwenden. Unsere ganzen Impfstoffe haben den Zweck, den Körper, sei es nun mit lebenden, abgeschwächten oder abgetöteten Erregern oder deren Stoffwechselprodukten und Extrakten, in einen möglichst leichten spezifischen Krankheitszustand zu versetzen, wodurch dann ein Schutz gegen die natürliche Infektion bedingt werden soll. Dieser erworbene Schutz ist ein aktiver im Gegensatz zu einer passiven Immunität, die einem Körper mitgeteilt wird durch Übertragung der fertigen Antikörper. Bei der passiven Immunität leistet der Organismus keine Arbeit, er erhält die spezifischen Antikörper, die ein anderer Organismus durch den aktiven Immunisierungsvorgang gebildet hat.

Die aktive Immunität ist in der Regel von langer Dauer und absolut spezifisch. Wir kennen jedoch zahlreiche Mittel, welche imstande sind, die Resistenz gegen die verschiedenartigsten Krank-

heiten in nicht spezifischer Weise zu erhöhen. Am meisten tun dies solche Präparate, welche eine Hyperleukozytose hervorrufen. Mit der Rückkehr der Zahl der weißen Blutkörperchen zur Norm hört auch der nicht spezifische Schutz auf. Auch durch Erhöhung der Alkaleszenz des Blutes entsteht eine gewisse Resistenz. Ferner wird die Widerstandsfähigkeit durch solche Mittel gesteigert, welche eine stärkere Blutversorgung und Blutzufuhr einzelner Körperteile chemisch oder mechanisch hervorrufen.

Es verdient noch erwähnt zu werden, daß auch eine absichtliche Giftgewöhnung schon von altersher bekannt ist. Plinius überlieferte uns, daß Mithridates sich durch allmähliche Gewöhnung gegen gewisse Gifte schützte und auch das Blut von Enten, die mit Giften gefüttert waren, zu seinem Schutze verwandte.

Auch von den Schlangenbeschwörern in Indien ist bekannt, daß sie sich von Schlangen, deren Gifte immer stärker sind, beißen lassen und sich in dieser systematischen Weise selbst gegen die stärksten Gifte einen Schutz verschaffen. Diese Schlangenbeschwörer scheinen ebenfalls die Beobachtung gemacht zu haben, daß sich spezifische Gegengifte in ihrem Körper bilden, die sich infolge der allmählich angewöhnten Giftfestigkeit ihren Körpersäften mitteilen. Diese Kenntnis nutzen die Indier auch therapeutisch aus, indem die Angehörigen der Kaste der Schlangenbeschwörer ihren Speichel bei von Schlangen Gebissenen als Gegengift anwenden.

Zielbewußt auf experimenteller wissenschaftlicher Grundlage eine künstliche Immunität geschaffen zu haben, ist das Verdienst Pasteurs. Durch Kochs Wirken war es erst möglich, zahlreiche Krankheiten durch die Impfung zu bekämpfen. Koch schuf die Methoden, mit denen er sich und die späteren Forscher instand setzte, die Erreger vieler Infektionskrankheiten zu entdecken und rein zu züchten.

Mit dem Beginn der Möglichkeit der exakten wissenschaftlichen Erforschung des erworbenen Schutzes bei zahlreichen Infektionskrankheiten setzen auch in erhöhtem Maße die Untersuchungen ein, in welcher Weise am besten ein aktiver Schutz zu erzielen ist. Die Methoden der aktiven Immunisierung sind bei den einzelnen Infektionskrankheiten sehr verschieden. Sie decken sich mit den Herstellungsmethoden der verschiedenen Impfstoffe. Die Art der Verabreichung der Impfstoffe ist ebenfalls mannigfach.

Die Injektionsmodi zum Höherentreiben der aktiven Immunität zwecks Gewinnung von Heil- und Schutzseren sind im Abschnitte „Allgemeine Technik der Antikörpergewinnung“ aufgeführt.

Die älteste Art der Impfstoffverabreichung zur Erlangung eines Schutzes gegen eine Infektion ist die Injektion an einer Stelle, die nicht Eintrittspforte des Infektionsstoffes ist (die kutane gegen Pocken, die subkutane gegen Typhus, Pest), oder an einem Ort, von welchem aus nur eine langsame Resorption stattfinden kann (Impfung am Schwanze gegen Lungenseuche der Rinder). Außer der Einverleibung von subletalen Dosen ist dies der einzige mögliche Weg der aktiven Immunisierung mit vollvirulenten Keimen, der aber auch bei Impfung mit abgeschwächtem Material betreten werden kann. Die üblichsten Injektionsweisen der Impfstoffe sind die subkutane, intramuskuläre, intravenöse und intraperitoneale. Weiter kann ein aktiver Schutz erzeugt werden von der Kutis und vom Magendarmkanal, sowie von der Konjunktiva, Nase und Trachea aus. Ferner kann der Impfstoff in Kollodium- und Schilfsäckchen eingeschlossen werden, von wo aus er langsam in den Organismus diffundiert. Die Art der Einverleibung ist nicht gleichgültig. Beispielsweise wird durch Immunisierung per os bei Tuberkulose nur eine Immunität gegen Verfütterung, nicht gegen intravenöse Infektion erzeugt (Vallée). Man schafft durch eine Injektionsart also in gewissen Fällen nur eine lokale Immunität, so auch bei intraperitonealer Impfung häufig nur einen Schutz der Bauchhöhle, nicht dagegen gegen eine Infektion von der Subkutis aus. In manchen Fällen bezweckt man auch eine lokale Immunität. v. Wassermann läßt seinen Schüttelextrakt aus Staphylokokken rein kutan anwenden, um einen lokalen Schutz der Haut gegen eine Staphylokokkeninfektion zu erzeugen.

Die Impfstoffe dürfen nicht wahllos injiziert werden, es muß ein gewisser Impfturnus eingehalten werden. In der Regel nimmt man die Impfungen in Zwischenräumen von 7 bis 10 Tagen vor, man muß aber manchmal Wochen und Monate verstreichen lassen bis zur Wiederholung der Injektion. Fornet und Müller empfehlen eine Schnellimmunisierungsmethode durch Impfung an drei aufeinander folgenden Tagen zur Bildung von Präzipitinen. Man kann mit dieser Injektionsart nach meinen Erfahrungen auch gegen Krankheiten immunisieren.

Mit der experimentellen Erforschung der erworbenen Immunität suchte man auch deren Ursachen zu erklären. Pasteur stellte die Erschöpfungstheorie auf. Chauveau vertrat die Retentionshypothese. Es folgten die Exzitationstheorie der Körperzellen von Grawitz und die ähnliche Zellselektionstheorie von Buchner und Wolffberg. Von Metschnikoff stammt die Phagozytenlehre. Nach der neueren Forschung beruht die aktive Immunität auf der Bildung von Antikörpern.

v. Behring war es vorbehalten, das Auftreten von Antikörpern gegen gewisse toxische Infektionen im Blute der mit den Giften der Infektionserreger immunisierten Tiere nachzuweisen. Er fand gemeinsam mit Kitasato die antitoxischen Substanzen gegen Tetanus und mit Wernicke die Antitoxine gegen Diphtherie im Serum von mit den Giften dieser Krankheitserreger behandelten Tieren. Ehrlich konnte dann zeigen, daß sich auch gegen andere Gifte wie bakterielle Toxine, z. B. gegen Ricin, Abrin und Robin, spezifische Antikörper erzeugen lassen. Von Ehrlich stammen auch die grundlegenden Gesetze der quantitativen Steigerung der Giftimmunität und die theoretischen Grundlagen für die Immunitätsvorgänge überhaupt, die er durch den Ausbau seiner berühmten Seitenkettentheorie lieferte. Phisalix und Bertrand, sowie Calmette konnten unabhängig voneinander im Blute von gegen Schlangengift künstlich immunisierten Tieren spezifische Antitoxine gegen diese tierischen Gifte nachweisen. Antikörper, die sich analog den Antitoxinen verhalten, sind in den Antifermenten von verschiedenen Autoren gefunden worden.

Von Antikörpern, die noch als Heilfaktoren in Frage kommen, kennen wir die Bakteriolyse (Pfeiffer), die Antiendotoxine (Mac Fadyen, Besredka, Kraus u. a.), die Opsonine (Wright), die Bakteriotropine (Neufeld), die Bordetschen Antikörper und die Antiaggressine (Bail). Damit ist die Zahl der in Seris wirksamen Antikörper wohl nicht erschöpft, da es eine Reihe von Seren gibt, von denen nicht bekannt ist, worauf ihre therapeutische Wirksamkeit beruht.

Zur Erzeugung von Antikörpern bedarf es des lebenden menschlichen oder tierischen Körpers, der in allmählicher Steigerung mit gewissen Stoffen, die wir Antigene nennen, behandelt werden muß. Nicht alle Substanzen, welche eine bestimmte Wir-

kung auf den lebenden Organismus ausüben, können als Antigene wirken. Wir können eigentlich einen antigenen Stoff nur daran erkennen, daß er zur Bildung von Antikörpern fähig ist. Die chemische Struktur der Antigene ist ebenso wenig bekannt wie die der Antikörper. Wir wissen nur, daß chemisch definierbare Körper niemals Antikörper erzeugen können. Ein Hauptmerkmal der Antigene und Antikörper besteht also darin, daß sie chemisch unbekannt sind. Eine andere Haupteigenschaft der Antigene und Antikörper ist ihre Spezifität. Zu jedem Antigen gehört ein Antikörper und zu jedem Antikörper ein ganz bestimmtes Antigen. Ein Antikörper bindet immer nur das Antigen, mit dem es gewonnen wurde und zu dem es also paßt. Die ersten Antikörper, die man kennen lernte, waren die Antitoxine, welche die toxische Wirkung gewisser Substanzen aufzuheben vermochten. Bei Antigenen, welche eine so augenfällige Wirkung ausüben, wie sie die giftige Eigenschaft der Toxine bedingt, ist der Nachweis von Antikörpern bequem im Tierversuch zu erbringen. Andere Gifte, welche schädigende Eigenschaften für bestimmte Zellen haben, welche diese Schädigung leicht erkennen lassen, wie die roten Blutkörperchen, lassen sich auch im Reagenzglas untersuchen (Hämolyse).

Außer der Fähigkeit, Antitoxine zu produzieren, sollten die Toxine noch zwei Forderungen entsprechen. Ihre Giftwirkung sollte erst nach einer gewissen Zeit, dem Inkubationsstadium, in Erscheinung treten, und sie sollten eine hohe Labilität besitzen. Diese beiden Eigenschaften können jedoch nicht mehr als fundamental bezeichnet werden, seitdem wir Gifte kennen, die ohne Inkubation wirken, wie z. B. die Vibrionengifte, gewisse hämolytische Gifte usw. und solche, welche von außerordentlicher Stabilität sind (Schlangengiftlecithide).

Zwei wichtige Eigenschaften eines Toxins, die giftige Komponente und die antikörperbindende lassen sich quantitativ messen. Die Giftwirkung wird in der Weise festgestellt, daß man in abgestuften Mengen jene Dosis Toxin bestimmt, welche gerade noch den gesuchten Effekt hervorruft (Tod des Versuchstieres, Hämolyse usw.). In derselben Weise werden die Mischungen Toxin-Antitoxin gemessen. Für die Mengenverhältnisse der Bindungsmöglichkeit zwischen Toxin-Antitoxin stellte Ehrlich das Gesetz der konstanten Multipla auf. Nach Ehrlich ist das Verhältnis einer bestimmten Toxindosis zu der Menge Antitoxin, die sie gerade

neutralisiert, stets ein absolut konstantes. Toxin und Antitoxin binden sich nach festen quantitativen Verhältnissen: 10 Vol. Toxin binden 10 Vol. Antitoxin usw.

Nach der von den meisten Autoren anerkannten Anschauung Ehrlichs binden sich Antigene und Antikörper direkt miteinander zu einem inerten Reaktionsprodukt. Diese Auffassung Ehrlichs von der rein chemischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist häufig Angriffen seitens anderer Forscher ausgesetzt gewesen.

Von Bordet stammt die Adsorptionstheorie. Nach ihm beruht die Bindung zwischen Antigen und Antikörper auf Molekularadhäsion, also auf mechanischer Adsorption. In dieser Weise läßt sich aber die Spezifität und die Erscheinung des Reaktionsgleichgewichtes nicht erklären. Ein Stoff, der von Kohle adsorbiert wird, kann ebenso von Cellulose adsorbiert werden (Michaelis). Weiter verläuft die Adsorption bei nicht einheitlich gebauten Körpern, wie den Antikörpern, nach anderen Gesetzen wie bei chemisch einheitlich zusammengesetzten, so daß Michaelis die Auffassung der Toxin-Antitoxinbindung als Adsorptionerscheinung nur als Adsorption mit chemischer Zustandsänderung, „anormale Adsorption“, gelten läßt.

Arrhenius und Madsen versuchten die Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin nach dem Guldberg-Waageschen Massenwirkungsgesetz zu erklären. Durch Anwendung dieses Gesetzes auf die Bindung von Tetanolyisin und Antilyisin, sowie von Diphtherietoxin und Antitoxin bekamen die genannten Autoren auf rechnerischem Wege dieselben Resultate, die bei der gegenseitigen Absättigung im Reagenzglas gefunden wurden. Das Massenwirkungsgesetz gilt jedoch nur für vollkommen reversible Reaktionen. Die Bindung zwischen Toxin und Antitoxin darf aber nicht ohne weiteres als reversibel betrachtet werden (Nernst, Biltz, Zangger u. a.). Michaelis schließt nach diesen Kontroversen eine Abhandlung über die physikalische Chemie der Toxin-Antitoxinbindung mit folgenden Worten: Als Ursache für die spezifische Affinität von Toxin und Antitoxin werden wir also rein chemische Kräfte ansprechen müssen und wir werden sie vorläufig nur durch das von Emil Fischer zunächst für Fermente geschaffene Bild vom „Schlüssel“ und „Schloß“ verstehen, und die Entstehung des „Schlüssels“ im lebenden Organismus als

Reaktionsprodukt auf das „Schloß“ nur durch die Ehrlichsche „Seitenkettentheorie“ begreifen.

Daß es sich bei der Wirkung der Antitoxine nicht um eine Zerstörung der Toxine handeln kann, wie Arrhenius annimmt, ist durch Versuche Morgenroths dargetan. Morgenroth konnte aus der neutralen Antitoxin-Toxinmischung von Schlangengiftserum und Schlangengift beide Komponenten restituieren. Später gelang dies auch aus zahlreichen anderen Toxin-Antitoxinmischungen.

Von besonderem Wert für die Messung der Toxine ist die Entdeckung Ehrlichs, daß sich die Toxine aus zwei Gruppen zusammensetzen, der Funktionsgruppe als der Trägerin der Giftigkeit und der haptophoren Gruppe, welcher die Fähigkeit der Antitoxinbindung zukommt. Ehrlich hatte gefunden, daß diese beiden Gruppen durchaus nicht parallel verlaufen. Vielmehr ist die haptophore Gruppe weit stabiler als die toxophore Gruppe. Durch die Labilität der Funktionsgruppe entstehen Reste der ursprünglichen Substanzen, die nur noch antikörperbindende Fähigkeit besitzen. Ehrlich nennt diese Körper bei den Toxinen Toxoide, bei den Komplementen Komplementoide usw. Es ergibt sich daraus für die Prüfung eines Toxins die wichtige Folgerung, daß man durch die Giftigkeitsbestimmung nur die in der Toxinlösung enthaltenen unabgeschwächten Toxinmoleküle ermitteln kann. Soll jedoch die Summe der Toxine und Toxoide genau ermittelt werden, so muß das Antitoxinbindungsvermögen quantitativ gemessen werden. Die Erkenntnis dieser Tatsachen hat Ehrlich dazu geführt, eine rationelle Grundlage für die Serumprüfung zu schaffen. Ohne diese Kenntnis könnte man den genauen Wert eines Serums nicht bemessen, denn je nach dem Gehalt einer Gifflösung, die zur Prüfung der Heilsera benutzt wird, an Toxoiden, würde man zu höheren oder niedrigeren Antitoxinwerten gelangen. Zur Prüfung eines antitoxischen Serums dürfen also nur die haptophoren Gruppen als Maßstab dienen. Die Neutralisation dieser Gruppe läßt sich in letzter Linie jedoch nur an dem Ausbleiben der von der Funktionsgruppe ausgeübten Giftwirkung erkennen, weshalb diese als Indikator dienen muß. Als Maßstab für die Feststellung der haptophoren Gruppen einer verwendeten Giftmenge dient die Immunitätseinheit. Unter Immunitätseinheit versteht man diejenige Menge Antitoxin, welche

bei den ersten Diphtheriestudien Ehrlichs imstande war, 100 für Meerschweinchen tödliche Dosen seiner damals benutzten Diphtheriegiftlösung völlig zu neutralisieren. Unter Zuhilfenahme dieser einmal gewählten Standardmenge gelingt es, alle anderen Seren zu messen. Man braucht nur den neutralisierenden Effekt des Standardserums und des zu prüfenden Serums gegenüber einer beliebigen Giftlösung zu vergleichen. Zu dieser Prüfungsmethode benötigt man natürlich ein zuverlässiges Standardserum. Dank der Konservierungsmethode von Ehrlich ist diese Forderung mit Sicherheit zu erfüllen. Es ist somit Ehrlichs Verdienst, daß wir genaue Methoden zur Wertbestimmung der Heilsera besitzen.

Ehrlichs geniale Seitenkettentheorie ist für die Erklärung der Wirkung der Antigene und der Bildung der Antikörper im Organismus von großem Wert. Nach Ehrlichs Auffassung sind es nur die Antigene, welche imstande sind, Antikörper zu bilden, weil sie feste chemische Verbindungen mit den Körperzellen eingehen, während chemisch definierte Körper keine solche Verbindung eingehen und daher auch nicht zur Bildung von Antikörpern führen können. Ehrlich faßt die Antikörper als normale Bestandteile des Organismus auf, die ursprünglich in der Zelle selbst als Rezeptoren (Seitenketten) sitzen. Diese Rezeptoren haben die Fähigkeit, körperfremde Bestandteile an sich zu ketten und für den Aufbau der Zelle nutzbar zu machen, d. h. sie zu assimilieren. Grundbedingung für die Entstehung von Antikörpern ist deshalb eine Substanz, die an irgend eine Zelle richtig chemisch gebunden werden kann, also assimilationsfähig ist. Ehrlich nimmt nun an, daß durch Besetzung der Rezeptoren durch ein Antigen ein Defekt für den Organismus entsteht, der zur Neubildung zahlreicher neuer Rezeptoren führt, da der Organismus nach dem Weigertschen Gesetz jede Ausfallserscheinung überkompensiert. Pfeiffer glaubt, daß das Weigertsche Gesetz die enorm große Antikörperproduktion, wie sie von zahlreichen Autoren auf die Injektion minimaler Antigenmengen gefunden worden ist, nicht befriedigend erklärt. Nach ihm stellt die Antikörperbildung eine spezifische Reaktion auf einen spezifischen Reiz dar.

Auch von Wassermann vertritt die Auffassung, daß die Bindung des Bakterienrezeptors an die haptophore Zellgruppe und damit deren Ausschaltung für die Zelle noch nicht genügt zur

Auslösung der Antikörperbildung. Es ist dazu noch ein besonderer Reiz erforderlich („Bindungsreiz“). So konnte z. B. Bruck nachweisen, daß mit ganz atoxisch gemachten Toxoiden eine Antitoxinbildung nicht gelang, während Toxoide, sobald sie auch nur eine Spur der toxophoren Gruppen enthielten, Antitoxin produzierten.

Der Überschuß an Rezeptoren wird seitens der Zellen in das Blut abgestoßen. Die abgestoßenen Rezeptoren stellen dann die Antikörper dar und können das Antigen, mit dem sie erzeugt wurden, abfangen, so daß es seine schädigende Eigenschaft nicht ausüben kann. Während diese freien im Blut kreisenden Rezeptoren früher „Giftzuleiter“ waren, solange sie in der Zelle lagen, fungieren sie nunmehr als „Giftableiter“. Dieselbe Substanz im lebenden Körper, welche, in der Zelle gelegen, Voraussetzung und Bedingung einer Vergiftung ist, wird Ursache der Heilung, wenn sie sich in der Blutflüssigkeit befindet (v. Behring). Die Auffassung Ehrlichs bringt somit die einfachste Erklärung für die beiden Haupteigenschaften der Antikörper, ihre Spezifizität und ihre Schutzwirkung.

Die Tatsache, daß Antigene mit Körperzellen feste chemische Verbindungen eingehen, läßt sich sowohl in vivo wie in vitro experimentell erhärten. In zahlreichen Versuchen ist bewiesen worden, daß gewisse Gifte nach Injektion in die Blutbahn sehr bald daraus geschwinden und in den Organen abgelagert werden. Die Organe, in denen das Gift nur einfach abgelagert ist, wirken, einem empfänglichen Tier injiziert, nun giftig, während solche Organe, in welchen das Gift richtig chemisch gebunden ist, ungiftig sind. Der Beweis der Bindungsmöglichkeit gewisser Organe mit gewissen Giften läßt sich auch in vitro ausführen, beispielsweise für das Gehirn und Tetanustoxin. Injiziert man eine Mischung einer Gehirnemulsion mit Tetanustoxin einer Maus, so erkrankt diese nicht, wenn die Mengenverhältnisse richtig gewählt sind (Wassermann und Takaki u. a.). Daß diese Bindung spezifisch ist, erhellt daraus, daß gekochtes Gehirn diese Fähigkeit nicht hat, und daß keineswegs andere Gifte von diesem Organ gebunden werden wie solche, die intra vitam eine Beziehung zum Zentralnervensystem zeigen. Umgekehrt müßten solche Organe, die eine chemische Affinität zu einem Stoff, z. B. einem Gift haben, auch Bildungsstätten für das betreffende Antitoxin sein. Dagegen dürfte in anderen Organen, die das betreffende Gift nicht binden, kein

Antitoxin gebildet werden. Dies ist in der Tat der Fall, wie aus Versuchen Metschnikoffs mit Tetanusgift an Kaltblütern hervorgeht. Die Schildkröte bindet keine Spur von Tetanusgift, eine Antitoxinproduktion gegen Tetanustoxin findet daher nicht statt. Der Alligator, welcher, ohne krank zu werden, das Tetanusgift in gewissen Organen bindet, bildet im Gegensatz zur Schildkröte reichlich Tetanusantitoxin. An diesem Beispiel läßt sich schön zeigen, daß die haptophore Gruppe, welche die Bindung mit dem Rezeptor ermöglicht, unbedingt zur Bildung von Antikörpern notwendig ist. Die krankmachende Wirkung des Antigenmoleküls ist jedoch, wie dies der Alligator beweist, nicht absolut nötig. Es sind also nicht nur die giftempfindlichen Zellen fähig, Antitoxin zu produzieren, sondern alle Zellen, die das Gift verankern können, auch wenn die Funktionsgruppe des Toxins nicht auf diese wirkt.

Entgegen der Anschauung Ehrlichs vertritt Metschnikoff den Standpunkt, daß die Sekretion der Antikörper nur allein oder doch hauptsächlich den großen einkernigen Leukozyten, den Makrophagen, zukomme. Daß die Leukozyten, als die verbreitetsten Zellen im Organismus, bei der Antikörperproduktion eine hervorragende Rolle spielen, ist mit Sicherheit anzunehmen. Pfeiffer und Marx und Wassermann konnten zeigen, daß die an Leukozyten reichsten Organe, vor allem Knochenmark und Milz, an der Produktion der Ambozeptoren in hervorragendem Maße beteiligt sind. Knochenmark und Milz sind allerdings auch als Bildungsstätten von Antitoxinen (Römer) bekannt, doch können auch andere Organe, also auch andere Zellen Antitoxine produzieren. Jedenfalls ist es durchaus nicht erwiesen, daß nur die Makrophagen die Antikörper sezernieren. Man kann mit Ehrlich wohl annehmen, daß das Wichtigste für die Antikörperbildung der Gehalt des lebenden Organismus an Zellen ist, die geeignete Fangarme für das Antigen besitzen, um es so an die Zelle zu binden und zu assimilieren. Werden diese Gruppen mit der maximalen chemischen Verwandtschaft für ein bestimmtes Antigen im Überschuß gebildet und in das Blut abgestoßen, so stellen sie die für das einverleibte Antigen spezifischen Antikörper vor. Ehrlich und Metschnikoff stimmen darin überein, daß der Immunitätsvorgang als ein Kapitel der allgemeinen Ernährungsphysiologie zu betrachten sei. Dieselben Vor-

gänge wie bei der Antikörperbildung spielen sich während des normalen Zellstoffwechsels fortwährend ab.

Gruber, der ein Gegner der Ehrlichschen Rezeptoretheorie ist, steht gleichfalls auf dem Standpunkt, daß die Antikörperbildung eine Sekretion sei.

Landsteiner und Jagie fassen die Zellsubstanzen als ein im chemischen Gleichgewicht befindliches System auf und glauben, daß die Ursache der Antikörperproduktion durch die Störung dieses Gleichgewichtes, durch den Eintritt eines fremden Stoffes, bedingt sei.

Bail verzichtet auf die Annahme von Zellrezeptoren im Sinne Ehrlichs. Nach diesem Autor bindet das Antigen die normalen Immunkörper. Diese werden wieder abgesprengt und durch neue ersetzt. Auch nach der Vorstellung Bails kann also eine kleine Menge von Antigen die Neubildung einer sehr großen Menge von Antikörpern anregen.

Wegen der spezifischen Wirkung der Antitoxine glaubte Buchner, daß die Antitoxine ungiftige Modifikationsprodukte der Toxine seien. Gegen diese Ansicht spricht vor allem das große Mißverhältnis zwischen der Menge des eingeführten Toxins und den daraufhin gebildeten Antikörpermengen. Knorr konnte zeigen, daß bei Pferden eine Tetanustoxineinheit etwa 100 000 Antitoxineinheiten zu erzeugen vermag. Das gleiche Verhältnis zwischen injiziertem Antigen und den dadurch gebildeten Antikörpermengen ist auch für andere Infektionen bewiesen worden. Nach der Buchnerschen Auffassung könnte aber ein Teil Toxin immer nur ein Teil Antitoxin erzeugen. Eine einfache Umwandlung des Toxins in Antitoxin kann daher nicht vor sich gehen. Weiter ist die Entstehung des Antikörpers durch Umwandlung des Antigens deshalb nicht möglich, weil sonst ein Unterschied zwischen aktiver und passiver Immunität nicht bestehen könnte. Der durch aktive Immunisierung gewonnene Schutzzustand dauert bedeutend länger als die passive Immunität, welche durch Seruminjektion übertragen ist. Dieser Unterschied könnte nicht bestehen, wenn der Antikörper ein einfach umgewandeltes Antigen wäre, denn es wäre schwer begreiflich, warum der Antikörper, der so gebildet wurde, sich im Körper verschieden verhalten sollte, ob er nun von einem fremden oder dem eigenen Organismus stammt. Endlich spricht gegen die Anschauung Buchners noch der Befund von Normal-

antikörpern gegen zahlreiche Antigene bei Individuen, die mit solchen Antigenen nie in Berührung gekommen sind. So enthält das Serum normaler Pferde sehr häufig Diphtherieantitoxin (Cobbett) und das normale Kaninchenserum ein Antitoxin gegenüber dem auf Seeigelspermatozoen wirkenden Giftstoff der Seesterneier (v. Dungern).

Daß es sich bei der Produktion von Antikörpern um eine spezifische Sekretion gewisser Zellen handelt, geht unter anderem auch daraus hervor, daß man durch Verabreichung eines Stoffes, welcher die Sekretion der Körperzellen im allgemeinen steigert, auch den Blutantitoxingehalt eines gegen Diphtherie aktiv immunisierten Pferdes steigern kann.

In neuerer Zeit sind von Bang und Forssman gegen diese Theorie Bedenken geäußert worden, die jedoch von Ehrlich und Sachs entkräftet werden konnten.

Die ersten bekannten Antikörper waren, wie oben bereits gesagt, die Antitoxine. Behring und seine Mitarbeiter haben die giftneutralisierende Eigenschaft des Blutes von Tieren, welche mit Tetanus- und Diphtheriegift behandelt waren, entdeckt. Behring hat auch die im Blut immuner Tiere entstandenen Stoffe Antitoxine genannt. Ein Serum ist also antitoxisch, wenn es imstande ist, mit einem bestimmten löslichen Gift eine spezifische Bindung einzugehen und es so unschädlich zu machen. Wie bereits erwähnt, ist die Darstellung von Antitoxinen und Antikörpern überhaupt ohne den lebenden Organismus unmöglich. Es ist bisher nicht gelungen, synthetisch oder außerhalb des lebenden Organismus Substanzen zu erzeugen, die mit den im Blute von Tieren vorkommenden Antikörpern identisch sind. Antitoxine können wir nur mit einem löslichen Gifte gewinnen. Es liegt nicht an der biologischen Eigentümlichkeit einzelner Bakterien, daß wir mit ihnen ein antitoxisches Serum erzielen können, sondern an dem Umstand, daß wir nur von bestimmten Bakterienarten lösliche Stoffwechselprodukte in genügender Menge erzeugen können. Es liefert z. B. ein Tier, welches mit Diphtheriebazillenleibern immunisiert wird, kein Serum mit giftneutralisierenden Eigenschaften. Ein antitoxisches Diphtherieserum läßt sich nur von einem Tiere gewinnen, dem die löslichen Stoffwechselprodukte des Diphtheriebazillus einverleibt wurden. Daß man von manchem Bakterium kein antitoxisches Serum darstellen kann, hat also nur

darin seinen Grund, daß wir von der betreffenden Bakterienart keine löslichen Gifte besitzen. Wir sind demnach nur in der Lage, gegen richtige lösliche Sekretionsprodukte gewisser pflanzlicher und tierischer Zellen echte Antitoxine zu erzeugen. Die Antitoxine sind nach Ehrlichs Seitenkettentheorie die einfachen Rezeptoren erster Ordnung, welche nur eine auf den Reizstoff eingestellte haptophore Gruppe besitzen. Sie gehen mit dem Toxinmolekül eine neutrale, nicht mehr krankmachende Verbindung ein.

Anders geartete Rezeptoren entstehen im Organismus, wenn derselbe nicht mit einem löslichen Gift, sondern mit einer körperfremden Zelle oder einem integrierenden Bestandteil derselben behandelt wird. Wir erhalten dann Rezeptoren dritter Ordnung¹⁾ mit zwei haptophoren Gruppen, die Ambozeptoren. Die eine haptophore Gruppe dient zur Bindung der körperfremden Zelle, während die andere die Verbindung mit dem im normalen Blute stets zirkulierenden Ferment, dem Komplement²⁾, herbeiführt, welches in geeigneter Weise auf die fremde Zelle einzuwirken vermag. Das Komplement zählt nach Ehrlich zu den proteolytischen Enzymen. „Da unter dem Einfluß des Addimentes Erscheinungen auftreten, die man mit Pfeiffer als der Verdauung analog ansehen muß, so werden wir nicht fehl gehen, wenn wir dem Addiment (Komplement) den Charakter eines Verdauungsfermentes vindizieren.“ Besorgt das Komplement die Auflösung der fremden Zelle, so sprechen wir von einem bakteriziden Serum. Ist die einverleibte Substanz keine Zelle, sondern ein Bestandteil derselben, welcher giftig wirkt, so dient das Komplement, welches vom Antikörper verankert wird, dazu, diesen giftigen Bestandteil (Endotoxin) in der Weise zu entgiften, daß es ihn abbaut. Ein prinzipieller Unterschied zwischen dem einfachen bakteriziden Serum und dem antiendotoxischen Serum besteht also nicht. Wohl aber lassen sich grundlegende Verschiedenheiten zwischen den echten antitoxischen Seris

¹⁾ Rezeptoren zweiter Ordnung (Agglutinine und Präzipitine) haben außer einer haptophoren Gruppe noch eine zymophore, die Funktionsgruppe, mit der sie auf die gebundenen Stoffe (Bakterien, Eiweißstoffe) einwirken.

²⁾ Nach Ehrlich besitzt das Komplement eine haptophore und eine zymotoxische Gruppe, welche die Trägerin des wirksamen Prinzips ist.

und den antiendotoxischen anführen. Nach Pfeiffer und Bessau fehlt den Antiendotoxinen die vollständig entgiftende Wirkung, wie wir sie von den Antitoxinen kennen. Als Zeichen der Erkrankung tritt bei infizierten Tieren, die mit antiendotoxischen Seren behandelt sind, stets Temperatursturz ein. Auch hat das von Ehrlich für die Antitoxine aufgestellte Gesetz der konstanten Proportionen für die Antiendotoxine keine Gültigkeit. Ferner bleibt das Antiendotoxin bei getrennter Einverleibung wirkungslos. Die entgiftende Wirkung der antiendotoxischen Sera beruht nach Pfeiffer und Bessau auf einem Abbau des Giftes durch zwei Bestandteile, von denen einer (Ambozeptor) in dem antiendotoxischen Serum enthalten ist, der andere (Komplement) aus dem Tierkörper stammt. Dieselben Einwände werden von den meisten Autoren für die Verschiedenheit der Antitoxine und Antiendotoxine erhoben. Nach Versuchen von Wassermann und Bruck, Neufeld und Dold kommt bei den echten Toxinen keine Komplementwirkung in Frage. Dagegen findet beim Zusammenbringen von antiendotoxischem Serum und Endotoxin mit Komplement eine Bindung des Komplements statt.

Bordet vertritt für alle Antikörper die unitische Auffassung, indem er annimmt, daß die Verschiedenheit ihrer Wirkungserscheinungen nur durch die Verschiedenheit des Antigens bedingt sei.

Auch Friedberger glaubt auf Grund seiner Untersuchungen, daß keine scharfe Trennung zwischen antitoxischen Seris und den anderen Seren besteht. Die Entgiftung der echten Toxine durch ein Serum ist deshalb am vollständigsten, weil die in Frage kommende Eiweißmenge eine so geringfügige ist, daß sie rasch zu ungiftigen Spaltprodukten abgebaut wird. Bei relativ ungiftigem Eiweiß (Bakterienleiber) ist die tödliche Dosis eine ganz bedeutend höhere, weshalb die Entgiftung durch das Immuns Serum viel schwieriger ist.

v. Wassermann ist der Ansicht, daß auch in physikalisch-chemischer Hinsicht ein Unterschied im Wirkungsmechanismus der echten Antitoxine und der Antiendotoxine besteht. Der Grund hierfür scheint in der Größe des Antigenmoleküls zu liegen. Bei Antigenen, die aus so kleinen Molekülen bestehen wie die echten Toxine, daß sie Bakterienfilter passieren, genügt schon die Änderung ihres physikalischen Zustandes, wie sie durch die Verbindung

von Antigenen und Antikörpern verursacht wird, um sie unwirksam zu machen. Große Moleküle (Endotoxine), welche die Bakterienfilter nicht durchdringen, werden in ihrer Wirkung durch einfache Vereinigung von Antigen und Antikörper nicht beeinträchtigt, hier muß noch ein Abbau durch das Komplement mithelfen.

Wir unterscheiden also in den Heilseren zwei Arten von Heilkörpern. Die erste Gruppe der wirksamen Antikörper wird durch die Antitoxine repräsentiert. Sie sind gegen echte lösliche Gifte wirksam und in den antitoxischen Seris enthalten. Die zweite Art der Antikörper stellen die Ambozeptoren dar. Sie sind komplizierter gebaut und verbinden den Fremdkörper mit dem Komplement. Zu den Ambozeptoren gehören die Antikörper in den anderen (antiendotoxischen und antiinfektiösen) Seris.

Die Frage der Ausscheidung der Antikörper aus dem Organismus ist noch nicht endgültig geklärt. Wir wissen nur so viel, daß eine Ausscheidung durch die Exkretionsorgane nachweisbar ist und daß ein Teil der Antikörper in Organen zurückgehalten wird. Ferner ist bekannt, daß homologes Serum, also von derselben Tierart stammendes Heilserum, in der Regel länger im Organismus nachweisbar ist als heterologes Serum. Ja für das Tetanusantitoxin ist es erwiesen, daß dasselbe, wenn es vom Pferde stammt und einem normalen Pferde injiziert wird, fast so lange im Körper gefunden wird wie das Antitoxin bei einem Pferde, das aktiv immunisiert wurde (Behring). Bei letzterer Immunisierungsart bleibt der Organismus, weil er zur Bildung von Antikörpern eine Arbeitsleistung vollführen muß, viel länger im Besitze der Antikörper als der Organismus, welchem das antikörperhaltige Serum einverleibt wurde, der also passiv immunisiert ist.

A. Impfstoffe.

I. Allgemeiner Teil.

Allgemeine Technik der Antigen-(Impfstoff-)Bereitung.

Die Impfstoffe werden für jede Krankheit gesondert hergestellt. Dazu werden nur Reinkulturen der spezifischen Erreger benutzt, oder, wenn die Kultur eines Erregers unbekannt ist, solche Medien, von denen wir wissen, daß sie das betreffende ätiologische Moment in möglichst größter Reinheit beherbergen. Auf jeden Fall müssen fremde Keime vermieden werden. Die Untersuchung auf Reinheit vor und nach der Herstellung der Impfstoffe geschieht nach den allgemein üblichen bakteriologischen Gesichtspunkten.

Die Impfstoffe müssen tunlichst ungefährlich sein sowohl für den Impfling wie für den Impfenden. Es müssen daher die Impfstoffe nach dieser Richtung im Experiment genauestens vorgeprüft werden, ehe sie zu größeren praktischen Impfungen benutzt werden. Ebenso muß vor ihrer Anwendung die Nützlichkeit und Dauer des eventuellen Schutzes experimentell erprobt werden. Bei den meisten Krankheiten ist dies wohl möglich dank den großartigen Fortschritten der Bakteriologie. Wo eine Prüfung der Immunität direkt, d. h. durch Impfen mit der tödlichen Dosis der speziellen Krankheitserreger nicht ausführbar ist, ist es auch zulässig, den Nutzen eines Impfstoffes in der Weise zu ermitteln, daß man eine Vermehrung der Antikörper feststellt, auf denen erfahrungsgemäß der Schutz gegen die betreffende Krankheit beruht. Beispielsweise sucht man bei mit einem Typhusimpfstoff behandelten Menschen die Höhe des bakteriziden Titers seines Blutes zu ermitteln. Ein Vergleich des bakteriziden Titers des

Blutes des Patienten vor und nach der Behandlung läßt leicht erkennen, ob der angewandte Impfstoff reichliche Mengen bakterizider Antikörper zu bilden imstande ist. Zum Schluß vergleicht man noch die Höhe des gewonnenen bakteriziden Titters mit der, die durch bereits praktisch erprobte Schutzmittel bekanntermaßen erreicht wird, oder mit der, die die natürlich Infizierten nach der Genesung aufweisen.

Ist ein Impfstoff bezüglich seiner Ungefährlichkeit bzw. gänzlichen Unschädlichkeit usw. gut experimentell durchgeprüft, so entsteht die Forderung, denselben konstant in derselben Weise darzustellen, wie er war, als er den Prüfungen unterzogen wurde. Dazu bedient man sich besonderer Meßmethoden:

1. Die Bakterienmasse wird abgewogen.
2. Durch Ausschleudern der Bakterien.
3. Durch die Wrightsche Zählmethode.
4. Durch Bestimmung der Opazität.
5. Durch gleichlanges Wachstum auf demselben Nährboden.

Am gleichmäßigsten werden die Impfstoffe sein, bei welchen die Bakterien abgewogen oder durch Ausschleudern bestimmt werden. Die Bakterien müssen vorher mehrmals gewaschen werden, um sie von den anhaftenden Nährbodenresten zu befreien. Die anderen Bestimmungsmethoden sind ungenauer, lassen sich jedoch zur Kontrolle eines praktisch brauchbaren Impfstoffs aus zahlreichen Bakterien benutzen. Wenn man die Methode eines gleichlangen Wachstums auf denselben Nährböden zur gleichmäßigen Herstellung eines Impfstoffs verwendet, so ist darauf zu achten, daß bei festen Nährböden die Oberfläche, die abgespült werden soll, immer gleich groß ist. Auch bei den flüssigen Nährböden muß die Menge und die Impfdosis stets die gleiche sein.

Bei nicht züchtbaren Erregern, bei denen man gezwungen ist, Material wie Blut, Galle oder Pustelinhalt zu verwenden, nimmt man zweckmäßig diese Medien zu einer Zeit, wo sie erfahrungsgemäß das meiste Virus beherbergen. Außerdem wird man zur Antigenherstellung Mischungen der die Erreger enthaltenden Stoffe machen.

Von großem Einfluß auf die antigene Wirkung eines Impfstoffs kann die Virulenz des verwandten Bakterienstammes sein. Wir wissen durch die Untersuchungen von Pfeiffer und Marx,

daß für die Herstellung von Choleravakzinen durchaus nicht virulente Choleravibrionen nötig sind. Wenn dies auch für eine Reihe anderer Infektionserreger zutreffend ist, so gilt es jedoch leider nicht für alle. Bei manchen Erregern scheint die Bildung der geeigneten Immunkörper in direktem Verhältnis zur Virulenz des Ausgangsmaterials zu stehen. Jedenfalls verhält sich die Sache so, daß im allgemeinen virulente Kulturen mehr Antikörper erzeugen als avirulente. Auch ist verschiedentlich gefunden worden, daß selbst abgetötete Bakterien einer virulenten Kultur besser zur Immunisierung geeignet sind als avirulente, lebende, abgeschwächte Keime (für Pest von Pfeiffer, für Pneumokokken von Neufeld, für Streptokokken eigene Beobachtungen). Bei den Typhusbazillen besteht dieser Zusammenhang zwischen immunisierender Fähigkeit der Bazillen und Virulenz nach Wassermann nicht. Entscheidend ist bei den Typhusbakterien die antikörperbindende Fähigkeit des Stammes. Friedberger und Moreschi fanden jedoch große Unterschiede zwischen der bindenden und Antikörper bildenden Fähigkeit bei Typhusstämmen. Bei Cholera liefern auch nicht alle Stämme, die die Antikörper *in vitro* gut absättigen, brauchbare Impfstoffe (Haendel).

Bei Krankheiten, bei denen die Erreger stark abweichende Fähigkeiten besitzen, ist es praktisch, eine große Anzahl von Stämmen gleichzeitig zur Herstellung des Antigens zu mischen. Jedenfalls wird man dies solange tun, bis man einen Stamm gefunden hat, der besonders zur Immunisierung geeignet ist. Auch wo dies scheinbar aussichtslos ist, wie man bei der Tuberkulose des Menschen annahm, gelingt es doch mitunter, einen solchen Stamm zu züchten. So will Friedmann einen Schildkröten-tuberkelbazillusstamm entdeckt haben, der für Warmblüter völlig unschädlich ist, aber hervorragend antigene Eigenschaften besitzen soll. Koch, Schütz, Neufeld und Miessner und unabhängig von ihnen v. Behring konnten bekanntlich bei Rindern mit lebenden menschlichen Tuberkelbazillen, die im allgemeinen für Rinder nicht infektiös sind, eine Immunität erzielen, was mit abgetöteten oder toten menschlichen Tuberkelbazillen nicht in gleicher Weise möglich ist. Bei den lebenden Keimen kommt es vielleicht gar nicht auf ihre besonders große antigene Eigenschaft an, als vielmehr darauf, daß sie nicht so schnell ausgeschieden werden wie abgetötete. Lebende Keime sind aber nicht das Ideal

eines brauchbaren Impfstoffs wegen der Unmöglichkeit genau zu dosieren, wegen der verschiedenen Entwicklungsfähigkeit der Keime, und weil nicht vorauszusehen ist, was aus den lebenden Keimen im Organismus wird, insbesondere, ob sie nicht virulenter für andere Individuen ausgeschieden werden, und dadurch, wie bei der ersten Pockenimpfung, die aus Indien nach Europa kam, zur Verbreitung der betreffenden Seuche beitragen. Impfstoffe aus lebenden Keimen sollen immer nur ein Notbehelf sein bei Krankheiten, bei denen andere Impfstoffe aus irgend einem Grunde nicht verwertbar sind.

Zahlreiche Wege sind beschritten worden, um praktisch brauchbare Impfstoffe herzustellen. Zur Herstellung von Impfstoffen fanden Verwendung:

1. Lebende virulente Krankheitserreger

(bei der ursprünglichen Pockenimpfung, bei Cholera, bei Lyssa, bei Tuberkulose, bei der Lungenseuche der Rinder, bei der Rinderpest, bei der afrikanischen Pferdesterbe, bei Küstenfieber und Texasfieber).

2. Abgeschwächte Krankheitserreger.

Die Abschwächung erfolgt:

a) mittels Tierpassage (bei der Vakzination gegen Pocken durch Rinderpassage, beim Schweinerotlauf durch Kaninchenpassage, bei Tuberkulose durch Kaltblüterpassage, beim Rauschbrand durch Froschpassage, bei der Maul- und Klauenseuche durch Ferkelpassage, bei den Schafpocken durch Ziegenpassage, bei der Tsetsekrankheit des Rindes durch Ratten- und Hundepassage der Trypanosomen, bei der Hämoglobinurie der Rinder durch Kälberpassage, bei der Spirochätenkrankheit der Hühner durch Züchtung im Küchleinorganismus, bei Lyssa durch Affenpassage);

b) durch Hitze (bei Milzbrand, bei Rauschbrand, bei Pest, bei Lyssa);

c) durch physikalische Maßnahmen:

α) bei Lyssa durch Trocknen, desgleichen bei Poliomyelitis;

β) zur Herstellung der homogenen Tuberkelbazillenkultur von Gourmont durch Schütteln;

d) durch Chemikalien:

α) durch den Einfluß des Sauerstoffs (Altwerdenlassen der Kulturen des Hühnercholeraabazillus, durch Luftzufuhr zu Cholera-kulturen);

β) durch Zusatz von antiseptischen Substanzen zu den Nährmedien oder Emulsionen (Carbolsäure, Kaliumbichromat bei Milzbrand, Lyssa, Poliomyelitis, Perdesterbe; Alkohol bei Pest; Magensaft bei Lyssa);

γ) durch chemisch indifferente Mittel (Glyzerin, Zuckerarten, Harnstoff bei Pocken, Rinderpest, Tuberkulose, Typhus, Rotz, Streptokokken).

3. Abgetötete Krankheitserreger.

Die Abtötung erfolgt:

a) durch Hitze (Tuberkulose, Cholera, Typhus, Ruhr, Pest, Streptokokken, Pneumokokken);

b) durch physikalische Maßnahmen (durch Trocknen und Zermahlen bei Tuberkulose);

c) durch Chemikalien:

α) durch Chloroform (Cholera);

β) durch Toluol (bei zahlreichen Bakterienemulsionen);

γ) durch Thymol (bei Cholera);

δ) durch Formalin (bei zahlreichen Bakterienemulsionen);

ϵ) durch Äther (bei Cholera und Maltafieber);

ζ) durch Alkohol (bei Cholera);

η) durch Phenol (bei Pest, Cholera, Pneumokokken, Perdesterbe);

ϑ) durch Trikresol (bei Ruhr, Streptokokken);

ι) durch chemisch indifferente Mittel, wie Glyzerin, Zuckerarten und Harnstoff (bei Tuberkulose, Typhus, Rotz, Streptokokken, Schweinepest).

4. Extrakte aus Krankheitserregern:

a) durch Autolyse (bei Typhus, Dysenterie, Cholera);

b) durch Erwärmen von Emulsionen (bei Typhus, Dysenterie, Pest, Cholera, Tuberkulose);

c) durch Serum, Galle und Exsudate (bei Pest, Typhus, Cholera, Hühnercholera, Milzbrand, Schweineseuche, Pneumokokken);

d) durch Schütteln mit Wasser, Kochsalzlösung und Seren (bei Cholera, Typhus, Schweineseuche, Meningokokken, Kälberruhr, Schweinepestbazillen);

e) durch Chemikalien eventuell in Kombination mit Schütteln:

α) durch Ammonsulfat und Natriumsulfat (bei Typhus, Cholera);

β) durch Alkalien und Säuren: Kalilauge, Natronlauge, Soda, Äthylendiamin, Antiformin, Seife, Neurin, Cholin, Salzsäure (bei Tuberkulose, Cholera, Meningokokken, Typhus, Dysenterie, Spirochätenkrankheit der Hühner);

γ) durch chemisch indifferente Stoffe wie Glycerin und Harnstoff (bei Tuberkulose, Rotz, Schweinepest, Schweinepestbazillen);

δ) durch Chloroform (bei Pest);

ε) durch lipoidartige Stoffe: Lezithin, Pyocyanase (bei Tuberkulose, Milzbrand);

f) durch physikalische Maßnahmen: Zertrümmern im Mörser, in Kugelmühlen oder in Zerreibungsmaschinen, durch Pressen mittels hydraulischer Presse, durch Zertrümmern nach Einwirkung von flüssiger Luft (bei Tuberkulose, Typhus, Cholera, Pest, Milzbrand, Streptokokken, Staphylokokken, Diphtherie, Schweineseuche, Lyssa, Schweinepestbazillen).

5. Stoffwechselprodukte der Krankheitserreger
(bei Diphtherie, Tetanus, Botulismus, Typhus, Cholera, Dysenterie).

6. Eine Kombination von Serum und Krankheitserregern
(bei Schweinerotlauf, Milzbrand, Rinderpest, Pneumokokken, Streptokokken, Typhus, Cholera, Pest, Lyssa, Dysenterie, Tuberkulose).

Dosierung.

Die beste Dosierung geschieht auf dem Wege der Abwägung. Die Kulturrasen werden mittels sterilen Spatels in vorsichtiger Weise abgenommen, so daß keine Nährbodenstücke mit abgeschabt werden. Man bringt die Masse in tarierte sterile Uhrschälchen, wiegt sie ab, worauf man die gewünschten Manipulationen vornehmen kann. Will man die Bakterien aus flüssigen Nährmedien

abwiegen, so wird die Bakterienmasse durch Ausschleudern der Nährflüssigkeit gewonnen. Um sie von den Nährbodenresten zu befreien, muß sie vor dem Wiegen gewaschen werden.

Eine weitere genaue Dosierung ist möglich durch die Zentrifugalmethode nach Ehrlich. Man bringt die Nährflüssigkeit oder Bakterienaufschwemmung in Zentrifugiergläschen mit dünn ausgezogenem, graduiertem Endstück, das beim Zentrifugieren in ein Stück starkwandigen Vakuumschlauches gesteckt wird. Irgend eine konservierte Bakterienaufschwemmung wird jedesmal mit zentrifugiert und dient als Standard der Konzentration. Dazu ist eine sehr schnellaufende Zentrifuge notwendig.

Eine ziemlich genaue Dosierung ist auch mittels geeichter Platinösen möglich, wenn die Kulturmasse gleichmäßig ist. Die Art der Füllung der Öse ist Sache der Übung. Wenn man sich eine besondere Füllung angewöhnt hat, gelingt es tatsächlich fast stets die gleiche Keimzahl zu erhalten, wie ich mich in zahlreichen Versuchen mittels der Plattenzählmethode durch Verdünnungen selbst überzeugt habe.

Die Wrightsche Zählmethode wird in der Weise ausgeführt, daß in eine Wrightsche, mit Marke versehene Kapillarpipette mittels Gummisaugers 1 Volumen Blut (aus der Fingerkuppe), danach unter Einschaltung einer Luftblase 1 Volumen Vakzin und 3 Volumina physiologischer Kochsalzlösung eingebracht werden. Die Kochsalzlösung kann bei weniger dichten Vakzinen durch das Vakzin selbst ersetzt werden. Der Pipetteninhalt wird auf einen Objektträger ausgeblasen und durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausblasen gemischt. Davon wird ein Tröpfchen auf einen mit feinstem Schmiergelpapier abgeriebenen oder durch Kochen in starkem Ätznatron vorbereiteten Objektträger ausgestrichen, fixiert und gefärbt. Zur Zählung der im Gesichtsfeld befindlichen Bakterien und roten Blutkörperchen wird ein stärkeres Okular verwendet. Wright ermittelt den Durchschnittswert mehrerer Gesichtsfelder, wobei er den Blutkörperchengehalt des normalen Blutes (5 000 000 000 pro 1 ccm) als bekannt ansieht.

Zahl der Blutkörperchen im Gesichtsfeld

Zahl der Bakterien im Gesichtsfeld

$$= \frac{\text{Zahl der Blutkörperchen in der Volumeneinheit}}{\text{Zahl der Bazillen in der Volumeneinheit}}$$

Beispiel: Gezählt sind 700 rote Blutkörperchen und 630 Bakterien, so stellen wir folgende Gleichung auf:

$$\frac{700}{630} = \frac{5\,000\,000\,000}{x}$$
$$x = \frac{630 \cdot 5\,000\,000\,000}{700}$$

Nach Zelikow läßt sich die Dichtigkeit einer Bakterienemulsion auch auf optischem Wege annähernd bestimmen. Die quantitative Bestimmung der Bakterienmasse durch die kalorimetrische Methode beruht auf dem Prinzip, daß Bakterien bei Erwärmung mit der Lösung irgend eines Farbstoffs gefärbt werden, indem sie einen Teil des Farbstoffs absorbieren. Bei genügender Dauer der Durchfärbung und gleicher Konzentration der Farbstofflösung ist die Menge des absorbierten Farbstoffs proportional der Menge der Bakterienkörper. Die Veränderung der Farbstoffkonzentration läßt sich leicht kalorimetrisch feststellen, und somit auch über die Quantität der Bakterienmasse urteilen.

Die Dichtigkeitsprüfung eines Impfstoffs nach Wright-Leishman geschieht mittels eines komplizierten Verfahrens, das Wright selbst als ungenau bezeichnet. Die Dichtigkeit des zu untersuchenden Impfstoffs wird festgestellt, indem man mit einem von allen Linsen befreiten Mikroskop, an dessen unterem Objektivende eine Glasplatte aufge kittet ist, durch den Impfstoff ein System von hellen und dunklen Linien, welches sich in dem Planspiegel des Mikroskops spiegelt, beobachtet und bei geeigneter zweimaliger Einstellung die Entfernung Objektisch — Tubusöffnung mißt. Die Differenz zwischen der ersten und zweiten Einstellung gibt die gesuchte Dicke der Impfstoffschicht. Der Impfstoff hat eine brauchbare Konzentration, wenn die Schichtdicke etwa 1 cm beträgt, d. h. wenn das Liniensystem bei Beobachtung durch den Tubus gerade verschwindet und die Entfernung von diesem Punkte bis zur Berührung des unteren Objektivendes mit dem Glasboden des Impfstoffgefäßes 1 cm beträgt.

In einfacherer Weise wird die Dosierungsfrage gelöst, wenn man nach „Agarkulturen“ rechnet. Die Agarfläche muß natürlich immer eine gleich große sein. Gleich weite Röhrrchen werden mit gleichen Mengen Agars beschickt und bei gleicher Neigung zur Erstarrung gebracht. Die Beimischung geschieht am gleichmäßigsten

durch Übergießen der schrägen Fläche mit einer dichten Bouillon-aufschwemmung einer jungen Agarkultur. Der Dichtigkeitsgrad der Aufschwemmung ist nach den Versuchen von Gotschlich und Weigang nicht sehr wesentlich. Bei größerem Bedarf verwendet man Massenkulturen auf Kolleschen Schalen, deren Oberfläche auf 12 bis 13 Agarröhrchen zu schätzen ist. Die Beimpfung wird ebenfalls mit einer dichten Bouillonkultur oder Bouillonaufschwemmung (etwa 10 ccm) ausgeführt. Natürlich müssen die Kulturen gleich lange einer gleichen Temperatur ausgesetzt werden. Zu den Kulturen sollte man womöglich gleichen Agar benutzen; da dies jedoch bei fortgesetzter Herstellung von Impfstoffen nicht möglich ist, muß man sich immer durch Vorversuche überzeugen, ob der neu hergestellte Agar von derselben Güte ist wie der vorige.

Virulenz.

Bei Verwendung von Kulturen zur Herstellung von Impfstoffen ist es von großer Wichtigkeit, die Virulenz derselben auf derselben Höhe zu erhalten. Sollen die Kulturen dauernd in ihrer Virulenz herabgesetzt bleiben, wird man sie auf ungünstigen Nährböden züchten, bei höheren Temperaturen halten, die zwischen der optimalen und der keimtötenden liegen. Ferner läßt sich die Virulenz herabmindern, wenn man zu den Nährböden Zusätze macht, die erfahrungsgemäß die Virulenz herabsetzen. Zusätze von antiseptischen Stoffen in Mengenverhältnissen, die das Wachstum zwar hemmen, aber nicht ganz aufheben, führen leicht zum Ziel. Ein weiteres Mittel, die Virulenz zu vermindern, ist auch eine geeignete Tierpassage. Zahlreiche Bakterienstämme erleiden aber auch ohne unseren Willen selbst bei Fortzuchtung auf Nährböden, die ihnen sehr zusagen, weil sie in ihrer Zusammensetzung den tierischen Säften nahestehen, eine Virulenzabnahme. Deshalb genügt es nicht immer, um Bakterien auf einer hohen Virulenz zu erhalten, sie auf günstigen Nährböden fortzupflanzen, man muß ab und zu eine Tierpassage einschalten. Bei manchen Bakterien gelingt es überhaupt nur eine hohe Virulenz zu erhalten durch fortwährendes Überimpfen von Tier zu Tier. Dabei ist es manchmal zweckmäßig, durch gleichzeitige Mitverimpfung anderer, unter Umständen pathogener Bakterienarten, die Virulenz zu steigern. Kulturen mit der höchst erreichbaren Virulenz bezeichnet Pasteur als „virus fixe“.

Beeinflussung der Krankheitserreger durch hohe Temperaturen.

Wie im vorigen Abschnitt angegeben, gelingt es durch Züchtung bei einer supraoptimalen konstanten Temperatur, zahlreiche Bakterien abzuschwächen und so in brauchbare Impfstoffe umzuwandeln. Bestimmte Temperaturgrade, die zur Abschwächung der Virulenz zu wählen sind, lassen sich nicht allgemein angeben. Die einzelnen Arten und auch die einzelnen Stämme verhalten sich verschieden. Soll die Abschwächung nicht durch Züchten, sondern durch einmaliges Erwärmen erreicht werden, so ist die Abschwächung nicht nur von der Erwärmungsdauer abhängig, sondern auch von dem Medium, in welchem die Bakterien suspendiert sind. Zu berücksichtigen ist ferner die Dichte der Suspension und die Homogenität. Zur Abtötung der Krankheitserreger kann man kurze Zeit hohe oder längere Zeit niedrigere Temperaturen einwirken lassen. Beide Arten führen leicht zu einer Entwertung des Antigens. Man wählt daher das Verfahren, welches in relativ kurzer Zeit bei niedriger Temperatur die Erreger abtötet. Welche Temperaturen zur Abtötung zu verwenden sind, läßt sich ebenfalls nicht allgemein sagen. Während bei einigen Bakterien durch die Einwirkung einer Temperatur von 65° die antigenen Eigenschaften nicht geschädigt werden, ist bei solchen Temperaturen bei anderen Erregern eine schwere Schädigung nachzuweisen. In trockenem Zustande vertragen nach Löffler die Bakterien hohe Temperaturen (— 150°), ohne die antigenen Fähigkeiten zu verlieren. Um einige Anhaltspunkte über die Höhe der notwendigen Temperaturen zu geben, sei bemerkt, daß Erreger, die nur aus vegetativen Formen bestehen, zur Abtötung Temperaturen von 52 bis 70° benötigen, während die Abtötung sporenhaltigen Materials erst bei Temperaturen über 80° erfolgt.

Das Erwärmen der Bakteriensuspensionen oder Bouillonkulturen geschieht in der Regel in einem Wasserbade von konstanter Temperatur. Zur gleichmäßigen Erwärmung der Flüssigkeit ist es nötig, sie öfters zu schütteln.

Bei jeder Art der Erwärmung scheinen jedoch die Antigene eine qualitative Änderung zu erfahren. Die Antikörper, welche mit erhitzten Antigenen erzeugt werden, sind nicht völlig identisch mit den Antikörpern, welche von nativen Antigenen gebildet

werden. Wir müssen uns immer vor Augen halten, daß durch das Erhitzen Bakterienkörpersubstanzen aufgeschlossen werden und in die Suspensionsflüssigkeit übertreten, die eine Änderung in der antigenen Qualität und Quantität erklärlich erscheinen lassen.

Abschwächung und Abtötung der Krankheitserreger durch Chemikalien.

Chemische Mittel sind frühzeitig zur Abschwächung und Abtötung von Krankheitskeimen angewandt worden. Da man meist zur innigen Berührung der Bakterien mit den chemischen Stoffen das Schütteln zur Hilfe nimmt, so findet neben der Abschwächung oder Abtötung auch eine mehr oder weniger intensive Extraktion statt. Es liegt daher auch hier ein Unterschied vor in der Qualität und Quantität der so gewonnenen Antigene und der ursprünglichen Bakterien.

Bezüglich der Wahl der chemischen Mittel ist vor allem darauf zu achten, daß dieselben nach Erlangung des gewünschten Effektes nicht mehr weiter auf das Antigen einwirken. Man wird daher solche Mittel bevorzugen, die wieder leicht entfernt werden können (Chloroform, Äther). Sind sie nicht leicht zu entfernen, so muß man sie soweit verdünnen, daß sie erfahrungsgemäß das Antigen nicht schädigen. Von großem Interesse in diesem Sinne ist ein Verfahren von Levy, Blumenthal und Marxer. Sie behandeln die Bakterien mit chemisch indifferenten Mitteln, welche die Antigene nicht alterieren, und können außerdem ihre Zucker- und Harnstofflösungen in jedem gewünschten Moment dadurch unwirksam machen, daß sie dieselben bei niederen Temperaturen im Vakuum zur Trockne eindampfen.

Wie die Abtötung der Bakterien außer von der Dauer der Einwirkung der chemischen Stoffe noch von der Dichtigkeit der Suspension und der Höhe der Temperatur abhängig ist, mögen folgende Beispiele illustrieren: 0,1 g Rotzbazillen auf 4 ccm 80 proz. Glycerin werden in 14 Stunden bei 37° abgetötet, bei einer Konzentration von 0,004 g Bazillen auf 4 ccm Flüssigkeit sind sie bereits nach 7¹/₂ Stunden vernichtet. Benutzt man Zimmertemperatur statt der von 37°, so erfolgt die Abtötung ungefähr in der doppelten Zeit.

Extraktion der Krankheitserreger.

Die Herstellung zahlreicher Impfstoffe aus Extrakten geschah in Erkenntnis der Tatsache, daß bei vielen Infektionserregern die immunisierende Substanz an das Protoplasma der Bakterienzelle gebunden ist. Zur Erleichterung und Beschleunigung der Antikörperbildung benutzte man daher Extrakte als Impfstoffe, um die immunisierende Substanz in leichter resorbierbarer Form zu verabfolgen. Bei den Erregern der hämorrhagischen Septikämien hat man damit hervorragende Erfolge erzielt. Bei solchen Bakterien, die im Organismus rasch aufgelöst werden, dürfte diese Methode überflüssig sein. Die Extraktmethode ist auch bei den Erregern zu vermeiden, deren Extrakte besonders giftig sind und die infolgedessen das Auftreten von störenden lokalen und allgemeinen Erscheinungen, die man gerade durch die Extrakte vermindern will, begünstigen. Dabei ist auch stets zu bedenken, daß die wirksamen Zellbestandteile sehr labiler Natur sind und bald eine Denaturierung erfahren. Die Konservierung dieser Antigene ist daher häufig sehr schwierig.

Ein Umstand, auf den zuerst Friedberger aufmerksam machte, läßt es zweckmäßig erscheinen, den Impfstoffen aus Extrakten auch Vollbakterien zuzufügen. Werden nämlich einem Organismus die aufgeschlossenen Zellbestandteile einverleibt, so bildet er infolge der leichter resorbierbaren Antigene sehr rasch Antikörper; die dadurch erzielte Immunität ist aber von kürzerer Dauer als die durch Vollbakterien erworbene.

Je nachdem man Mittel zur Unterstützung der Extraktion anwendet, wird man natürlich Antigene verschiedener Natur gewinnen.

Die Bailschen „Aggressine“ sind nach den Untersuchungen von Wassermann und Citron wohl auch unter die Extrakte zu rechnen (Schüttelextrakte aus Schweineseuchebakterien ergaben dieselben Resultate wie natürliche Exsudate [Aggressine] von infizierten Tieren).

Kombination von Serum und Krankheitserregern als Impfstoffe.

Ursprünglich bestand diese Methode aus zwei Impfstoffen, dem Serum, welches den passiven Schutz verlieh, und dem Impfstoff aus Krankheitserregern oder deren Extrakten, welche den

Organismus aktiv immunisierten. Als Paradigma dieser Impfmethode sei die Lorenz'sche Schweinerotlaufimpfung erwähnt. Später ging man dazu über, die Serovakzination so zu gestalten, daß nur ein Impfstoff nötig war. Besredka ging dabei so vor, daß er die betreffenden Krankheitserreger sensibilisierte, d. h. mit spezifischem Serum belud, und die Serumreste sodann durch Auswaschen von den Bakterien entfernte. Diese Impfstoffe haben den Vorzug, daß sie eine sofortige Immunität von langer Dauer erzeugen.

Impfstoffe aus reinen Stoffwechselprodukten werden praktisch nur zur Herstellung von Schutz- und Heilseren verwendet.

Konservierung der Antigene.

Die Konservierungsmethoden haben die Aufgabe, das Antigen nach Quantität und Qualität möglichst lange zu erhalten und seine Reinheit zu garantieren. Bei der Pockenlymphe müssen sie außerdem die oft nicht vermeidbaren Begleitbakterien abschwächen.

Im allgemeinen sind dieselben Konservierungsmittel anwendbar wie sie zur Aufbewahrung der Antikörper üblich sind. Siehe S. 96.

Man bewahrt die Antigene zweckmäßig im Kühlen und Dunklen auf, in gut verschlossenen Gefäßen, am besten in zugeschmolzenen Röhren, um sie vor Wärme, Licht und Luft bzw. Sauerstoff zu schützen. Außer der Trocknung im Vakuum bei niederen Temperaturen und Aufbewahren im Exsikkator ist die Kälte ein ausgezeichnetes Konservierungsmittel. Namentlich im gefrorenen Zustande sind die Antigene sehr haltbar.

Ausgedehnte Anwendung zur Konservierung finden chemische Mittel. Das gebräuchlichste Konservierungsmittel ist das Phenol (0,3 bis 0,5 Proz.) Trikresol verwendet man in Mengen von 0,3 bis 0,4 Proz., Glycerin von 20 Proz. bis zu reinem, Diaphtherin 0,05 bis 0,2 Proz., Chloroform etwa 1 Proz. Ferner dient eine 1½ bis 2 cm hohe Schicht Toluol zur Konservierung. Weniger empfehlenswert sind Formalin, Alkohol und Äther. v. Wassermann versetzt seine Staphylokokkenextrakte mit Gummi arabicum oder 2 bis 4 Proz. Gelatine. Außerdem macht er einen Zusatz von 0,5 Proz. Carbol.

Abfüllung usw. siehe unter „Allgemeine Technik der Antikörpergewinnung“.

Zusammenfassende Literaturangaben: Dieudonné, Immunität, Schutzimpfung usw., Leipzig. Ficker, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Friedberger, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Madsen, ebenda. Michaelis, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Neisser, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Wright, Studien über Immunisierung, Jena 1909.

Chemisch-physikalische Eigenschaften der Antigene.

Als Grundlage der Impfstoffe dienen die spezifischen Antigene. Die genauere chemische Zusammensetzung der Antigene ist unbekannt. Unter Antigenen (Deutsch) versteht man alle jene Substanzen, welche im lebenden Organismus spezifische Reaktionskörper zu bilden fähig sind. Es handelt sich bei den Antigenen um Körper von bedeutender Molekulargröße. Eine Eigenschaft ist allen Antigenen gemeinsam, die kolloidale Beschaffenheit ihrer Lösungen, die durch das geringe Diffusionsvermögen und den niederen osmotischen Druck ausgezeichnet sind. Das chemische Charakteristikum aller Antigene ist ihre Eiweißnatur. Nicht jedes eiweißhaltige Kolloid ist jedoch ein Antigen. Es muß assimilationsfähig sein, und zwar wirkt es nur dann antigen, d. h. immunisierend, wenn es ein intermediär schwer oder unvollständig abbaufähiges Eiweißkolloid ist. Der einzig sichere Maßstab, eine Substanz als Antigen zu erkennen, ist seine Fähigkeit Antikörper zu produzieren.

Die Spezifität eines Antigens kann durch verschiedene Maßnahmen eine Änderung erleiden. Durch Erhitzen erleiden antigenwirkende Eiweiße leicht eine Zustandsänderung derart, daß sich größere Kolloidkomplexe bilden, die jetzt auch Reaktionskörper erzeugen können gegen erhitztes Eiweiß. Auch durch Kälteeinwirkung können Änderungen in der antigenen Fähigkeit bedingt werden. Sechs Stunden lang bei -15 bis -17° gekühlte Typhuskulturen erleiden nach Perrone eine Abschwächung ihrer Virulenz. Mit solchen Kulturen geimpfte Tiere erlangen keine Immunität gegen virulente Kulturen. In ähnlicher Weise wie durch das Erhitzen wird die Spezifität geändert durch Alkalalbuminatbildung, Acidalbuminatbildung, durch Einwirkung von Formaldehyd, Toluol oder Chloroform und durch den Eintritt von Metallionen in das Eiweißmolekül. Man bezeichnet die Veränderungen, die die Antigene hauptsächlich auf physikalisch-chemische

Weise erleiden, nach Obermayer und Pick als Änderungen der Zustandsspezifizität. Diese Änderungen der Spezifizität lassen die Arteigenschaft des Antigens intakt, während Änderungen in der chemischen Struktur des Moleküls beispielsweise durch Jod oder Salpetersäure dem Antigen die Arteigenschaft rauben. Jodeiweiß von einem Kaninchen hat vollständig die Eigenschaft des Kanincheneiweißes verloren, es wirkt, einem Kaninchen injiziert, wie Jodeiweiß vom Menschen oder Pferd usw. Die jodierten Eiweiße erzeugen, gleichgültig von welcher Tierart sie stammen, nur Antikörper gegen Jodeiweiße. Durch den Eintritt des Jods hat das Antigen seine Artspezifizität verloren, nicht seine antigenen Eigenschaften überhaupt.

Außerdem gibt es Verfahren, welche die originäre, d. h. die ursprüngliche Spezifizität nicht beeinflussen, jedoch eine Gruppierung im Eiweißmolekül bedingen, die eine neue Spezifizität schafft. Ein solches Verfahren ist nach Obermayer und Pick das von Ehrlich gefundene Kuppelungsverfahren, bei welchem bei Eiweißkörpern und gewissen Diazkörpern Farbstoffe entstehen (Ehrliche Diazreaktion des Harns). Unter den Eiweißspaltprodukten geben hauptsächlich das Tyrosin und das Histidin diese äußerst empfindliche Reaktion und sind daher im wesentlichen für den Eintritt der Reaktion mit dem Eiweiß verantwortlich. Bei voller Erhaltung der Artspezifizität erzeugt das diazotierte Eiweiß Antikörper von hochgradigster Spezifizität gegen die Diazobenzoleiweiße.

Die angeführten Substitutionsprozesse, welche eine Änderung der antigenen Spezifizität hervorrufen, verlaufen in der Nähe oder im aromatischen Kern selbst. Je nach der Stelle, an welcher die Substituierung erfolgt, ändert sich die antigene Eigenschaft des Eiweißes. Es kann somit als wahrscheinlich angenommen werden, daß die artspezifische Eigenschaft im Eiweißmolekül in der Hauptsache durch Gruppen beeinflusst wird, die mit den aromatischen Kernen des Eiweißes zusammenhängen. Die Beteiligung der aromatischen Gruppe an der ursprünglichen Spezifizität kann man sich dabei so vorstellen, daß der aromatische Komplex etwa den Mittelpunkt abgibt für die jeweilige artcharakteristische Gruppierung der Seitenketten und daß durch den Eintritt der Substituenten die artcharakteristischen Differenzen nivelliert und zugunsten der neu eingetretenen Gruppe umgeprägt werden

(Pick). Daß der aromatischen Gruppe eine große Bedeutung für den Immunisierungsprozeß zukommt, geht auch aus den Beobachtungen von Wells hervor, nach welchen die Gelatine keine anaphylaktische Reaktionskörper erzeugen kann, auch dann nicht, wenn zu gleicher Zeit Tyrosin, jedoch ohne chemische Bindung, dem Organismus einverleibt wird. Früher schon hatte Vaughan gefunden, daß der Gelatine die den übrigen Eiweißkörpern zukommenden Giftwirkungen wahrscheinlich wegen des Mangels der aromatischen Gruppe abgehen. In demselben Sinne sind die Befunde Wells mit Gliadin (Eiweißkörper aus Weizen- und Roggenkörnern) und Zein (Eiweißkörper aus Maissamen) verwertbar. Ersteres weist nur geringe Mengen von aromatischen Aminosäuren auf und besitzt dementsprechend nur ein sehr schwaches Vermögen, anaphylaktische Reaktionskörper zu bilden, während das ähnliche Zein, welches wohl kein Tryptophan, dagegen große Mengen von Tyrosin und Phenylalanin aufweist, in ausgeprägter Weise spezifisch anaphylaktisch wirkt.

Eine Änderung in der Spezifität, wie bei den komplexer gebauten Antigenen (den bisher erwähnten antigenen Eiweißkörpern), ist bei den bakteriellen Antigenen meist nicht möglich. Irgend eine Änderung der Spezifität hat gewöhnlich den Verlust fast aller Fähigkeiten zur Folge. Dies gilt vor allem bei den stark giftig wirkenden sezernierten Antigenen, dem Diphtherie-, Tetanus-, Botulismustoxin usw. Bei diesen hat man die Spezifität der Toxinwirkung von der Spezifität der Antigenwirkung zu trennen. Erstere Wirkung kann vernichtet werden, ohne das letztere ganz aufgehoben wird (Toxoidbildung im Sinne Ehrlichs). Etwas anders liegen die Verhältnisse bei den Endotoxinen, die mit dem Zelleiweiß innig verknüpft sind. Eine Trennung der antigenen, also immunisierenden Fähigkeit von der rein toxischen ist hier unmöglich. Vielmehr bedingt nach R. Pfeiffer und Bessau die giftige Bakteriensubstanz z. B. bei den Typhusbazillen auch den Immunisierungseffekt. Ausgelaugte, atoxisch gewordene Bakterienreste entfalten nur eine schwache immunisierende Kraft. Für eine Sonderstellung der Endotoxine unter den Toxinen scheint auch die Tatsache zu sprechen, daß es bisher nicht gelungen ist, aus den Endotoxinträgern annähernd so stark wirksame Gifte in vitro zu gewinnen, wie es die echten sezernierten Gifte sind. Pick ist der Ansicht, daß der Unterschied in der antigenen

Wirkung zum Teil auch in der Differenz des chemischen Aufbaues liegt. Die bei den Endotoxinen hauptsächlich verwendeten Zellauszüge bestehen vorwiegend aus Nukleoproteiden, in den toxinhaltigen Nährmedien treten, vor allem bei den durch Salzfällung gereinigten, die albumosen- und peptonartigen Eiweißspaltprodukte in den Vordergrund. Ein weiterer Unterschied besteht in ihrem Verhalten gegenüber der Kerzenfiltration. Die echten Toxine passieren Bakterienfilter, während die Endotoxine, wohl infolge der Größe des Antigenmoleküls, zum großen Teil zurückgehalten werden.

Eine Hauptschwierigkeit die Antigene chemisch zu analysieren besteht darin, daß sie chemischen und physikalischen Einflüssen gegenüber im hohen Maße labil sind. Siedehitze zerstört die immunisierenden Gruppen der Bakterien sehr rasch, in trockenem Zustande vertragen sie jedoch sehr hohe Wärmegrade. Stark schädigend wirken ferner konzentrierte Säuren und Alkalien. Aber auch schon der Sauerstoff der Luft und das Tageslicht setzt die Antigene in ihrer Wirksamkeit herab. Durch proteolytische Fermente werden die Antigene bei genügend langer Einwirkung zerstört.

Die durch Auszüge aus den Bakterienzellen mit indifferenten oder schwach alkalischen Mitteln gewonnenen Antigene lassen sich in derselben Weise reinigen und konzentrieren wie die echten Toxinlösungen (siehe unter den einzelnen Toxinen).

Lustig und Galeotti versuchten eine Reindarstellung der Antigene aus den Bakterien und stellen ihre Bakteriennukleoproteide in folgender Weise her: Die Kulturmasse wird mit einer 0,75 bis 1 proz. Lösung von Kalilauge wenigstens einige Stunden extrahiert. Die resultierende opalisierende muzinartige Flüssigkeit wird durch eine dicke Papierschicht unter Zuhilfenahme der Luftpumpe filtriert. Der Kalilaugeextrakt wird mit verdünnter Salzsäure- oder Essigsäurelösung (10 oder 20 proz.) tropfenweise versetzt. Der entstehende weiße Niederschlag von Nukleoproteiden wird vorsichtig abfiltriert oder durch Zentrifugieren getrennt. Das Nukleoproteid muß sodann gewaschen werden, anfangs mit leicht angesäuertem Wasser, später mit reinem Wasser bis zum Verschwinden jeder Spur von saurer Reaktion. Darauf wird es im Vakuum, Exsikkator oder in einem gewöhnlichen Brutschrank getrocknet oder sofort in 1 proz.

Natriumkarbonatlösung gelöst und im Eisschranke aufbewahrt. Blell empfiehlt zum flüssigen Präparat einen Zusatz von 0,5 Proz. Karbolsäure. Handelt es sich um Bakterien, die nur gut in flüssigen Nährmedien gedeihen, so setzt man diesen soviel Kalilauge zu, bis der Inhalt einer 1proz. Lösung entspricht.

Das trockene Nukleoproteid ist in destilliertem Wasser und verdünnten Säuren, sowie in vielen Lösungsmitteln (Alkohol, Äther usw.) unlöslich, in Alkalien löslich. Auch in 10proz. Kochsalzlösung ist das Nukleoproteid teilweise löslich. Aus den alkalischen Lösungen fällt es bei Neutralisation oder schwacher Ansäuerung in Form von weißen Flocken aus, desgleichen durch die Salze der Schwermetalle, durch Zinkchlorid, Silbernitrat, Alkohol, Tannin und durch Sättigung mit Ammonium- oder Magnesiumsulfat. Es gibt Millonsche und Xanthoproteinreaktion. Mit Kalilauge und Kupfersulfat erhält man einen graugrünen Niederschlag, aber keine Reduktion. Bendix fand als integrierenden Bestandteil der Bakteriennukleoproteide Pentosen. Beim Kochen einer Nukleoproteidsuspension findet eine partielle Koagulierung der Substanz statt. Durch Zusatz von Natriumkarbonat kann der koagulierbare Teil von der in Lösung bleibenden Nukleingruppe abgespalten werden.

Wird die direkt aus den Bakterien gewonnene Substanz mit künstlichem Magensaft verdaut, so erhält man ein Pepton und einen phosphorreichen Rückstand (Nuklein Bang). Beim Kochen des Nukleoproteids mit verdünnter Schwefelsäure werden aus der Nukleingruppe Purinkörper abgespalten. Das Nukleoproteid hinterläßt wenig phosphorreiche Asche, in der auch Spuren von Schwefel nachweisbar sind (Galeotti). Die quantitative Bestimmung von P und N ergab Durchschnittswerte von 12,15 Proz. N und 0,028 bis 0,043 Proz. P. Nach Galeotti besitzt das Nukleoproteid Affinität zu den basischen Farbstoffen.

Brieger und Mayer gewannen die immunisierenden Substanzen der Bakterien durch Fällen mit Ammonsulfat. Sie mazerierten die Bazillen acht bis zehn Wochen in konzentriertem alkalischen Ammoniumsulfat, wobei täglich die Reaktion kontrolliert wurde. Sobald sich Säuerung zeigte, wurde mit ganz verdünnter Bikarbonatlösung nachalkalisiert. Darauf werden die Bakterien durch gehärtete Filter von der Salzlösung abfiltriert. Der Niederschlag wird mit 20 bis 30 ccm destilliertem Wasser,

welches mit äußerst verdünnter Sodalösung gerade sichtbar alkaliert ist, ein bis zwei Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und dann bis zur vollständigen Autolyse drei Tage bei 37° stehen gelassen. Vom zweiten Tage ab zentrifugierten Brieger und Mayer noch weitere drei Tage täglich 1/2 Stunde den Niederschlag von Bakterentrümmern und Nährbodenresten ab und setzten die Lösung zur Konservierung sehr vorsichtig Chloroformdämpfen aus.

Andere Methoden zur Reinigung und Konzentrierung der Antigene sind unter den einzelnen Toxinen beschrieben.

Literatur: Bang, Deutsche med. Wochenschr. 1901. v. Behring, Allgem. Therapie d. Infektionskrankheiten. Bendix, Deutsche med. Wochenschr. 1901. Blell, Ztschr. f. Hyg. Bd. 55. Blum, Ztschr. f. physiol. Chemie 1896. Brieger u. Mayer, Deutsche med. Wochenschr. 1903 u. 1904. Calmette, Menses Handb. d. Tropenkrankheiten 1905. Faust, Die tierischen Gifte 1906. Jacoby, Immunität und Disposition und ihre experiment. Grundlagen 1906. Lustig, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Lustig und Galeotti, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Obermayer u. Pick, Wiener klin. Wochenschr. 1903, 1904, 1906 u. Hofmeisters Beiträge 1905. Oppenheimer, Toxine und Antitoxine, Jena. Perrone, Zentralbl. f. Bakt. 1907. Pfeiffer u. Bessau, Zentralbl. f. Bakt. 1910. Pfeiffer u. Marx, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Pick, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908 u. Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. usw. 1912. Sachs, ebenda u. Oppenheimer, Handb. d. Biochemie usw. 1909. Vaughan, Journ. of Med. Research. 1904 u. Ztschr. f. Immunitätsforsch. 1909. Wells, Journ. of infectious diseases 1908.

II. Spezieller Teil.

Impfstoffe gegen Bradsot.

Jensens Impfstoffe: Eingetrocknete, sporenhaltige Bouillonkultur wird 1/2 Stunde auf 100° erhitzt.

Dosis: 0,02 bis 0,05 g pro Lamm oder Schaf subkutan.

Eine Methode analog der Rauschbrandfadenmethode hat sich nicht bewährt.

Ein weiterer Impfstoff besteht aus einer Mischung des obigen Impfstoffes mit Immuserum.

Dosierung: 0,0015 g eingetrocknetes Immunerum und 0,005 g Kultur werden zusammen mit Wasser angerührt und subkutan verimpft.

Auch eine subkutane Einlegung von Fäden, die mit sporenhaltiger Kultur mit Zusatz von Immunerum imprägniert waren, wurde von demselben Autor ohne praktischen Erfolg versucht.

Literatur: Jensen, Kolle-v. Wassermann, Handbuch d. path. Mikroorg. 1913.

Choleraimpfstoffe.

Aus lebenden Keimen: Ferran benutzte lebende Cholera-vibrionen zur Schutzimpfung. Er injizierte 0,4, 0,5 und nochmals 0,5 ccm 48-stündiger Bouillonkultur in wöchentlichen Intervallen subkutan.

Die Haffkinesische Methode besteht aus zwei verschiedenen Impfkulturen, einer abgeschwächten und einem Virus fixe. Das zweite Vakzin (Virus fixe) hat durch weitgehende Meerschweinchenpassage mittels Verimpfung des Peritonealexsudats, welches jedes Mal etwa 16 Stunden an der Luft gestanden hatte, eine konstante Höhe erreicht, die etwa das 50-fache der Ursprungskultur beträgt. Das erste schwächere Vakzin wird in der Weise erhalten, daß man die Virus fixe-Bouillonkulturen unter konstanter Sauerstoffdurchleitung bei 39° züchtet. Aus diesen Kulturen werden täglich Agarkulturen angelegt. Sobald die angelegten Kulturen anzeigen, daß in den Sauerstoffkulturen keine lebenden Cholera-bazillen mehr vorhanden sind, wird die zuletzt angegangene Agarkultur auf Bouillon verimpft und wieder mit Sauerstoff behandelt. Nach mehreren Generationen resultiert eine abgeschwächte Kultur, die auch bei subkutaner Injektion größerer Dosen beim Meerschwein keine Nekrose macht und das Tierchen gegen die nekrotisierende Wirkung des Virus fixe schützt.

Der Impfstoff wird in der Weise bereitet, daß 24-stündige bei 37° gewachsene Agarkulturen des ersten und zweiten Vazins mit gekochtem Wasser abgeschwemmt und gleichmäßig zerrieben werden. Die Kulturen werden in 16 cm langen, 1½ cm breiten Reagensgläsern angelegt, die $\frac{2}{3}$ mit Agar gefüllt sind.

Die Impfdosis des Vazins I beträgt für Erwachsene $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{4}$ eines 24-stündigen Agarröhrchens. Bei mäßiger Reaktion (unter 38°), wird von Vakzin II eine größere Menge verabreicht,

steigt das Fieber nicht über 38,5 bis 39,5°, so wird dieselbe Dosis gegeben, bei Temperaturen über 40° wird vom Vakzin II nur $\frac{2}{3}$ der Menge vom Vakzin I geimpft. Später injizierte Haffkine gleich das Vakzin II.

Die Dauer des Impfschutzes soll 14 Monate betragen.

Aus abgetöteten Keimen: Der Kolesche Impfstoff ist eine Aufschwemmung virulenter Choleravibrionen in physiologischer Kochsalzlösung, die durch 10-minütige Einwirkung von Chloroformdämpfen bei 37° oder durch 2- bis 3-minütiges Kochen abgetötet sind.

Die Dosis dieses Impfstoffes beträgt $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{10}$ 24-stündige Agarkultur.

Später sterilisierte Kollo die Vibrionenaufschwemmung durch Erhitzen bei 56 bis 60°. Impfdosis: $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{15}$ einer 24-stündigen Agarkultur. Im kaiserl. japan. Seruminstitut werden die Choleravibrionenaufschwemmungen nach dem Abtöten durch $\frac{1}{2}$ -stündiges Erwärmen auf 60° mit 0,5 Proz. Karbol versetzt. Dosis: zuerst 1 Öse = 2 mg, später 2 Ösen.

Impfstoff nach Lüdke: 12 Agarkulturen eines virulenten Cholerastammes werden eine Stunde im Wasserbad bei 50 bis 55° erhitzt und mit sehr wenig physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die dickflüssige Abschwemmung wird im Vakuum getrocknet.

0,1 g des gelblichen haltbaren Pulvers werden in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung längere Zeit gründlich durchgeschüttelt. Davon werden 2 ccm subkutan injiziert.

Nach Leishman werden die Cholerakulturen zur Gewinnung eines Vakzins zweckmäßig nicht höher als auf 53° erhitzt. Siehe auch Typhusimpfstoff nach Leishman.

Aus Extrakten: Verfahren von Neisser und Shiga: eine 24-stündige Agarkultur wird mit 100 ccm 0,8 proz. Kochsalzlösung abgespült, während einer Stunde auf 60° erwärmt, dann 2 Tage bei 37° stehen gelassen und keimfrei filtriert. Nach Bertarelli beträgt die Impfdosis 0,3, 0,4, 1,0 und 2,0 subkutan.

Herstellung des Impfstoffs nach Brieger und Mayer mittels Ammonsulfat, siehe S. 34. Dieselben Autoren konnten auch einen wirksamen Impfstoff gewinnen durch 8- bis 48-stündiges Ausschütteln der Choleravibrionen in destilliertem Wasser. Pro

Agarröhrchen (24-stündig) werden 5 ccm destillierten Wassers genommen und vor Licht geschützt im Schüttelapparat extrahiert. Die keimfreie Filtration geschieht durch Pukal. Prüfung durch intravenöse Injektion an Kaninchen.

Anticholerin nach Klebs: Massenkulturen von Cholera-vibrionen werden abgetötet, filtriert, auf dem Wasserbad eingedickt und mit Alkohol gefällt. Die vom Niederschlag getrennte Flüssigkeit stellt das Anticholerin dar.

Nach Wassermann wird das wirksame Prinzip aus den Cholerazellen ebenfalls durch Fällung mit absolutem Alkohol gewonnen. 1 Liter 3- bis 5-tägige Bouillonkultur wird bei 70 bis 80° zur Sirupkonsistenz eingeengt und tropfenweise mit absolutem Alkohol versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. 0,005 ccm des Präparates ist die Schutzdosis für Meerschweinchen.

Das Choleranukleoprotein nach Lustig-Galeotti, siehe S. 33.

Serovakzin nach Besredka: 48-stündige Agarkulturen werden in möglichst wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 12 Stunden lang mit dem homologen Immuneserum (bis zur völligen Agglutination) bei 37° in Kontakt gelassen, danach wird das Serum abgegossen und die Bakterien werden mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und darauf eine Stunde bei 56° abgetötet.

Der Schutz tritt bereits nach 24 Stunden ein (Meerschwein) und dauert wenigstens fünf Monate.

Literatur: Bertarelli, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902. Derselbe, Compt. rend. de l'Acad. 1902. Brieger und Mayer, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Brieger und Wassermann, ebenda 1892. Ferran, Deutsche med. Wochenschr. 1892. Derselbe, Compt. rend. de la soc. de Biol. 1892. Friedberger, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Haffkine, Bull. méd. 1892. Derselbe, Sem. méd. 1892. Derselbe, Brit. med. Journ. 1895. Derselbe, Bull. Inst. Pasteur, Tome IV. Heller, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 39. Hetsch, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1902. Klebs, Deutsche med. Wochenschr. 1892. Kolle, ebenda 1897. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 29. Leishman, Practitioner 1910. Lüdke, Med. Klinik 1914. Mayer, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Murata, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 35. Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Pfeiffer, Ztschr. f. Hyg. 1894 u. 1895. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1896. Pfeiffer und Friedberger, Berl. klin. Wochenschr. 1902. Pfeiffer und Kolle, Zentralbl.

f. Bakt. 1896. Pfeiffer und Marx, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Schmitz, Ztschr. f. Hyg., Bd. 32. Sobernheim, Hyg. Rundschau 1897. Wassermann, Ztschr. f. Hyg. 1893.

Impfstoffe gegen Coliinfektionen.

Gegen diese Infektionen scheinen Eigenvakzine notwendig zu sein. Die aus den betreffenden Krankheitsfällen gezüchteten Colikulturen werden durch Erhitzung auf 56° während $\frac{3}{4}$ Stunden abgetötet.

Die Dosierung ist bei den einzelnen Patienten sehr verschieden.

Literatur: Michaelis, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Reiter, Deutsche med. Wochenschr. 1913. Wright Studien über Immunisierung, Jena, 1909.

Impfstoffe gegen Geflügelcholera.

Impfstoff von Lignières und Joseph: Derselbe wird polyvalent aus sechs Arten Erreger der hämorrhagischen Septicaemie durch Abschwächung bei Züchtung bei 42 bis 43° hergestellt. Das Vakzin I wird fünf Tage, das Vakzin II zwei Tage bei dieser Temperatur belassen.

Dosierung: $\frac{1}{8}$ ccm einer Mischung der sechs abgeschwächten Stämme subkutan, zuerst Vakzin I, später Vakzin II.

Pasteur erhielt einen Impfstoff aus natürlich abgeschwächten Bouillonkulturen des Schweineseuchebazillus, die unter Wattepfropf bei Luftzutritt im Dunkeln drei bis vier bis fünf bis sechs bis zehn Monate stehen geblieben waren.

Der Impfstoff wurde aus dem Institut Pasteur in zwei Sorten einem Vakzin I und II geliefert.

Dosierung: $\frac{1}{10}$ ccm Vakzin I subkutan am äußersten Ende des Flügels, 12 bis 14 Tage darauf Vakzin II.

Technik der Impfstoffe aus Aggressinen und Extrakten siehe unter Schweineseuche.

Der Impfschutz mit einem Extrakt, den J. Müller mittels normalen Pferdeserums gewonnen hatte, hielt nur einige Wochen an.

Literatur: Kitt, Deutsche Ztschr. f. Tiermed., Bd. 13. Derselbe, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Lignières, Rec. de méd. vét. 1902. Müller, Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 1910. Pasteur, Compt. rend. 1880. Derselbe, Rec. de méd. vét. 1880. Weil, Ztschr. f. Hyg. 1907.

Gonokokkenimpfstoffe.

Die Abtötung erfolgt in der Regel bei Temperaturen von 40 bis 60°. Man verwendet 12- bis 24-stündige Kulturen und schwemmt dieselben mit physiologischer Kochsalzlösung ab. Zur Entfernung von Nährbodenresten werden die Aufschwemmungen in der Zentrifuge ausgewaschen. Zur Konservierung erhalten die Impfstoffe die üblichen Zusätze von Karbol, Trikresol oder Lysol.

Brauchbare Impfstoffe erhält man auch ohne jedes Erhitzen, indem man nach Zusatz eines der eben erwähnten antiseptischen Mittel die Gonokokkenemulsionen bei 37° stehen läßt.

Fast alle bekannten Gonokokkenimpfstoffe werden aus zahlreichen verschiedenen Stämmen hergestellt, die oft durch immer wieder frisch gezüchtete ersetzt werden.

Cruveilhier empfiehlt einen Impfstoff aus sensibilisierten Gonokokken (Methode nach Besredka).

Dosierung: Mit 20 bis 25 Millionen Keimen beginnend steigt man in zwei- bis vier- bis sechstägigen Intervallen in der Regel auf 100 bis 200 Millionen. Bruck gibt für seinen Impfstoff „Arthigon“ (1 ccm = 50 Millionen Keime) folgendes Behandlungsschema an. Die Injektionen werden intramuskulär in die Glutäen vorgenommen.

Man beginnt mit 0,5 ccm Arthigon. Tritt Temperatursteigerung ein, so wird drei bis vier Tage gewartet, dann dieselbe Dosis wiederholt. Tritt eine geringere Reaktion auf, so erfolgt wieder Abwarten von drei bis vier Tagen und dann Injektion von 1,0 ccm.

Erfolgt nach einer Injektion kein Temperaturanstieg, so spritzt man schon nach zwei Tagen eine höhere Dose.

Auf diese Weise steigt man, wie folgt: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0.

Höhere Dosen als 2,0 sind nur ausnahmsweise zu injizieren.

Mehr als fünf bis sechs Injektionen sind selten notwendig.

Literatur: Brandweiner, Naturforscherversammlg., Wien, 1913. Bruck, ebenda; Deutsche med. Wochenschr. 1909; Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. usw. 1912. Cruveilhier, Berl. klin. Wochenschr. 1913. Menzer, Naturforscherversammlg., Wien 1913. Michaelis, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Reiter, Deutsche med. Wochenschr. 1913. Schindler, Berl. klin. Wochenschr. 1910.

Impfstoffe gegen Heufieber.

Noon verwendet als Impfstoff Extrakt von Pollenkörnern von *Phleum pratense*. Er empfiehlt subkutane Injektionen sehr kleiner Dosen in den Wintermonaten.

Schepegerell läßt die Pollen der *Ambrosia* benutzen. Sie sollen vor der Heufiebersaison täglich inhaliert werden.

Literatur: Freeman, Lancet, 1911. Noon, ebenda 1911. Prausnitz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Kälberruhrimpfstoff.

Von verschiedenen Fabriken werden Impfstoffe aus Bakterienextrakten der Erreger der Kälberruhr empfohlen. Technik der Extrakte siehe unter Schweineseuche.

Dosierung: v. Sande empfiehlt als erste Injektion 10 ccm des Bazillenextraktes sechs Wochen vor dem Abkalben und nach 10 Tagen als zweite 20 ccm subkutan. Im letzten Trächtigkeitsmonat soll eine Impfung wegen Gefahr von Abort und Exitus unterbleiben.

Literatur: v. Sande, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1909.

Impfstoffe gegen die Lungenseuche der Rinder.

Zur Herstellung der Impfstoffe gegen Peripneumonie der Rinder wird nur virulentes Material benutzt. Willems injiziert auf der Rückseite des Schwanzes 8 cm von der Spitze entfernt Saft aus frisch hepatisierten Lungenpartien eines Rindes im ersten Stadium der Erkrankung. Martin verwendet ein mit Lymphe getränktes Haarseil.

Von der Lymphe werden 0,25 bis 0,5 ccm geimpft. Hat man nach der Methode von Nocard und Roux gezüchtete Reinkulturen, so genügen zur Impfung wenige Tropfen.

Literatur: Nocard, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1903. Raebiger, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908, Schütz und Steffen, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 1889, 1890, 1891. Willems, Magaz. f. d. gesamte Tierheilk. 1852.

Impfstoffe gegen Lyssa.

Der Erreger der Tollwut (Hundswut) ist unbekannt und bisher unzüchtbar. Er befindet sich hauptsächlich im Gehirn und verlängerten Mark. Pasteur hatte gefunden, daß durch

fortwährende Kaninchenpassage das Lyssavirus derart verändert wird, daß das Inkubationsstadium abnimmt und nach 50 Passagen nur sechs bis acht Tage beträgt. Eine weitere Passage verändert das Inkubationsstadium nicht mehr. Ein derartig verändertes konstantes Virus nannte Pasteur Virus fixe. Högyes konnte in kürzerer Zeit ein Virus fixe herstellen, indem er zu den ersten Passagen junge Kaninchen von 700 bis 1000 g benutzte. Babes gelang rasch zu einem Virus fixe dadurch, daß er eine alternierende Passage durch Kaninchen und Meerschweinchen anwandte. Nach den neueren Untersuchungen von Babes, Nitsch und Marx scheint das Virus fixe auch ohne weitere Behandlung für den Menschen abgeschwächt zu sein. Das Virus fixe bildet den Ausgangspunkt für die Impfstoffe.

Högyes verwendet das Virus fixe selbst als Impfstoff, indem er dasselbe stark verdünnt und mit der schwächsten Konzentration die Immunisierung beginnt. Ein Teil Medulla oblongata eines an Lyssa frisch verendeten Kaninchens wird mit 100 Tln. physiologischer Kochsalzlösung verrieben. Von dieser Stammlösung legt man mittels geeichter Pipetten Verdünnungen an von 1:200—500—1000—2000—5000—6000—8000—10 000. 3 ccm der letzten Verdünnung ist die sicher tödliche Dosis für Kaninchen (Nitsch).

Der Pasteursche Impfstoff wird hergestellt durch Trocknen des virushaltigen Rückenmarks über Kali causticum. Frisch an Lyssa verendete oder 24 Stunden vor dem Tode entblutete Kaninchen (Marx) werden aufgespannt und das Rückenmark wird steril herausgenommen. Darauf hängt man es an sterilisierten Seidenfäden oder an einem Platindraht in ein braunes sterilisiertes Glasgefäß, das am Boden Stücke von Ätzkali enthält. Die Gefäße werden im Dunkeln bei 20 bis 25° aufbewahrt. Das Virus von Bujwid, welcher bei 8 bis 10° trocknet, braucht längere Zeit zur Abschwächung wie bei der Aufbewahrung bei 20°. Vor dem Trocknen werden kleine Proben zur Untersuchung auf Sterilität entnommen.

Das Virus ist nach 12- bis 14-tägigem Trocknen für Kaninchen unschädlich, nach ein bis vier Tagen ist es noch virulent. Bei dünnem Mark tritt nach sechs bis acht Tagen bereits eine Abtötung ein. Die Behandlung des Menschen wird gewöhnlich mit einem acht Tage lang getrockneten Mark begonnen. Nach Marx zerreibt man 1 ccm des zu injizierenden Markes in einem

sterilen Reibglas mit 5 ccm Bouillon, physiologischer Kochsalzlösung oder Babesschem künstlichen Serum (5 g Natr. sulf., 6 g Natr. chlorat., 1000 ccm Wasser). Von der Emulsion werden je nach dem Alter des Markes 1 bis 3 ccm subkutan in der Bauchgegend gespritzt.

Die Art der Behandlung ist verschieden, je nach der Schwere des Falles, dem Stadium der Erkrankung, der Stelle des Bisses, dem Alter des Patienten usw. Marx hat z. B. im Berliner Institut nach folgendem Schema behandelt: Er gab bei der gewöhnlichen Behandlung 8 + 7, 6 + 6, 5, 5, 4, 3, 3, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2, 5 + 4, 3, 4, 5-tägiges Mark in 19 Tagen, in schweren Fällen 8 + 7 + 6, 5 + 4, 4 + 3, 5 + 5, 4 + 4, 3, 3, 2, 2, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2, 4, 3, 3, 2-tägiges Mark in 21 Tagen. Nach den neueren Erfahrungen ist besonders in schweren Fällen eine intensivere Behandlung als die von Pasteur empfohlene erfolgreich. Schon am ersten oder zweiten Tage wird virulentes Mark von Virus fixe ohne Schädigung der Patienten vertragen.

Babes und Puscariu schwächen ihr Virus fixe durch Erwärmen ab. Sie bereiten den Impfstoff, indem sie die Emulsion des Markes 2 bis 40 Minuten auf 58° erwärmen. Nach 40 Minuten ist das Virus für das Kaninchen unschädlich, nach zwei Minuten tötet es dieselben in neun Tagen. Dazwischen liegen die verschiedenen anderen Abschwächungsgrade. Eine ähnliche Abschwächung erhielten diese Autoren, wenn sie ihre virushaltigen Emulsionen 10 Minuten auf 35 bis 60° erhitzten. Das auf 35° erwärmte Virus tötet die Versuchstiere in neun Tagen, das auf 50° erwärmte in 11 bis 12 Tagen, das auf 60° erwärmte läßt sie am Leben.

Puscariu gibt neuerdings folgende Bereitstellungstechnik der Impfemulsionen an: Das Hirn eines an fixer Wut verstorbenen Kaninchens wird mit 200 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung in einem Glasmörser zerrieben und durch ein feines Metallsieb in ein Glasgefäß geseiht. Diese etwa 7 bis 8 g Hirnsubstanz enthaltende Emulsion wird in abfallenden Mengen in Probierröhrchen verteilt, von welchen jedes ein Thermometer enthält. In einem besonders konstruierten Apparat können alle Röhrchen auf einmal eingebracht werden und zu gleicher Zeit 15 Minuten lang auf die nötigen verschiedenen Temperaturgrade erhitzt werden, d. i. 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50° und 45°. Nach Abkühlung auf

Zimmertemperatur werden die verschiedenen Emulsionen zur Behandlung verwendet.

Die beste Behandlungsart geben Puscariu und Lebell in folgender Tabelle wieder:

Tage	Leichte Fälle	Emulsion ccm	Schwere Fälle	Emulsion ccm	Sehr schwere Fälle	Emulsion ccm
1	65 ⁰	3	65 ⁰	3	65 ⁰	3
2	60	3	60	3	60	3
3	55	3	55	3	55	3
4	65	3	50	3	50	3
5	60	3	65	4	45	3
6	55	3	60	4	65	4
7	50	3	55	4	60	4
8	60	3	50	4	55	4
9	50	3	45	4	50	4
10	45	3	60	4	45	4
11	—	—	50	4	60	5
12	—	—	45	4	50	5
13	—	—	—	—	45	5
14	—	—	—	—	ausnahmsweise Virus fixe	5

Literatur: Babes, Sem. méd. 1906. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. 1904. Bujwid, Hyg. Rundsch. 1895. Galtier, Compt. rend. 1888. Högyes, Lyssa, Wien 1897. Kraus, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Marx, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1903. Nitsch, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Pasteur, Compt. rend. 1881, 1882, 1884, 1885, 1886. Derselbe, Ann. Pasteur 1887 und 1888. Puscariu, Arch. des scienc. méd. 1900. Puscariu und Lebell, Hyg. Rundsch. 1914.

Impfstoff gegen Maul- und Klauenseuche.

Löfflers Impfstoff: Eine Mischung von 0,5 ccm hochwertigem Rinderimmunserum mit 0,03 ccm frischer virulenter Lymphe subkutan injiziert. 24 bis 26 Tage später erhalten die Rinder 0,0033 ccm Lymphe, nach weiteren 12 bis 14 Tagen 0,01 ccm und nochmals nach 12 bis 14 Tagen 0,04 ccm Lymphe subkutan.

Literatur: Casper, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Löffler, 8. Intern. tierärztl. Kongreß, Budapest. Derselbe, Klimmer und Wolf-Eisner, Handb. d. Serumtherapie usw. 1911.

Milzbrandimpfstoffe.

Aus abgeschwächten Bazillen: Der Pasteursche Impfstoff besteht aus zwei durch supraoptimale Temperaturen ab-

geschwächten Kulturen. Die erste Kultur, premier Vaccin, ist durch 24 Tage lange Züchtung bei 42,5° so abgeschwächt, daß sie nur noch weiße Mäuse, nicht aber Meerschweinchen tötet. Die zweite Kultur, deuxième Vaccin, hat eine größere Virulenz, sie tötet Mäuse und Meerschweinchen, nicht aber Kaninchen.

Nicht alle Stämme eignen sich zur Herstellung des Pasteurischen Impfstoffs. Einmal abgeschwächte Milzbrandstämme bewahren den ihnen künstlich verliehenen verminderten Virulenzgrad unter den verschiedensten Bedingungen als konstante Eigenschaft. Von Zeit zu Zeit werden jedoch zweckmäßig Nachprüfungen der Virulenz vorgenommen. Dazu benutzt man 16 bis 18 Stunden bei 35 bis 36° gezüchtete Kulturen. Zur Virulenzprüfung nimmt man nach Sobernheim immer mehrere Tiere, da die Reaktion auf die Infektion mit abgeschwächten Kulturen selbst bei den gleichen Tierarten häufig ganz verschieden ausfällt. Man spritzt je drei Tieren $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ und $\frac{1}{1000}$ Öse unter die Haut. Man nimmt am besten zu den Virulenzprüfungen weiße Mäuse, Meerschweinchen von 300 bis 400 g und Kaninchen von 1200 bis 1500 g. Die abgeschwächten Vakzine werden bei gleichmäßiger Zimmertemperatur gehalten und auf Nährböden von gleicher Beschaffenheit kultiviert. Eine gute Konservierung ist auch die in zugeschmolzenen Glasröhren oder in Sporenform. Die nötigen Vakzine werden von Fall zu Fall aus den Stammkulturen hergestellt.

Dosierung: Rinder erhalten als erste Injektion 0,25 ccm, Schafe 0,12 ccm Vakzin I subkutan. 12 Tage später erfolgt die zweite Injektion in gleicher Weise mit denselben Dosen von Vakzin II.

Dauer des Impfschutzes: ein Jahr.

Technik eines Impfstoffes aus Bailschen Aggressinen (= Extrakten) siehe unter Schweineseuche.

Aus einer Kombination von abgeschwächten Kulturen und Serum: Nach Sobernheim wird hochwirksames Milzbrandserum und abgeschwächte Milzbrandkultur, die dem Vakzin II Pasteurs entspricht, an verschiedenen Stellen zu gleicher Zeit subkutan injiziert. Statt Bouillonkulturen werden Bazillenemulsionen verabreicht. Von der Stammkultur werden Agarkulturen einen Tag bei 37° gezüchtet und dann noch zwei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. 1 Öse Kultur wird

in 50 ccm Kochsalzlösung (Bazillenenulsion für Rinder und Pferde) oder in 100 ccm (Bazillenenulsion für Schafe) verteilt und möglichst gleichmäßig mit der Flüssigkeit vermischt.

Dosis der Impfstoffe: Rinder 5 ccm Serum und 0,5 ccm der stärker konzentrierten Bazillenaufschwemmung; Kälber 5 ccm Serum und 0,3 bis 0,5 ccm derselben Bazillenenulsion; Pferde 5 ccm Serum und 0,5 ccm derselben Bakterienemulsion; Schafe 4 ccm Serum und 0,25 ccm der schwächeren Bakterienaufschwemmung.

Injektionsstellen: Bei Rindern und Pferden die beiden Halsseiten; bei Schafen die Innenflächen der Hinterschenkel.

Dauer des Impfschutzes: Etwa ein Jahr.

Literatur: Arloing, Compt. rend. de l'Acad. 1886 und 1892. Bail, Zentralbl. f. Bakt. 1904. Chauveau, Compt. rend. l'Acad. 1884. Deutsch, VIII. Intern. Tierärztl. Kongress. Budapest 1905. Koch, Gaffky und Löffler, Mittell. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1881 und 1884. Marxer, Ztschr. f. Immunitätsforsch. 1912. Pasteur, Bull. de l'Acad. de méd. 1880. Pasteur, Chamberland und Roux, Compt. rend. de l'Acad. 1881. Sobernheim, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Derselbe, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Toussaint, Compt. rend. de l'Acad. 1880.

Impfstoff gegen Ozaena.

Der *Coccobacillus foetidus ozaenae* Perez kann durch Temperaturen von 52 bis 60° während dreiviertel bis einer Stunde oder durch Äther abgetötet werden.

Hofer und Kofler stellten einen polyvalenten Impfstoff her, den sie in Dosen von 10 bis 500 Millionen wöchentlich subkutan injizierten.

Literatur: Hofer und Kofler, Wien. klin. Wochenschr. 1913.

Pestimpfstoffe.

Aus abgeschwächten Bazillen: Kolle und Otto konnten durch Züchten der Pestkulturen bei 40 bis 43° Vakzin darstellen. Eine andere Methode der Abschwächung ist die von Hetsch geübte, durch Züchtung in Bouillon mit 0,5 bis 5 Proz. Alkoholzusatz bei 30°. Die Kulturen bleiben etwa drei Wochen im Brutschrank. Man beginnt zunächst die Züchtung in Bouillon mit niedrigem Alkoholzusatz, um allmählich zu immer höherem Alkoholzusatz überzugehen. Es gelang Hetsch zwar nicht, alle Stämme

in dieser Weise abzuschwächen, doch konnte er bei einigen Stämmen die Virulenz so weit herabmindern, daß Meerschweinchen eine halbe Agarkultur vertrugen.

Kolles Methode der Abschwächung besteht darin, daß er die Züchtung von Pestbazillen bei 41 bis 43° mit einem ebenfalls abschwächenden Zusatz von 0,5 bis 5 Proz. Alkohol zu der Bouillon verbindet. In zwei bis drei Monaten konnte er so aus virulenten Kulturen fast avirulente herstellen. Eine Kultur ist dann zur Schutzimpfung für den Menschen brauchbar, wenn die Virulenz so weit herabgedrückt ist, daß zwei Agarkulturen ein Meerschweinchen nicht mehr töten.

Dosierung: Strong wandte bei zum Tode verurteilten Verbrechern Dosen von $\frac{1}{100}$ Öse bis zu einer ganzen Kultur an, ohne daß die Impflinge geschädigt wurden. Im ganzen wurden 42 Personen geimpft. Die in 29 Fällen vorgenommene Prüfung des Serums ergab eine ausgesprochene Schutzwirkung desselben im Tierversuch.

Aus abgetöteten Keimen: Nach den Beobachtungen der deutschen Pestkommission ist außer der Erwärmung während zwei Stunden auf 51° das empfehlenswerteste Verfahren zur Abtötung der Pestbazillen eine einstündige Erhitzung der in Bouillon aufgeschwemmten Agarkultur auf 65°. Die Prüfung auf Sterilität muß außer durch [die Kultur auch durch Tierversuche (Meerschweinchen, Ratten) ausgeführt werden.

Impfstoff nach Haffkine: 1 kg mageres Ziegenfleisch wird, nachdem es von Sehnen und Bindegewebe usw. möglichst befreit ist, durch eine feine Fleischhackmaschine getrieben, mit 125 g Salzsäure übergossen und im Autoklaven bei 3 Atmosphären Druck mehrere Stunden digeriert. Es entsteht eine gleichmäßig dunkle, bernsteingelbe, dicke, öflüssige Masse. Diese wird filtriert und mit so viel Wasser (etwa der siebenfachen Menge) verdünnt, daß ein 1proz. Pepton- bzw. Albumingehalt der Bouillon herauskommt. Darauf Neutralisation mit Kal. carbon., Kochsalzzusatz bis zum physiologischen Kochsalzgehalt und Sterilisation. Der Nährboden wird nun in große Glaskolben von etwa 20 cm Durchmesser gefüllt, so daß bei einer großen Oberfläche eine Schicht von drei bis vier Fingerhöhe entsteht. Durch den Zusatz von einigen Tropfen Olivenöls oder sterilisierten Butterfetts werden die Pestbazillen gezwungen, auf der Oberfläche zu wachsen. Die

Kolben bleiben sechs Wochen bei 25° stehen und werden alle zwei Tage geschüttelt, um immer neues Oberflächenwachstum zu erzielen. Die Kulturen werden nunmehr im Wasserbad bei 65° eine bis mehrere Stunden lang sterilisiert, nach Wiener neuerdings 15 Minuten lang bei 50°, und mit 0,5 Proz. Karbolsäure versetzt. Der Impfstoff wird in Gläschen von 30 ccm abgefüllt.

Dosierung:

Erwachsene Männer	3	bis	3,5 ccm
„ Frauen	2	„	2,5 „
Kinder über 10 Jahre	1	„	„
Jüngere Kinder	0,1	„	0,3 „

Nach acht bis zehn Tagen wird eine zweite Impfung empfohlen.

Impfstoff der Deutschen Pestkommission: Zweitägige vollvirulente Agarkulturen werden in Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und ein bis zwei Stunden auf 65° erwärmt. Sodann erfolgt Zusatz von 0,5 Proz. Karbolsäure. Die Karbolsäure darf erst nach dem Erhitzen der Pestbazillen zugesetzt werden, sonst werden die immunisierenden Substanzen in den Pestbazillen zerstört.

Dosis: Eine Agarkultur.

Kolle empfiehlt noch die Verwendung 2 cm weiter Kulturröhrchen, von Agar von fester Konsistenz und reichliche Befeuchtung bei der Beimpfung. Die Erhitzung auf 65° soll während einer Stunde im Schüttelapparat vorgenommen werden.

Tavel verwendet Agarflaschen, die drei Tage bei 30° bebrütet werden. Abschwemmen mit steriler Bouillon, Sterilisieren im Heißluftschrank während einer Stunde bei 65°. Zur Abschwemmung werden auf je 10 qcm Kulturfläche 3 ccm Bouillon gerechnet (= Dosis für Erwachsene).

Cruz benutzt zur Herstellung seines Impfstoffs ebenfalls Pestagarkulturen, die zu höchster und konstanter Virulenz gebracht sind. Er züchtet auf 4 proz. Glycerinagar, welcher in Rouxschen Flaschen ausgegossen eine Fläche von 220 qcm darbietet. Zur Beimpfung des Agars läßt er Bouillonkulturen über die ganze Oberfläche fließen. Nach zweitägiger Züchtung bei Zimmertemperatur schwemmt er den Rasen mit 16 ccm 0,75 proz. Kochsalzlösung ab und filtriert durch ein engmaschiges steriles Drahtnetz. Darauf Sterilisation bei 65° während einer Stunde.

Er rechnet erst von dem Moment ab, von welchem das Thermometer in einem Kontrollkolben mit gleicher Menge Kochsalzlösung 65° anzeigt. Zum Schluß erfolgt Zusatz von 0,5 Proz. Karbolsäure. Sterilitätsprüfung durch Kultur- und Tierversuch. Die mit der Aufschwemmung intraperitoneal geimpften Tiere dürfen nur durch Intoxikation, nicht durch Infektion, mit Pestbazillen zugrunde gehen.

Um den Impfstoff gleichmäßig zu gewinnen, verfährt er folgendermaßen: Von der gleichmäßigen Aufschwemmung werden 2 ccm genau abgemessen, auf dem Wasserbade eingedampft, einen Tag über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Beträgt das Gewicht des Trockenrückstandes z. B. 80 mg, so besteht diese aus 65 mg Bazillenleibern und, da zur Abschwemmung 0,75proz. Kochsalzlösung verwendet war, 15 mg Kochsalz. 2 ccm soll die Impfdosis betragen. Diese soll ebenso groß sein wie die der Deutschen Pestkommission (= eine zweitägige Pestagarkultur), welche nach der Berechnung von Cruz durchschnittlich 3 mg Bazillenmasse entspricht. Um diese Dosis nun in 2 ccm Aufschwemmung zu erhalten, muß der in oben beschriebener Weise erhaltene Trockenrückstand von 80 mg (65 mg Baz. + 15 mg NaCl) entsprechend verdünnt werden, d. h. man muß ihn mit 41,22 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmen.

Impfstoff nach Calmette. Die Bazillen werden auf dem Agar im Exsikkator getrocknet. Ebenso wird mit dem Filterrückstand von Bouillonkulturen verfahren. Die gewonnene Masse wird gepulvert und in zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt, aus welchen sie leicht abgewogen werden kann.

Aus Extrakten: Impfstoff nach Lustig und Galeotti: Das Nukleoproteid aus Pestbazillen wird in derselben Weise hergestellt wie die Nukleoproteide aus den anderen Bakterien (S. 33).

Dosis: 5 mg werden in 1 ccm schwach alkalisierten Wassers aufgelöst und subkutan injiziert.

Glücksman verwendet zur Herstellung der Nukleoproteide nach der Haffkineschen Methode hergestellte Bouillonkulturen. Nach einmonatlichem Wachstum werden dieselben sterilisiert, mit Ammonsulfat gefällt, der Filterrückstand wird ausgewaschen und in 1proz. Kalilauge gelöst. Die Fällung wird mit 1proz. Essigsäure und einigen Tropfen 5proz. Salzsäure vorgenommen, abfiltriert, bis zur neutralen Reaktion des abfließenden Wassers

ausgewaschen, im Vakuum getrocknet und pulverisiert. Das braune Pulver wird für den Gebrauch in 1 bis 2 proz. steriler Natr. carbonic. calcinat.-Lösung aufgelöst.

Impfstoff nach Terni-Bandi: Meerschweinchen oder Kaninchen werden mit Pestbazillenaufschwemmungen in Bouillon intra-peritoneal geimpft. Gleich nach dem Tode oder noch besser nach Tötung in der Agonie wird das peritoneale Exsudat gesammelt und, wenn es zu dick ist, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Das Exsudat, welches zahlreiche Pestbazillen enthält, wird nach der Prüfung auf Reinheit 12 Stunden bei 37° bebrütet, hierauf zwei Tage nacheinander je zwei Stunden einer Temperatur von 50 bis 52° ausgesetzt. Zum Schluß wird noch eine wässrige Lösung von Karbolsäure 0,5 Proz., Natriumcarbonat 0,25 Proz. und Kochsalz 0,75 Proz., hinzugefügt.

Die Dosis beträgt für den Menschen $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ ccm.

Der Impfstoff nach Hueppe und Kikuchi wird in ähnlicher Weise hergestellt wie der nach Terni-Bandi, nur daß das Exsudat sofort nach Entnahme durch Zentrifugieren von den Bakterien befreit und sterilisiert wird (mehrere Stunden auf höchstens 44°).

Aus einer Kombination von Serum und Bazillen: Methode Shigas: Dreitägige bei 30° gewachsene Agarkulturen werden abgehoben und die Bakterienmasse im Mörser zerrieben. Auf eine Öse Bazillen wird 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt, die Suspension 30 Minuten auf 60° erhitzt, mit 0,5 proz. Karbolsäure versetzt und 24 Stunden stehen gelassen.

Dosierung: Erste Injektion, eine Mischung von diesem Vakzin und Pestserum zu gleichen Teilen, je 0,6 bis 1 ccm; zweite Injektion, nach Ablauf der Reaktion einige Tage später nur Vakzin, 0,6 bis 1 ccm ebenfalls subkutan. Bei Pestepidemien rät Shiga, die Dosis zu steigern und eine dritte Einspritzung folgen zu lassen.

Serovakzin nach Besredka: Zweitägige Pestagarkulturen, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, werden bei 60° während einer Stunde sterilisiert. Die visköse Suspension schichtet man in einem zylindrischen Gefäß durch Einfließenlassen längs den Wänden über ein gut agglutinierendes Pestserum. Nach Ablauf von 12 Stunden sind alle Bakterien zu Boden gesunken, die überstehende klare Flüssigkeit wird abgegossen und der Bodensatz mehrmals mit Kochsalzlösung gewaschen, um die Bakterien gänzlich

von Serum zu befreien. Eine zu lange Berührung der Bazillen mit der Kochsalzlösung schädigt die antigene Wirkung des Impfstoffs. Die Sensibilisierung (beladen mit homologem Serum) und das Auswaschen muß am selben Tage beendet werden. Alle Manipulationen müssen aseptisch ausgeführt werden, doch verträgt der Impfstoff ohne Schaden noch eine Erhitzung auf 56° während einer halben bis einer Stunde.

Dosis: Das Doppelte der Menge des Haffkineschen Impfstoffs wird subkutan schadlos vertragen.

Gosio stellt seinen Impfstoff ebenfalls mittels eines hochwertigen agglutinierenden Serums dar, das Bouillonkulturen zugesetzt wird. Der Bodensatz wird jedoch nicht ausgewaschen. Die Kulturen werden nach einer besonderen Methode in Fernbachflaschen gezüchtet. Die Abtötung der Bakterienmassen geschieht bei 65°. Zur Prüfung der Sterilität macht Gosio einen geringen Zusatz von Kal. tellurosum (1:100 000 bis 1:200 000), der die Entwicklung von Keimen durch Bildung schwarzer Wölkchen, besonders deutlich und schnell bei Hinzufügen von etwas Zucker, anzeigt. Sterile Kulturen verändern den Nährboden nicht. Mit Hilfe der Cruzschen indirekten Abwägung wird für die Gleichmäßigkeit des Impfstoffs gesorgt.

Dosierung: 2 mg.

Impfstoffe aus Toxinen und Endotoxinen siehe unter Pestserum.

Literatur: Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902. Cruz, Centralbl. f. Bakt. 1902. Calmette, X. Intern. Kongreß f. Hyg. u. Demographie. Dieudonné und Otto, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1912. Frosch, Berl. klin. Wochenschr. 1900. Gosio, Ztschr. f. Hyg. 1905. Haffkine, Lancet, 1899. Derselbe, Bull. Inst. Pasteur 1907. Hueppe und Kikuchi, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Kolle, Deutsche Klinik, Bd. II, 1901. Kolle und Hetsch, Die experimentelle Bakt. u. d. Infektionskrankh. 1911. Kolle, Hetsch und Otto, Ztschr. f. Hyg. 1904. Kolle und Otto, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. 1903. Kolle und Strong, Deutsche med. Wochenschr. 1906. Krumbein, Tavel und Glücksmann, Centralbl. f. Bakt. 1901. Lustig und Galeotti, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Markl, Centralbl. f. Bakt. 1898. Derselbe, Wiener med. Wochenschr. 1900. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. 1901. Strong, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1906 u. 1908. Derselbe, Ref. Zentralbl. f. Bakt. 1909 u. 1910. Terni und Bandi, Deutsche med. Wochenschr. 1900. Wassermann und Leuchs, Kraus-Levaditi, Handb. d. Techn. usw. 1908. Wiener, Wiener klin. Wochenschr. 1911.

Impfstoffe gegen Pirosomenerkrankungen.

Die Impfstoffe bestehen bei allen diesen Erkrankungen in Blut oder anderem tierischen Material, welches lebende Piroplasmen enthält.

Kochs Impfstoff bei Küstenfieber besteht in Blut, welches durchseuchten („gesalzenen“) Tieren entnommen ist. Das parasitenhaltige Blut wird in 14-tägigen Intervallen injiziert. Es sind 12 bis 13 Impfungen zu je 10 ccm nötig.

Theiler verwendet als Impfstoff grob zermahlene Milz oder Lymphdrüsen von küstenfieberkranken Rindern in einer Peptonlösung, welcher in Mengen von 5 ccm eingespritzt wird.

Gegen das Texasfieber wird ein Impfstoff, der besonders bei der Hämoglobinurie der Rinder in der norddeutschen Tiefebene Verwendung findet, in folgender Weise bereitet: Ein gesundes kräftiges Kalb wird mit Blut eines durchseuchten Rindes infiziert. Nach drei Monaten wird das Kalb geblutet (aus der Vena jugularis) und das Blut steril defibriniert. Es enthält jetzt den Erreger (*Pirosoma bigeminum*) in geringerer Anzahl als auf der Höhe der Erkrankung und wird in Dosen von 3 ccm den Impflingen subkutan injiziert. Der Impfstoff ist acht Tage lang haltbar. Es sollen nur junge Tiere zur Impfung zugelassen werden, die während der Reaktion (zum Erfolg nötig) mindestens drei Wochen im Stalle bei guter Pflege zu halten sind. Als günstigsten Zeitpunkt der Impfung wählt man die zweite Hälfte des Winters (Kossel, Weber, Schütz und Miessner).

Nach Graffunder ist eine mehrmalige intraperitoneale Injektion nötig (nach der sechsten Lebenswoche 5 ccm Impfstoff, nach drei Monaten 10 ccm, nach weiteren sechs Monaten 15 ccm). Eine weitere Einspritzung von 20 ccm soll im nächsten Winter ausgeführt werden, wenn das Tier auf dem ersten Weidegange nicht erkrankt.

Nach Beobachtungen von Graffunder scheint ein Impfstoff aus verschiedenen Stämmen auch in Deutschland nötig zu sein.

Verwendet man das Blut natürlich durchseuchter Rinder als Impfstoff gegen Texasfieber, so sind die Impfverluste ziemlich groß.

Theiler empfiehlt als Impfstoff für Pferde, Maultiere und Esel, welche in das Pirosomengebiet von Südafrika eingeführt

werden, Eselblut vierter oder höherer Passage, wodurch er Impfverluste vermeidet. Um eine Änderung der Virulenz des Blutes der blutspendenden Esel durch eine neue Infektion durch Zecken auszuschalten, müssen die Tiere im Stalle gehalten werden.

Literatur: Koch, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 1904. Kossel, Weber, Schütz und Miessner, Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt 1904. Miessner, Mitt. d. Kaiser-Wilhelm-Inst. f. Landwirtsch. in Bromberg 1911. Schilling, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1907, und Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Pneumokokkenimpfstoffe.

Die Impfstoffe nach Wright werden aus Pneumokokkenkulturen hergestellt, die bei 60 bis 70° abgetötet wurden.

Levy und Aoki gewannen einen Impfstoff aus 48-stündiger Eierbouillon von Pneumokokken, die sie mit 0,5 Proz. Karbolsäure versetzten und 4 bis 15 Stunden bei 37° stehen ließen.

Dieselben Autoren stellten auch einen Impfstoff aus sensibilisierten Pneumokokken her. 50 ccm zweitägige Eierbouillonkultur werden zwei Stunden zentrifugiert, abgegossen und zum Bodensatz 3 ccm Immunsorum zugegeben. Die Mischung bleibt drei Stunden bei 37° stehen und wird darauf zentrifugiert. Nach Abgießen des Serums und zweimaligem Waschen in der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalzlösung werden die Pneumokokken mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, erhalten einen Zusatz von 0,5 Proz. Karbolsäure und werden 10 bis 12 Stunden bei 37° gehalten.

Dosierung: Mit 10 Millionen Pneumokokken anfangend werden unter allmählicher Steigerung bis zu 60 Millionen injiziert.

Literatur: Levy und Aoki, Ztschr. f. Immunitätsf. 1910. Michaelis, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Reiter, Deutsche med. Wochenschr. 1913.

Pockenimpfstoffe (Pockenlymphe).

Der Erreger der Pocken gehört zu den Virusarten, deren Züchtung bisher noch nicht einwandfrei gelungen ist. Man ist daher gezwungen, die durch das Pockenvirus verursachten Krankheitsherde auf der Haut zur Herstellung eines Impfstoffes zu benutzen, und zwar wird jetzt ausschließlich die durch Kälberpassage erzielte und für den Menschen abgeschwächte Pocke benutzt.

Zur Lymphegewinnung nimmt man am besten junge Rinder von ein bis vier Jahren, weil sie leichter zu füttern sind als Kälber, bei denen häufig Ernährungsstörungen auftreten, die die Pustelentwicklung ungünstig beeinflussen. Man verwendet natürlich nur gesunde Tiere, die vorher einer Tuberkulinprobe unterworfen werden. Die Stallungen müssen allen hygienischen Anforderungen entsprechen. Die Ernährung besteht in gutem Heu oder Gras, bei Saugkälbern in sterilisierter Milch.

Zur Impfung bringt man die Tiere auf besonders konstruierte umlegbare Tische, auf welchen sie so befestigt werden, daß die ganze Bauchgegend gut zugänglich ist. Die Impffläche (die ganze Bauchgegend mit Milchspiegel oder Skrotum) wird gründlich gereinigt, rasiert, mit Seife und lauwarmem Wasser, sowie mit einem Desinfektionsmittel gewaschen, hierauf mit abgekochtem lauwarmem Wasser tüchtig abgespült und mit sterilen Tupfern getrocknet.

Die Impfung wird durch Stich (holländische Methode), nach Pfeiffer als Flächenimpfung oder durch Schnitt ausgeführt. Letztere Methode ist die verbreitetste. Die einzelnen Schnitte werden mit einer Impflanzette nach Chalybäus parallel der Längsachse des Tieres, in einer Länge von etwa 10 cm und in Abständen von 1 bis $2\frac{1}{2}$ cm angelegt. Die Lymphe wird in die seichten Impfritzer, die den Papillarkörper nicht treffen, mittels Spatels eingestrichen, oder aber man taucht vor jedem Strich die Lanzette in Lymphe.

Als Stammlymphe, die von tadelloser Beschaffenheit sein muß, kann zur Impfung der Tiere rein animale Lymphe (originäre Kuhpocke), Variolavakzine (durch Variolation des Rindes erhaltene Pocke), Retrovakzine (Rückimpfung der Kinderpocke auf das Rind) oder Lapine (Kaninchenlymphe) verwendet werden.

Nach der Impfung werden die Tiere zum Schutz gegen Schmutz mit einer Schürze bekleidet, oder sie erhalten nach Paul einen Deckverband aus Tegmin, einer Paste aus Bienenwachs, Gummi arabicum, Glycerin, Wasser und Zinkoxyd, die mit Tafeln von Brunsscher Watte aufgetragen wird, und rasch zu einem zähen, elastischen, leicht abziehbaren Überzug eintrocknet. Man erzielt so von vornherein keimfreie Lymphphen.

Um die Tiere am Belegen der Impffläche zu hindern, werden sie im Stalle in entsprechender Weise angebunden.

Nach der Reifung der Pusteln, etwa am fünften oder sechsten Tage nach der Impfung, bringt man die Tiere zwecks Abimpfung wieder auf den Operationstisch, entfernt den Verband, reinigt die Impffläche mit Seife, warmem Wasser und Tupfern. Darauf spült man mit einer Desinfektionsflüssigkeit (nach Paul mit 2proz. Lysollösung) ab und trocknet. Nach einigen Minuten wird die Desinfektionsflüssigkeit mit abgekochtem, lauwarmem Wasser abgeschwemmt, das Impffeld aber nicht getrocknet, weil das Abschaben der feuchten Pocken leichter ist als der trockensten. Die Impfstoffabnahme geschieht mit einem scharfen Löffel unter starkem Druck rasch und in einem Zuge.

Das Pockenmaterial wird in sterilen, dichtschließenden Glasgefäßen gesammelt, gewogen und mit der drei- bis fünffachen Menge sterilen, wasserhaltigen Glycerins versetzt und gut vermischt. Der glyzerinierte Rohstoff wird nun im Eisschrank aufbewahrt und bei normalem Schlachtbefunde des geimpften Tieres nach einiger Zeit in besonderen Maschinen fein zerrieben (in sogenannten Lymphemühlen). Die Abfüllung in Glasphiolen, die an beiden Enden zugeschmolzen werden, oder in kleine Glaszylinder, deren Verschuß paraffiniert wird, wird am besten mit einem besonderen Abfüllapparat vorgenommen.

Besondere Aufmerksamkeit muß dem Keimgehalt der Lymphe gewidmet werden. Es soll natürlich eine möglichst keimfreie Lymphe zur Verwendung kommen. Nach Paul geschieht dies am zweckmäßigsten durch mehrwöchentliche Ablagerung. Andere Methoden zur Keimbefreiung der Lymphe bestehen in Kerzenfiltration und Zentrifugierung. Bei längerer Aufbewahrung der glyzerinierten Lymphe bei 37° werden zwar die Bakterien rasch abgetötet, aber auch die Wirksamkeit der Lymphe geschädigt. In derselben Weise wirkt die Sterilisierung durch Chloroformdämpfe, Toluol und Ozonisierung. In neuerer Zeit ist von Fornet zur Gewinnung einer keimfreien Lymphe die Behandlung mit Äther und von Friedberger die Bestrahlung mit der Quarzlampe empfohlen worden.

Die Keimzahl der Lymphe wird durch das Plattenverfahren (Agar und Gelatine) bestimmt. Eine Glycerinlymphe, die in 0,01 ccm weniger als 30 Keime enthält, ist als keimarm zu bezeichnen. Die Unschädlichkeit der Keime wird durch subkutane

Injektion der Lymphe an Mäusen und intraperitoneale Injektion an Meerschweinchen erbracht.

Wo die Prüfung der Wirksamkeit der Lymphe am Menschen nicht möglich ist, kann ihre Aktivität auch an Kälbern oder Kaninchen bestimmt werden. Calmette und Guérin benutzen beispielsweise zur Prüfung durch ein feines Tuch gesiebte drei Lymphverdünnungen mit destilliertem Wasser (1:100, 1:500, 1:1000), welche auf die rasierte, unverletzte Rückenhaut eines weißen Kaninchens mit dem Rasiermesser aufgetragen werden. Ruft 1 ccm der Verdünnung 1:100 keine Pusteln hervor, so ist die Lymphe unbrauchbar. Belin vergleicht die Wirkung mit der einer bekannten Lymphe. Gorini prüft die Reinheit und die Virulenz durch die Verimpfung auf die Kaninchenkornea.

Die Impfung beim Menschen geschieht durch drei bis vier am Oberarm ausgeführte, nur die Epidermis durchtrennende, Schnitte. Die Impflanzette wird vor der Schnittführung in die Lymphe eingetaucht, oder diese wird erst nachträglich eingebracht.

Literatur: v. Becker, Handb. d. Vaccinationslehre. Stuttgart 1879. Bohn, Handb. d. Vaccination. Leipzig 1875. Calmette und Guérin, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902. Huguenin, Pocken in Lubarsch und Ostertag, Ergebn. d. allgem. Path. 1899. Fornet, Berl. klin. Wochenschr., 1913. Friedberger, ebenda 1914. Frosch, Bericht der Kommission zur Prüfung der Impfstofffrage. Berlin 1896. Paul, Handb. d. Technik usw., Kraus-Levaditi 1908. Peiper, Die Schutzpockenimpfung und ihre Ausführung. Wien u. Leipzig 1892. Tomarkin und Carrière, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Rauschbrandimpfstoffe.

Aus lebenden vollvirulenten Keimen: Weniger als 10 ccm Muskelsaft von an Rauschbrand gefallenen Tieren wird bei intravenöser oder intratrachealer Einverleibung von Rindern gut getragen. Sie erlangen aber dadurch einen Impfschutz (Arloing, Cornevin und Thomas).

Methode Thomas: Baumwollfäden werden mit Rauschbrandvirus (Fleischsaft) getränkt.

Dosierung: Mittels einer besonderen Impfharpune werden einige getrocknete Fäden unter die Schweifhaut gezogen, um daselbst liegen zu bleiben.

Poels geht in ähnlicher Weise vor. Er taucht Wattebäuschchen in virulente Reinkulturen und trocknet sie. Impfmethode wie beim Thomaschen Impfstoff.

Aus abgeschwächten Erregern: Lyoner Impfstoff. Rauschbrandiges Fleisch wird ausgepreßt, auf flachen Tellern bei 32 bis 40° getrocknet, abgeschabt, mit Wasser angefeuchtet und geteilt. Die eine Hälfte wird im Trockenofen oder Ölbad sechs Stunden auf 100 bis 104° erhitzt = Vakzin I, die andere sechs bis sieben Stunden auf 85 bis 90° = Vakzin II. Diese trockenen Vakzine werden in einer Mühle zur Pulverform zermahlen und in Papierkapseln versandt.

Dosierung: Das Pulver wird vor dem Gebrauch im sterilen Mörser mit sterilem Wasser angerührt und durch Leinwand filtriert. Das Filtrat von 0,01 bis 0,02 g Trockenpulver wird subkutan am Schweif injiziert, zuerst Vakzin I und 10 bis 14 Tage darauf, an einer tieferen Stelle, Vakzin II. Man kann aber auch nur einmal impfen mit Vakzin II.

Der Berner Impfstoff wird nach dem Vorschlag von Kitt und Arloing nicht aus Preßsaft, sondern aus Rauschbrandfleisch bereitet.

Nach Kitt wird das gepulverte Rauschbrandfleisch fünf bis sechs Stunden im strömenden Wasserdampf bei 97° gehalten, nach Nörgaards sechs Stunden bei 93 bis 94°.

Die Dosis beträgt 0,01 bis 0,02 g.

Fleischkulturimpfstoff des Institutes Jenner-Pasteur in Budapest: Fein gehacktes Kalbfleisch wird mit geringen Mengen Bouillon in einem 2 Liter fassenden Kolben übergossen, mit Olivenöl überschichtet und an drei aufeinander folgenden Tagen je drei Stunden bei 60° sterilisiert. Nach Beimpfung dieses Nährbodens mit einem auf 65° erhitzten, angefeuchteten Pulver aus einem rauschbrandigen Meerschweinmuskel bleibt er bis zur Beendigung der Zersetzung bei 37° stehen und wird nach Entfernung des Öls bei 50° durch drei bis vier Tage getrocknet. Das Material wird jetzt während 48 Stunden mit Petroläther entfettet und gepulvert. Aus 1 kg Fleisch erhält man so 300 g solchen „Urstoffes“. Dieser wird darauf zu Vakzin I und II verarbeitet, die als Pulver und als Glycerinemulsion zur Impfung gelangen.

Leclainche und Vallée bereiten einen Impfstoff aus Rauschbrandblut (frischen Kadavern aseptisch entnommen), in welchem

die Rauschbrandbazillen bei 37° in zwei Tagen sporulieren. Das in Glasschalen in drei bis vier Stunden bei 37° getrocknete, sporenhaltige Blut wird sieben Stunden teils auf 102° = Vakzin I, teils auf 92° = Vakzin II erhitzt.

Dieselben Autoren erhielten einen Impfstoff aus Reinkulturen von Rauschbrandbazillen in Martinscher Bouillon, die sie zwei Stunden auf 75 bis 80° erwärmten. Diese abgeschwächte Kultur tötet große Meerschweinchen nicht mehr, wohl aber, wenn sie nur zwei Stunden auf 70° erhitzt wird.

Dosis: 2 ccm subkutan, denen man zweckmäßig eine Dosis vollvirulenter Kultur zur Verlängerung des Impfschutzes folgen läßt.

Kitt füllt fünf- bis achttägige Reinkulturen in Martinscher Bouillon in Glasröhrchen, die, zugeschmolzen, zwei Stunden im Wasserbad bei 70° bleiben. Dieser Impfstoff bleibt lange gebrauchsfähig, im Gegensatz zu einem solchen, den er durch Züchten der Rauschbrandbazillen in einfacher Zuckerbouillon herstellte, worin die Virulenz der Bazillen rasch abnimmt.

Dosis: 2 bis 3 ccm subkutan oder intramuskulär.

Thomas' Fadenimpfstoff wird neuerdings aus durch Froschpassage abgeschwächtem Rauschbrandvirus hergestellt.

Foths Alkoholpräzipitate: Reinkulturen in Peptonleberbouillon mit reichlichem Fleischzusatz sieben Stunden im Wasserbad bei 93° gehalten und mit Alkohol gefällt.

Einen ebenso brauchbaren Impfstoff erhielt er, wenn er keimarme Filtrate (durch hochgeschichtete, gestampfte Fließpapierbreifilter filtriert) mit Alkohol fällt. Beide Niederschläge erzeugten schon nach einmaliger subkutaner Impfung bei Schafen, Rindern und Meerschweinchen einen aktiven Schutz.

Aus einer Kombination von Serum und abgeschwächter Reinkultur: 10, 15 bis 20 ccm Rauschbrandserum wird subkutan verabreicht und vier bis sieben Tage später ein geeignetes Vakzin, dessen Injektion mit Vorteil wiederholt wird (Kitt, Leclainche-Vallée, Arloing). Eine Mischung von Serum und Rauschbrandvirus (Fleischsaft) ist als Impfstoff nicht brauchbar.

Literatur: Arloing, Cornevin und Thomas, *Le charb. sympt. du boeuf*, Paris 1887. Balavoine, *Dissert.*, Bern 1909. Foth, *Ztschr. f. Infektionskr. usw. d. Haustiere*, 1911. Grassberger und Schattentfroh, *Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw.*, 1908. Heide, *Tierärztl. Zentrabl.* 1909. Kitt, *Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg.*

1912. Dasselbst die übrige Literatur dieses Autors. Leclainche und Vallée, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900 u. 1902. Nocard und Leclainche, Les malad. microb. des animaux, 1903. Thomas, La vacc. de la charb. sympt. Repertoire de police sanitaire, 1900.

Rinderpestimpfstoffe.

Kochs Gallenmethode: Der Kochsche Impfstoff besteht aus Galle, welcher den unbekanntem und unzüchtbaren Erreger in voller Virulenz enthält, daneben aber auch Stoffe, die auf den Rinderpesterreger so einwirken, daß er von der Subkutis aus die Tiere nicht mehr krank macht.

Die Galle soll von an Rinderpest erkrankten Tieren entnommen werden, die am fünften bis sechsten Tage seit Beginn des Fiebers getötet oder gestorben sind. Die Galle muß dünnflüssig und von schöner, grünlicher Farbe sein. Die gallespendenden Tiere dürfen an keiner anderen Infektionskrankheit gelitten haben, wovon man sich durch die Sektion überzeugen muß.

Die Galle behält im Eisschranke bis zu 10 Tagen, bei Zimmertemperatur bis zu 3 bis 5 Tagen ihre immunisatorische Kraft.

Dosis: 10 ccm subkutan.

Dauer des Impfschutzes einige Monate bis Jahre.

Kohlstock läßt 10 bis 30 Tage nach der Gallenimpfung eine solche mit virulentem Rinderpestblut folgen.

Der Impfstoff nach Edington ist eine Mischung von Galle mit Glycerin im Verhältnis von 4:1.

Simultanmethode nach Kolle und Turner: Auf der einen Seite wird 0,5 bis 1 ccm Rinderpestblut oder Rinderpest-Schafblut und auf der anderen Seite 10, 20 bis 30 ccm Rinderpestimmunserum gespritzt. Es muß eine solche Menge Immunserum gegeben werden, daß die tödliche Wirkung des virushaltigen Blutes aufgehoben wird, doch sollen wenigstens einige Tiere auf die Impfung noch reagieren.

Statt das Virus zu injizieren, setzen Bordet und Danysz nach der Impfung mit defibriniertem Immunblut (100 ccm) die Tiere der natürlichen Infektion aus.

Literatur: Edington, Reports to the Cape Governement. Knuth, Ztschr. f. Infektionskrankh. usw. d. Haustiere, 1913. Kohlstock, Ref. Zentralbl. f. Bakt., Bd. 22 und deutsche militärärztl. Ztschr. 1898. Koch, Zentralbl. f. Bakt. 1897 u. deutsche med. Wochenschr. 1897. Kolle,

Deutsche med. Wochenschr. 1898 u. Ztschr. f. Hyg. 1899. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Kolle u. Turner, Ztschr. f. Hyg. 1898. Sobernheim, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Theiler, Monatshefte f. Tierheilk. 1901 u. 1904.

Rotzimpfstoffe.

Impfstoff nach Levy, Blumenthal und Marxer: Die „Farase“ wird hergestellt durch Schütteln von Rotzbazillen in einer Konzentration von 1 g Bazillen auf 40 ccm 10proz. Harnstofflösung während 17 Stunden bei Körperwärme. Die nunmehr in schonender Weise abgetöteten Rotzbazillen werden im Vakuum bei niedriger Temperatur zur Trockne verdampft und zu Pulvern verrieben.

Auch durch Schütteln mit 80proz. Glycerin läßt sich ein brauchbarer Impfstoff gewinnen.

Als erste Injektion werden subkutan 100 mg Bazillen gegeben, etwa drei Wochen später erfolgt die Einspritzung von 200 bis 250 mg.

Dauer des Impfschutzes mindestens ein Jahr.

Malleïn wird nach Art des Alt tuberkulins hergestellt, hat keine immunisatorische Wirkung und wird nur zu diagnostischen Zwecken verwandt.

Glycerin-Bouillonkulturen hochvirulenter Rotzbazillen werden nach einmonatlichem Wachstum bei 35° auf 110° erhitzt, im Wasserbade auf $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens eingengt und durch gehärtetes Papier filtriert. Vor dem Gebrauch muß es um das Zehnfache verdünnt werden (Roux).

Das russische Malleïn (Kresling) stellt ebenfalls eine 5proz. Glycerinbouillon-Rotzbazillenkultur dar, welche acht Monate bei 37° gewachsen ist, bei 110° abgetötet und durch Tonkerzen filtriert ist.

Das Mallein Babes wird in der Weise bereitet, daß fünf- bis sechswöchige Kartoffelkulturen $3\frac{1}{2}$ Stunden auf einem Wasserbad von 68° erwärmt, mit Wasser emulsiert und filtriert werden. Der Niederschlag wird mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet.

Malleinum siccum Foth: Fertiges Mallein wird mit Alkohol gefällt und der Niederschlag getrocknet. Auch Tröster stellt in dieser Weise ein trockenes Präparat dar.

Impfdosis des Rouxschen Malleins 0,25 ccm, des russischen 1 ccm, des trockenen 0,05 ccm subkutan. Zur Augenprobe wird das Mallein zweckmäßig mit einem kleinen weichen Pinsel aufgetragen.

Literatur: Babes, Ztschr. f. Hyg. 1892. Bautz und Machodin, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1910. Dediulin, Ztschr. f. Infektionskrankh. usw. d. Haustiere 1911. Foth, Ztschr. f. Veterinärk. 1892 u. Ztschr. f. Tiermed. 1893 u. 1894. Levy, Blumenthal und Marxer, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Dieselben, Ztschr. f. Infektionskr. usw. d. Haustiere 1907. Marxer, 14. Intern. Kongr. f. Hyg. usw. 1907. Derselbe, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1908. Tröster, Zeitschr. f. Veterinärk. 1892, 1895 u. 1896. Wladimiroff, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Ruhrimpfstoffe.

Impfstoffe aus abgetöteten Dysenteriebazillen sind von Shiga und Kruse hergestellt worden. Wegen der schweren Vergiftungserscheinungen hat man die Verwendung dieser Impfstoffe wieder aufgegeben.

Lüdke empfiehlt in neuester Zeit die Herstellung eines Impfstoffes aus Bouillonkulturen, die eine Stunde bei 50 bis 53° erwärmt wurden. Er hat gefunden, daß die Shiga-Kruse-Stämme, besonders aber die Flexner-Bazillen bei diesen Temperaturen abgetötet werden können, ohne daß sie ihre antigene Wirksamkeit verlieren.

Dosierung: Erste Injektion 0,03 ccm und acht Tage später 0,05 ccm subkutan.

Das Serovakzin nach Shiga ist eine Mischung von 0,5 ccm hochwertigem Immunserum und 0,5 ccm vorsichtig abgetöteter (zerriebener) Dysenteriebazillen = 1/2 Öse einer eintägigen Agarkultur. Drei bis vier Tage später wird die doppelte Dosis abgetöteter Ruhrbazillen gleichfalls subkutan injiziert.

Serovakzin Dopter: 0,005 g abgetötete, getrocknete Bazillen werden mit 2 ccm agglutinierendem Ruhrserum verrieben, sedimentiert, gewaschen (durch Zentrifugieren) und in 2 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. 0,2 ccm dieses sensibilisierten Vakzins schützt Mäuse bei subkutaner Anwendung.

Literatur: Shiga, Deutsch. med. Wochenschr. 1901 u. 1903. Dopter, Ann. de l'Inst. Pasteur 1909. Lüdke, Med. Klinik 1914.

Schweinerotlaufimpfstoffe.

Pasteurs Impfstoffe bestehen aus einem Vakzin I (durch Kaninchenpassage abgeschwächte Rotlaufbazillen) und einem Vakzin II (durch Taubenpassage virulenter gemachte Rotlaufbazillen).

Dosierung: 0,125 ccm Vakzin I subkutan, 12 bis 15 Tage später dieselbe Dosis Vakzin II.

Dauer der Schutzimpfung: ein Jahr.

Bei dieser Krankheit wurde zum ersten Mal eine Impfung mit Serum und lebender Kultur ausgeführt, und zwar ist Lorenz der Urheber dieser sogenannten Serovakzination.

Dosierung: pro Kilogramm Körpergewicht erhalten die Schweine auf der einen Seite 1 ccm Serum, auf der anderen 0,25 bis 1 ccm lebende virulente Kultur. Die Injektion der Kultur kann auch drei bis fünf Tage nach der Serumeinverleibung erfolgen. Eine Erhöhung der Immunität wird erzielt, wenn man 12 bis 15 Tage nach der ersten Kulturimpfung eine zweite mit der doppelten Menge folgen läßt. Eine dritte Kulturinjektion vor Ablauf eines Jahres verlängert den Impfschutz um ein Jahr. Schnürer empfiehlt statt einer einheitlichen Kultur die Verwendung modifizierter Kulturen je nach dem Charakter der in einer Gegend auftretenden Seuche, je nach der Rasse und dem Alter der Impflinge.

Dauer der Immunität: nach einer Kulturimpfung fünf Monate, nach zwei ein Jahr.

Der Impfstoff nach Leclainche wird gewonnen durch Mischung von 0,5 ccm lebender Kultur mit 5 bis 10 ccm Serum, unmittelbar vor dem Gebrauche in der Injektionsspritze. Zur zweiten Impfung verwendet er 12 Tage später 0,5 ccm Kultur, ebenfalls subkutan. Das Institut Pasteur in Paris empfiehlt jetzt zuerst nur 10 bis 20 ccm Serum zu injizieren und zur Verlängerung des Impfschutzes 10 Tage nachher die Pasteursche Vakzination anzuschließen.

Nach von Sande kann die Rotlaufkultur durch einen Extrakt aus Rotlaufbazillen ersetzt werden.

Literatur: Deutsch, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 33. Joest, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. Leclainche, Rec. de méd. vétér. 1900. Lorenz, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 13. Derselbe, Ztschr. f. Tiermed. 1895. Derselbe, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1897. Nocard, Rév. vétér. 1902. Preisz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Pasteur und Thuillier, Compt. rend. de l'Acad., Bd. 97. v. Sande, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1910. Schnürer, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1911. Voges und Schütz, Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilk. 1898.

Impfstoffe gegen Schweineseuche.

Kitts Impfstoff besteht aus abgetöteten Schweineseuchebakterien, die 20 Stunden auf 52 bis 55° erwärmt wurden.

Dosierung: Mehrere intravenöse Injektionen in Zwischenräumen von etwa acht Tagen (Kaninchen und Schweine).

Brauchbare Impfstoffe gegen die Schweineseuchebakterien sind noch das Bailsche Aggressin und die Schweineseuchebazillenextrakte nach Wassermann und Citron.

Bails Aggressin: Kaninchen erhalten eine intrapleurale oder intraperitoneale Einspritzung von 5 ccm Bouillon und einigen Tropfen hochvirulenter 1-tägiger Schweineseuchebouillonkultur, so daß sie am nächsten Tage sicher tot sind. Das in der betreffenden serösen Höhle angesammelte Exsudat wird mit einer Pipette oder Spritze steril entnommen, mit 0,5 Proz. Phenol versetzt, bis zur Klarheit zentrifugiert und während drei Stunden genau auf 44° erwärmt.

Die Wirksamkeit des nunmehr sterilen Exsudats kann schon danach beurteilt werden, ob es imstande ist, bei Meerschweinchen eine untertödliche Dosis Schweineseuchekultur zu einer tödlichen zu machen.

Einen ebenso guten Impfstoff gewannen Wassermann und Citron, wenn sie Schweineseuchebakterien mit normalem Kaninchenserum oder destilliertem Wasser extrahierten. Eine 1-tägige gut gewachsene Kultur auf Kollescher Schale wird mit 10 bis 12 ccm Flüssigkeit abgeschwemmt, gegen Licht geschützt ein bis zwei Tage bei Zimmertemperatur geschüttelt, am besten in einem Schüttelapparat. Nach beendigter Extraktion werden die Bakterienaufschwemmungen mit 0,5 Proz. Carbol versetzt, scharf zentrifugiert und durch drei Stunden bei 44° im Wasserbade erhitzt. Sind die Extrakte dadurch noch nicht völlig steril geworden, so kann man sie noch einige Tage unter dem Einfluß des Carbols lassen oder in das Gefäß einige Tropfen Chloroform zugeben.

Dosis: 2 bis 4 ccm bei Kaninchen subkutan, je nach der Giftigkeit des Extraktes.

Burows „Suptol“: Extrakt aus Schweineseuchebakterien, die in Bouillon gezüchtet waren.

Dosierung: Nur zu Heilzwecken 5,0 für Tiere jeder Größe subkutan. Einspritzung wird eventuell wiederholt.

Schreiber verwendet zwei Impfstoffe. Zuerst erhalten die Tiere Immuns Serum und einige Tage darauf auf das Serum genau eingestellte Kultur subkutan.

v. Wassermann und v. Ostertag empfehlen, den Ferkeln bereits am zweiten oder dritten Lebenstage unter die Haut der einen Ohrfalte 4 bis 5 ccm polyvalentes Serum und unmittelbar darauf unter die Haut der anderen Ohrfalte 2 ccm polyvalenten Extrakt zu impfen.

Literatur: Broll, Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere 1908/09. Burow, Berl. tierärztl. Wochenschrift 1907. Citron, Ztschr. f. Hyg., Bd. 52. Citron und Pütz, ebenda, Bd. 56. Hutyra, Klimmer und Wolf-Eisner, Handb. d. Serumtherap. usw. 1911. Kitt, Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 1905. Schreiber, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1899, 1900, 1902 u. 1905. Uhlenhuth und Haendel, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Wassermann, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908. v. Wassermann und Citron, Deutsche med. Wochenschr. 1905. v. Wassermann und v. Ostertag, Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 1903.

Anmerkung: Dieselbe Technik kann angewendet werden zur Gewinnung von Impfstoffen gegen die septische Pneumonie der Kälber, deren Erreger gleichfalls der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie angehören.

Impfstoffe gegen Spirosomenkrankungen.

Marchoux und Salimbeni erhielten einen Impfstoff mit abgetöteten Parasiten durch Erhitzung des spirochätenhaltigen Hühnerblutes während zehn Minuten auf 55°. Ein solcher Impfstoff läßt sich jedoch nur mit den Spirosomen der Hühner in Brasilien, nicht aber mit der afrikanischen Varietät herstellen.

Impfstoff von Aragao de Beaurepaire: Mit Spirosomen infizierte Hühner werden am fünften Tage entblutet. Das massenhaft spirosomenhaltige Blut wird defibriniert, Formalindämpfen ausgesetzt und noch acht Tage unter häufigem Umschütteln aufbewahrt. Der Impfstoff ist ein Jahr lang wirksam. Die Immunität besteht noch 13 Monate nach subkutaner Injektion von 1 ccm.

Schereschewsky gewann einen Impfstoff gegen Syphilis-spirochäten mit in Antiformin gelösten und auf 60° abgetöteten Reinkulturen.

Braun und Teichmann geben an, daß ihr Verfahren der Impfstoffgewinnung gegen Trypanosomen (s. diese) auch gegen Spirosomen, sowie andere Parasiten protozoischer Natur anwendbar ist.

Literatur: Aragao de Beaurepaire, Mem. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1911. Schilling, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Schereschewsky, Deutsche med. Wochenschrift 1913.

Staphylokokkenimpfstoffe.

Die Staphylokokkenimpfstoffe werden in der Regel aus abgetöteten Staphylokokken polyvalent hergestellt, d. h. man verwendet Mischungen der verschiedenen Staphylokokkenarten. Man stellt auch autogene Vakzine her (aus Staphylokokken von dem zu behandelnden Fall).

Die Abtötungstemperatur schwankt zwischen 53 bis 60°.

Neisser gibt folgendes Herstellungsverfahren an: Eine gut gewachsene Agarkultur wird mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Aufschwemmung wird im Schüttelapparat wenigstens zwei Stunden geschüttelt. Die Zählung nach Wright geschieht derart, daß in Wrightschen Kapillaren 1 Tl. Blut, 1 Tl. Natrumzitrat (1,5 proz.) und 1 Tl. Staphylokokkenemulsion aufgesogen werden. Nach guter Durchmischung wird ein dünner Ausstrich angelegt, nach Lufttrocknung mit gesättigter Sublimatlösung fixiert, gut abgespült und mit Mansons Boraxmethylenblau oder Carbolthionin gefärbt. Ausgezählt wird in durch Ehrlichsche Quadratblenden verkleinertem Gesichtsfelde. Es werden etwa 480 bzw. 500 rote Blutkörperchen gezählt (Neisser rechnet 4,8 bzw. 5000 Millionen rote Blutkörperchen auf einen Kubikzentimeter) und danach der Bakteriengehalt bestimmt.

Dosierung: Michaelis beginnt mit der Injektion von 50 Mill. Staphylokokken und steigt in Intervallen von vier bis sechs bis acht Tagen jedesmal um 50 Millionen bis zur Höchstdosis von 500 Millionen. Neisser läßt mit 10 Millionen Bakterien anfangen.

v. Wassermanns Impfstoff „Histopin“: Wässrige Extrakte aus lebenden Staphylokokken werden zur Haltbarmachung mit einer Gelatinelösung und 0,5 Proz. Phenol versetzt.

Das „Histopin“ wird direkt auf die Haut aufgetragen und kann in beliebigen Mengen wochenlang angewandt werden.

Literatur: Michaelis, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Neisser, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1912. Reiter, Deutsche med. Wochenschr. 1913. Strubell, ebenda 1908, 1909 u. 1911. v. Wassermann und Ledermann, Med. Klinik 1911. Wolfsohn, Berl. klin. Wochenschr. 1908, 1909 u. 1912. Wright, Lancet 1902. Derselbe, Studien über Immunisierung usw. Jena 1909.

Marxer, Technik d. Impfstoffe u. Heilsera.

Streptokokkenimpfstoffe.

Impfstoff nach Gabritschewsky: Bei 60° abgetötete Streptokokkenbouillonkulturen (Scharlachstreptokokken) werden mit 0,5 Proz. Carbol versetzt. Darauf werden die Kulturen zentrifugiert, und der Niederschlag wird so verteilt, daß 1 ccm des Impfstoffs 0,02 bis 0,03 ccm der Bakterienmasse enthält.

Dosierung: Kinder von zwei bis zehn Jahren zuerst 0,5 ccm, darauf in Zwischenpausen von sieben bis zehn Tagen noch zwei Impfungen von 0,75 und 1,0 ccm subkutan. Kinder unter zwei Jahren erhalten zweimal weniger, Erwachsene zweimal mehr.

Derselbe Autor stellte ein Drusevakzin in gleicher Weise dar. Die abgetötete Bouillonkultur gießt er in Zylinder zum Absetzen. $\frac{1}{10}$ der ursprünglichen Menge mit dem Niederschlag ist der Impfstoff. 1 ccm Vakzin = 0,1 ccm Bakterienmasse (bei 10-minütigem Zentrifugieren bei 1000 Umdrehungen in der Minute).

Dosierung: Den Pferden wird der Impfstoff in Mengen von 10,15 und 20 ccm in Zwischenräumen von sieben bis zehn Tagen subkutan injiziert.

Der Streptokokkenimpfstoff Wright wird ebenso hergestellt wie desselben Autors Staphylokokkenvakzine u. a. Abtötung bei 60° und Auszählen nach seiner Methode.

Kitts Impfstoff besteht aus bei 53 bis 55° abgetöteten Serumbouillonkulturen.

Der Marxersche Impfstoff ist nach der Methode von Levy, Blumenthal und Marxer gewonnen. Streptokokken werden durch Schütteln in 25proz. Galaktose oder 25proz. Harnstoff bei 37° abgetötet und zu Pulvern verarbeitet. 1 g = 50 mg Streptokokken (feucht abgewogen). Kaninchenversuche.

Weaver und Tunicliff stellten nach derselben Methode einen Impfstoff dar.

Technik eines Impfstoffs aus Drusekokkenextrakten siehe unter Schweineseuche.

Serovakzin nach Levy und Hamm: Eintägige Aszitesglyzerinbouillonkulturen puerperaler Streptokokken werden nach dem Zentrifugieren mit 5 ccm Serum versetzt, geschüttelt und drei Stunden bei 37° gehalten. Durch 0,5 Proz. Carbolsäurezusatz werden die Streptokokken abgetötet (nach zwei Stunden bei 37°).

Darauf Zentrifugieren, öfteres Waschen mit Kochsalzlösung und Aufschwemmung der sensibilisierten Bakterien in 10 ccm Kochsalzlösung. 1 ccm = 50 Millionen Bakterien.

Dosierung: Acht bis zehn Tage vor dem Geburtstermin 1 ccm subkutan. Therapeutisch 0,5 bis 1 ccm, so lange das Fieber dauert, alle zwei Tage (nicht über den zehnten Tag hinaus).

Literatur: Bongert, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Gabritschewsky, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 41. Levy und Hamm, Münch. med. Wochenschr. 1909. Marxer, Ztschr. f. Immunitätsforsch. 1910. Derselbe, Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere 1910. Weaver und Tunicliff, Journ. of infect. diseases 1908.

Impfstoffe gegen Tetanus.

Piorkowski gibt zwei Impfstoffe an. 1. Anaërob angelegte Reinkulturen des Tetanusbazillus, die auf Traubenzuckeragar gezüchtet waren, werden einer Temperatur von 42° ausgesetzt zur Beeinträchtigung der Sporenbildung, dann mehrere Tage fraktioniert bei 60 bis 80° und schließlich bei 110°C erhitzt zur Abtötung der Sporen. Asporogene Rassen eignen sich besonders gut zur Erreichung des Endzweckes. Die Kultur wird darauf getrocknet und gepulvert.

Dosis: 0,05 g Substanz Mäusen in eine Hauttasche gebracht, schützt gegen Infektion mit Gartenerde! auch noch 16 Stunden nach der Infektion. Lösungen des Präparates üben keine Wirkung aus!

2. Anaërob gezüchtete Traubenzuckerbouillonkulturen des Tetanusbazillus werden bei 110° abgetötet und filtriert.

Die subkutane Einverleibung von 0,5 ccm Filtrat ergab bei Mäusen und Meerschweinchen dasselbe Resultat wie beim Impfstoff I.

Literatur: Piorkowski, Münch. med. Wochenschr. 1915.

Impfstoffe gegen Trichophytie.

„Trichon“ Bruck: Zahlreiche Stämme werden auf Fleischbouillon mit 3 Proz. Maltosezusatz geimpft und zwei bis drei Monate bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die gut bewachsene Nährflüssigkeit wird $\frac{1}{4}$ bis 1 Stunde lang geschüttelt und durch Papier filtriert. Die Sterilität des Filtrats wird mittels 4proz. Maltoseagar festgestellt. Zur Konservierung erhält es einen Zusatz von Carbolsäure oder Trikresol.

Stein verwendet zur Herstellung eines Trichophytins auf Sabouraudscher Maltosebouillon gezüchtete Achorion Quincke-anum, welches bald bröckelig zerfällt. Nach drei Monaten werden die Pilzkulturen mit Quarzsand zerrieben, 24 Stunden im Apparat geschüttelt, durch Papier und sodann durch Bakterienkerze filtriert. Das dunkelbraune Filtrat wird mit einigen Tropfen Carbolsäure versetzt.

Stein stellte auch eine Trichophytin-Lanolinsalbe (bis 30 proz.) her, welche einige Wochen haltbar ist und auch prophylaktisch angewandt werden kann.

Bruck und Kusunoki geben der intrakutanen Anwendung den Vorzug vor der subkutanen.

Literatur: Bruck und Kusunoki, Deutsche med. Wochenschr. 1911. Stein, Wiener klin. Wochenschr. 1912.

Impfstoffe gegen Trypanosomenerkrankungen.

Die Idee Kochs, einen Impfstoff gegen die Tsetsekrankheit der Rinder dadurch zu gewinnen, daß man das Trypanosoma brucei durch Passage durch Ratten, graue Mäuse und Hunde abschwächt, ist praktisch nicht verwertbar.

Daß abgetötete Trypanosomen als Antigen wirken können, haben unabhängig voneinander Teichmann und Braun, sowie Schilling gefunden.

Methode von Teichmann und Braun: Trypanosomenhaltiges Rattenblut wird aufgefangen in einer Mischung z. B. von 0,1 ccm rattenblutagglutinierendem Kaninchenimmenserum, 8 ccm Kochsalzlösung und 2 ccm 10 proz. Natriumcitratlösung. Bei Verwendung von agglutinierenden Normalseren nimmt man z. B. 8 ccm Pferdeserum und 2 ccm 10 proz. Natriumzitratlösung. Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit vermehrt sich durch das Blut der Ratte um 3 bis 5 ccm. Hat sich der größte Teil der roten Blutkörperchen abgesetzt, so wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren werden die roten Blutkörperchen zu Boden gerissen, über ihnen setzt sich eine zweite Schicht ab, die aus Trypanosomen besteht. Die über diesen stehende Flüssigkeit wird nun entfernt und die Trypanosomenschicht abgelöst. Nachdem die Trypanosomen in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und gewaschen worden sind, werden sie im Luftstrom bei etwa Zimmertemperatur getrocknet und zu

Pulver zerrieben. Das Pulver wird für den Gebrauch in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zur Aufschließung der Trypanosomenkörper eine Stunde im Schüttelapparat geschüttelt (Patentschrift K. 30h T. 16 534). In einem Zusatzpatent (K. 30h T. 17006) empfehlen die Autoren eine Sterilisierung zur Vermeidung fremder Keime mittels Toluol, das wieder entfernt wird, und den Impfstoff aus einer Mischung genuiner und serumfester Trypanosomenstämme herzustellen.

Aus 30 Ratten läßt sich etwa 1 g Trockensubstanz gewinnen. Zur Immunisierung einer Maus (15 bis 20 g) bedarf es einer Menge von 0,1 g, zur Schutzimpfung eines Kaninchens (1500 bis 2000 g) mindestens 0,15 g Trockensubstanz.

Mit Naganaimpfstoff kann man auch gegen Dourine und Mal de Caderas immunisieren.

Schillingsche Methode: Die Trypanosomen werden durch eine Brechweinsteinlösung (1:400—700) in zwei bis drei Stunden abgetötet und darauf durch Zentrifugieren von der Brechweinsteinlösung getrennt. Die Injektion erfolgt intraperitoneal.

Versuche an Ratten, Mäusen und Pferden.

Literatur: Braun und Teichmann, Deutsche med. Wochenschr. 1912 u. Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. 1912 u. 1914. Koch, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Schilling, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1907. Deutsche med. Wochenschr. 1912 und Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Rondoni und Goretti, Ztschr. f. Immunitätsforsch. 1913. Ziemann, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene, 1914, Beiheft 7, Bd. 18.

Tuberkuloseimpfstoffe.

Aus lebenden Tuberkelbazillen: Als Impfstoffe fanden Verwendung lebende menschliche, Rinder-, Geflügel- und Kaltblütertuberkelbazillen. Friedmann benutzt einen Schildkröten-tuberkelbazillus, der sich von den anderen Kaltblütertuberkelbazillen dadurch unterscheidet, daß er bei 37° gut gedeiht und besonders hohe antigene Eigenschaften besitzen soll. Andererseits hebt gerade Möller für seinen Blindschleichtuberkelbazillens-tamm als Vorteil hervor, daß er bei der Temperatur der Warmblüter rasch abstirbt.

„Bovovakzin“ v. Behring: Der Impfstoff besteht aus einem seit 15 Jahren im Marburger Institut auf Glycerinbouillon fort-

gezüchteten Tuberkelbazillenstamm, der aus menschlicher Lungentuberkulose isoliert wurde.

Römer gibt folgenden Nährboden an, auf dem sich dieser Stamm konstant in seiner Virulenz erhalten hat. Gut zermahlene Pferde- oder Rindfleisch bleibt mit gleichen Teilen Wasser versetzt 12 Stunden in der Kälte stehen, wird darauf bei etwa 100° fünf bis sechs Stunden gekocht und filtriert. Das klare Filtrat erhält nach Verdünnung mit 3 Tln. Wasser einen Zusatz von 2 Proz. Witte-Pepton, 3 Proz. Glycerin und 0,5 Proz. Kochsalz und wird mit Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion (Lackmus) neutralisiert. Der Nährboden wird in $\frac{1}{2}$ -Literkolben im strömenden Dampf von 100° an zwei aufeinander folgenden Tagen je eine Stunde sterilisiert. Die Beimpfung geschieht mit dünnen Häuten junger Bouillonkulturen.

Nach vier- bis sechswöchigem Verweilen im Brutschrank werden die Bazillenhäute auf einer Nutsche abfiltriert, im Vakuum über Schwefelsäure 24 Stunden getrocknet, leicht angerieben, mit Kochsalz vermischt und in Röhrchen zu 5 und 20 Immunisierungseinheiten abgefüllt. Eine Immunisierungseinheit (I.-E.) = 0,004 g trockene Tuberkelbazillen. 1 I.-E. entspricht 0,02 g feuchter Tuberkelbazillen. Das „Bovovakzin“ wird jetzt in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt in Fläschchen zu 5 bis 100 cm abgegeben. 1 cm enthält 1 I.-E. Vor Licht geschützt und im Kühlen ist die Emulsion im verschlossenen Fläschchen 30 Tage haltbar.

Dosierung: Rinder bekommen 5 I.-E. zu Beginn des ersten, zweiten und des dritten Lebensjahres intravenös. Früher wurden zwei Impfungen empfohlen zu 1 und 5 I.-E.

„Tauruman“ (Koch-Schütz-Neufeld-Miessner): 30 bis 40 Tage alte Glycerinbouillonkulturen des Typus humanus werden durch Papier filtriert, und die Bazillenmasse wird so lange mit einem Platinspatel auf Fließpapier ausgepreßt, bis dieses trocken bleibt. Die Emulsion wird mit 0,8proz. Kochsalzlösung unter allmählichem Zusatz im Achatmörser bereitet.

Dosierung: 0,01 bis 0,03 in 10 cm aufgeschwemmt intravenös. Die Impfung soll nur an gesunden Rindern, möglichst im ersten Lebensmonat vorgenommen werden.

Das „Tauruman“ wird im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. staatlich geprüft: 1. auf Virulenz alle drei

Monate an Meerschweinchen und Kaninchen und fortlaufend: 2. auf etwaige fremde Keime und 3. auf Tuberkelbazillengehalt. Letzteres geschieht durch Zentrifugieren unter gleichzeitiger Benutzung einer Standardemulsion.

v. Baumgarten benutzt als Impfstoff für Rinder lebende menschliche Tuberkelbazillen, welche kaninchenvirulent sind.

Dosierung: Subkutan 0,03 g bis 0,01 g trockene Bazillenkultur.

Der Impfstoff Heymans für Rinder besteht in lebenden und virulenten Menschen- und Rindertuberkelbazillen in trockener Form, die in Schilfsäckchen eingeschlossen sind.

Die Impfung geschieht mit einem besonderen Troikart. In der Haut hinter der Schulter wird ein 2 bis 3 cm langer Schnitt gemacht und durch diesen der Troikart mit dem Säckchen, welches in einer Gelatine kapsel eingeschlossen ist, eingeführt. Die Wunde wird mit einer Metallklammer verschlossen.

Sternberg verwendet beim Menschen Rohrsäckchen mit künstlichem Nährboden (Glyzerinbouillon), die mit Tuberkelbazillen besetzt sind. Um ein Austrocknen der Säckchen im Unterhautgewebe zu verhindern, injiziert er drei bis vier Tage nach dem Einnähen des Säckchens in die Umgebung der Nahtstelle, täglich oder jeden zweiten Tag, 3 bis 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Lignières Impfstoff ist eine Aufschwemmung der homogenen Kultur von Arloing-Courmont, die Rindern in Mengen von 0,05 bis 0,1 ccm subkutan eingespritzt wird.

Zwick verimpfte an ein Rind 5 mg menschliche Tuberkelbazillen intravenös und gleichzeitig 50 mg Rindertuberkelbazillen subkutan.

Aus abgeschwächten Bazillen: Klimmers „Antiphy-mato!“ ist ein Impfstoff aus Menschentuberkelbazillen zur Rinderimmunisierung, die durch Erhitzen auf 52 bis 53° bis zu einem Grade abgeschwächt sind, daß sie knapp unter der Grenze der Virulenz für Meerschweinchen stehen.

Impfstoff nach Calmette u. Guérin: Durch zehn Generationen lange Fortzüchtung von Perlsuchtbazillen auf Nährböden, denen Rindergalle zugesetzt war.

Calmette und Guérin schwächten Rindertuberkelbazillen auch durch Erwärmen während fünf Minuten auf 70° ab.

Diesen Impfstoff konnten sie ohne Schaden mit Erfolg Rindern in Dosen von 50 mg und, 45 Tage später, von 250 mg per os verabreichen.

Impfstoffe aus abgetöteten Bazillen: Die Erhitzung der Tuberkelbazillen im feuchten, im Gegensatz zum trockenen, Zustande schädigt in der Regel ihre immunisierenden Fähigkeiten, so daß derartige Impfstoffe unbrauchbar sind. Doch fand Marxer, daß mit Glycerin- und Ölseifenlösungen geschüttelte Tuberkelbazillen eine Stunde auf 70 bis 72° erwärmt werden können, ohne ihre antigene Natur zu verlieren.

1 g Tuberkelbazillen: 50,0 g 80 proz. Glycerin oder 2 proz. Natrium oleinicum werden vier Tage im Schüttelapparat bei 37° geschüttelt, darauf Erhitzung auf 70° (eine Stunde im Wasserbade) und sodann nochmals viertägiges Schütteln bei 37°. Meer-schweinchen- und Ziegenversuche.

Impfstoff nach Löffler: Agarkulturen werden auf Glasplatten ausgestrichen, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einem genau verschließbaren Trockenschranke zwei bis drei Stunden auf 120, $\frac{1}{2}$ Stunde auf 150° oder besser ein bis drei Tage auf 70 bis 72° erhitzt.

Ein Impfstoff, gewonnen aus durch vorsichtiges Trocknen abgetöteten Tuberkelbazillen, ist den Höchster Farbwerken durch Patent geschützt (Patentschr. Nr. 239 560).

Impfstoff nach Levy: Tuberkelbazillen, feucht abgewogen, werden im Verhältnis von 1 mg Bazillen: 1 ccm 80 proz. Glycerin nach zwei Tagen bei 37° abgetötet. Der Impfstoff muß alsbald nach Herstellung verwendet werden, da durch die Berührung mit dem unverdünnten Glycerin eine weitere Abschwächung des Antigens erfolgt.

„Tebean“ nach Levy, Blumenthal und Marxer: Menschliche Tuberkelbazillen werden in einer Konzentration von 0,005 g Bazillen auf 4 ccm 25 proz. Galaktoselösung $4\frac{1}{2}$ bis 5 Tage bei 37° im Schüttelapparat geschüttelt, darauf im Vakuum bei niederen Temperaturen zur Trockne verdampft und zu Pulvern verarbeitet. 1 g Pulver enthält 5 mg Bazillen.

Es wird eine Prüfung auf Sterilität und Unschädlichkeit (am Meerschweinchen) vorgenommen.

Dosierung: Beginnend mit $\frac{1}{200}$ steigt man auf $\frac{1}{175}$, $\frac{1}{150}$, $\frac{1}{125}$, $\frac{1}{100}$ usw. bis zu 2 bis 4 mg Bazillen. Man kann auch mit

Dosen von $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{6}$ mg beginnen, wartet aber dann 8 bis 12 Wochen bis zur Weiterbehandlung. Die Injektionen mit den kleineren Dosen werden wöchentlich ein- bis zweimal wiederholt.

Einen anderen Impfstoff (für Rinder) stellten diese Autoren mittels Harnstofflösungen her. 1 g Tuberkelbazillen (feucht abgewogen) wird in 50 ccm 25 proz. Harnstofflösung $8\frac{1}{2}$ Tage bei 37° geschüttelt und wie die Galaktosebazillen weiter behandelt, so daß ein Pulver resultiert. Verimpfung an Meerschweinchen, Kaninchen und Rinder.

Impfstoff nach Noguchi-Zeuner: Nach Zeuner werden 50 Normaloesen sechswöchiger Glycerinagarkultur in 50 ccm Ölseifenlösung (Natrium oleicum 1:60 destilliertem Wasser) zwei Tage bei 37° geschüttelt, eine Stunde auf 72° erwärmt, $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert, und die abgegossene Flüssigkeit wird darauf durch Kieselgurfilter gegossen.

Später benutzte Zeuner als Impfstoff auch durch siebentägige Einwirkung von ölsaurem Natrium und durch einstündige Erhitzung auf 70 bis 72° abgetötete Tuberkelbazillen.

Das „Molliment“ soll innerlich in Pillenform bzw. in Kapseln oder als Klymsa dargereicht werden.

Technik der Herstellung eines Ölseifentuberkelbazillenpräparates siehe auch oben bei Marxer.

Methode von Moussu und Goupil: Impfstoff aus durch Chlor abgetöteten Tuberkelbazillen.

Ein Verfahren von Calmette besteht darin, die Tuberkelbazillen durch Jodsalze abzutöten.

Rappin empfiehlt einen Impfstoff aus durch Fluornatrium abgetöteten Bazillen.

Impfstoff nach Aronson: 3 g Tuberkelbazillen werden gut zerrieben (nach Trocknung zwischen Fließpapier) und in 100 ccm Trichloräthylen zwei Tage bei 37° geschüttelt. Durch diese Behandlung haben sämtliche Tuberkelbazillen ihre Säurefestigkeit verloren.

Auf gleichem Prinzip beruhen die Impfstoffe von v. Behring, Calmette, Aronson. Die Entwachsung der Tuberkelbazillen wurde hier durch Alkohol-, Äther-, Xylol-, Petrolätherbehandlung und durch ein Ätheralkoholgemisch mit 1 Proz. Salzsäure ausgeführt. Sie ist jedoch nicht so vollständig wie nach der Behandlung mit Trichloräthylen.

Einen anderen Weg, die Wachshülle der Tuberkelbazillen zu zerstören, schlug Metalnikoff ein. Er läßt die Wachshülle durch die Raupe der Bienenmotte oder Wachsschabe vernichten.

Aus Extrakten: Kochs „Alttuberkulin“: Sechs bis acht Wochen alte Kulturen auf 4proz. Glycerinbouillon werden bei 90° im Vakuum auf $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens eingeeengt und durch Tonfilter geschickt.

Das Präparat wird im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. mittels eines Standardtuberkulins auf seine Stärke geprüft. 0,3 bis 0,5 ccm müssen drei bis vier Wochen vorher mit Tuberkulose infizierte Meerschweinchen töten. Gesunde Meerschweinchen vertragen 1 bis 2 ccm. Außer zu diagnostischen Zwecken wird das Alttuberkulin auch therapeutisch angewandt.

Dosierung: Mit kleinen Dosen von $\frac{1}{100}$ mg anfangend wird wöchentlich ein- bis zweimal ungefähr um das Doppelte gestiegen, bis zu Dosen von 500 bis 1000 mg, bei den großen Dosen in Pausen von zehn Tagen bis vier Wochen.

Landmanns „Tuberkulol“: Bouillonkulturen von hoher Virulenz werden durch Papier filtriert, die Bakterien nach event. Entfettung und Zerkleinerung zunächst längere Zeit bei 40° mit einem geeigneten Extraktionsmittel (physiologischer Kochsalzlösung, destilliertem Wasser, verdünntem Glycerin) ausgezogen. Darauf wird dekantiert und der Bodensatz mit neuer Extraktflüssigkeit bei 50° behandelt. In dieser Weise wird bis zu 100° fortgefahren. Die bei den verschiedenen Temperaturen gewonnenen Extrakte werden gemischt und bei 37° im Vakuum eingedampft (0,1 ccm davon tötet meist ein gesundes Meerschweinchen von 250 g). Dieser starke Extrakt wird mit der im Vakuum bei 37° ad maximum konzentrierten und durch Filtration gereinigten Bouillon gemischt. Die Mischung wird zur Sterilisation mehrmals durch Tonkerzen gefiltert, zur Konservierung mit 0,5 Proz. Phenol versetzt und so weit verdünnt, daß 1 ccm die tödliche Dosis für ein Meerschwein von 250 g enthält. Das Präparat kann auch in Trockenform übergeführt werden und ist dann besser haltbar.

Dosierung: Beginn mit kleinsten, nicht temperatursteigernden Dosen von $\frac{1}{200}$ mg, die allmählich in geeigneten Zwischenpausen vergrößert werden.

„Tuberkulin“ Denys: acht Wochen alte Bouillonkulturen von Tuberkelbazillen werden durch Pukallfilter geschickt.

Dosierung: Wie beim Kochschen „Tuberkulin.“

„Tuberkulin“ Béraneek: Filtrate von Tuberkelbazillenkulturen, die auf Kalbfleischglyzerinbouillon ohne Albumosenzusatz gezüchtet wurden, werden mit den Bazillenleibern, nachdem sie bei 60 bis 70° längere Zeit mit einer 1 proz. Orthophosphorsäure geschüttelt worden sind, vereinigt.

Dosierung: Wie bei den anderen Tuberkulinen.

Albumosefreies „Tuberkulin“: Nach Koch werden menschliche Tuberkelbazillen auf albumosefreien Nährböden (Monokaliumphosphat 0,5 Proz., Magnesiumsulfat 0,06 Proz., Magnesiumzitrat 0,25 Proz., Asparagin 0,5 Proz., Glycerin 2 Proz., Soda 0,25 Proz. Lockemann) etwa zwei Monate bei 37° gezüchtet, so daß die Flüssigkeit auf etwa $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Menge abdunstet. Nach mehrmaliger Filtration durch Papier wird bei verschiedenen Temperaturgraden unter Vermeidung höherer Hitze eingedickt. Darauf erfolgt Zusatz von 0,5 Proz. Phenol zur Vernichtung etwa noch vorhandener Tuberkelbazillen.

Löwenstein schlägt folgenden Nährboden vor: Asparagin 6 g, Natriumphosphat 3 g, Kochsalz 5 g, Glycerin 40 g, Wasser 1000 g. Dieser Nährboden wird vor der Beimpfung nicht neutralisiert. Nach zwei bis drei Monaten wird die Kultur im strömenden Dampf sterilisiert und durch Papier filtriert. Die Flüssigkeit wird sodann auf $\frac{1}{4}$ ihres früheren Volumens im Wasserbade eingeengt. Löwenstein und Pick hatten früher Tuberkelbazillen auf einem Nährboden kultiviert, der außer den obigen Bestandteilen noch 6 g milchsaures Ammon enthielt.

„Tuberkulin“ Rosenbach: Auf sechs bis acht Wochen alte Tuberkelbazillenglyzerinbouillonkulturen werden Partikelchen von *Trichophyton holoserium* geimpft. Nach 14 Tagen ist die ganze Kultur von dem Luftmyzel überwuchert. Jetzt wird die Kulturmasse vom Nährboden getrennt, mit einer Glycerincarbonsäurelösung zerrieben, filtriert und wieder mit dem Filtrat vermengt.

„Tuberkulomuzin“ nach Weleminsky wird gewonnen mittels eines Stammes von menschlicher Tuberkulose, der sich durch Bildung eines Muzins in der Glycerinbouillon auszeichnet.

Calmettes „Cl“: Die Bazillen von Glycerinbouillonkulturen des Typus *bovinus* werden durch Zentrifugieren entfernt, die klare Flüssigkeit wird im Vakuum eingeengt und filtriert. Das

Filtrat wird dreimal mit Ätheralkohol umgefällt und der Niederschlag durch Dialyse von den Peptonen und Salzen befreit. Die Lösung wird dann nochmals durch Alkohol gefällt und getrocknet.

Das Präparat ist zehnmal giftiger als das Alttuberkulin.

Das Tuberkulin des Instituts Pasteur in Paris ist mit Alkohol gefälltes Alttuberkulin Kochs, welches als weißes Pulver gewonnen und 1 : 100 verdünnt wird.

Tuberkulin Vallée: Es besteht aus dem Bouillonfiltrat stark toxischer Tuberkelbazillen, dem außerdem die Endotoxine der abfiltrierten Tuberkelbazillen zugesetzt sind, welche durch Zerkümmerung der Bazillen in destilliertem Wasser in Wasserstoffatmosphäre im Dunkeln gewonnen sind.

„Tuberkulozidin“ Klebs: Tuberkulin, welches durch Alkoholfällung und durch Wismut seiner giftigen Komponente beraubt ist. Andere Präparate hat er aus dem ursprünglichen Tuberkulin mittels Fällung durch Platinchlorid und die sog. Alkaloid-Reagenzien gewonnen.

„Endotin“ (Tuberculinum purum) Gabrilowitsch: Durch Behandlung des Alttuberkulins mit Xylol, Äther, Chloroform, Alkohol, nach Dekantieren und Zentrifugieren Behandlung mit heißer Lauge.

„Tuberkulin“ Jessen: Nicht eingeengte Bouillonkultur wird mit Äther und dann mit Chloroform geschüttelt.

Leber und Steinhardt schütteln Alttuberkulin und Chloroform sechs Stunden.

„Oxydtuberkulin“ Hirschfelder: Mit Wasserstoffsperoxyd behandeltes Tuberkulin.

Jacobs „T. J.“: Alttuberkulin und mit Zusatz von Kreosot.

„Arsentuberkulin“ Benario: Aus Tuberkelbazillenkulturen mit Arsenzusatz.

„Eisentuberkulin“ Ditthorn und Schultz: 10 ccm Alttuberkulin werden mit der fünffachen Menge sterilen Wassers verdünnt und mit einer 12proz. Eisenoxydchloridlösung bis zur Fällungsgrenze versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert, gewaschen und in 1proz. Natronlauge gelöst. Die Lösung wird unter Zusatz von 25 Proz. Glycerin zur Konservierung auf 40 ccm aufgefüllt.

„Filtrase“ Häntgens: Lebende Tuberkelbazillen werden in die Filterkerze nach Maassen gebracht und in einem Gefäß

mit sterilem, destilliertem Wasser 14 Tage in den Brutschrank gestellt. Die in das Wasser übertretenden Stoffe stellen sein Präparat dar.

Auch v. Ruck empfiehlt die im Wasser löslichen Teile des Tuberkelbazillus.

„Tulase“ v. Behring: Tuberkelbazillen werden mit Chloralhydrat behandelt. Nach wochenlangem Stehen scheidet sich eine vollständig klare Flüssigkeit von einem wachsähnlichen Rückstand ab. Dieser wird durch sorgfältiges Verreiben mit Wasser in eine gleichmäßige Daueremulsion verwandelt, welche v. Behring nach ihrem milchartigen Aussehen „Tulaselaktin“ nannte.

Der Impfstoff wird subkutan und stomachal verabreicht.

Sciallero gewinnt einen Extrakt durch Behandlung der Tuberkelbazillen mit Ölsäuren.

Ishigamis „Tuberkulo-Toxoidin“: Gut gewaschene und getrocknete Tuberkelbazillen werden zur Zerstörung der Hülle mit starker Schwefelsäure behandelt. Nach Zusatz der zehnfachen Menge Wassers scheiden sich die Fettsubstanzen an der Oberfläche ab. Der Bodensatz wird auf einem Filter gesammelt und in schwachem Alkali gelöst.

„Tuberkulobakterizidin“ von Tatsusaburo Yabé: Bis zur Erschöpfung in der Kälte mit 0,5 bis 1proz. Sodalösung behandelte Tuberkelbazillen werden mehrere Tage mit Schweitzers Reagens extrahiert.

Kochs „T. A.“: Tuberkelbazillen werden in $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge möglichst gleichmäßig verteilt, unter öfterem Umrühren drei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, und sodann wird die über den Bazillenmassen stehende Flüssigkeit durch Filtrierpapier gegossen und neutralisiert.

Extrakte aus Tuberkelbazillen gewannen ferner Deycke und Much mittels Lezithin, Cholin und Neurin (Patentschr. K 30 h, G. 6, Nr. 212350, 227792, 227793, 229969, 234227).

Auch Zeuner verwendet einen Extrakt, den er durch Filtration seiner mittels ölsauerm Natron abgetöteten Tuberkelbazillen (s. oben) gewinnt.

Weitere Impfstoffe aus Extrakten sind Kalle u. Co. unter Nr. 254769, Klasse 30 h, Gruppe 6 mit einem Zusatz (K. 52121) patentiert. Die Extraktion geschieht mit verdünnten Säuren, gegebenenfalls unter Zusatz von Lezithin. Die Rückstände nach

dieser Behandlung können noch weiter mit Alkohol und darauf mit Äther erschöpfend extrahiert werden. Der nunmehr übrig bleibende Rest bildet das Bakterieneiweiß, welches nach dem Trocknen mit schwachem Carbolwasser zu einer feinen Aufschwemmung verarbeitet wird. Alle drei Anteile können, als Teilantigene (MUCH) getrennt, als Impfstoffe verwendet werden.

Zur Herstellung der obigen Tuberkuline sind außer dem Typus humanus und Typus bovinus auch Vogeltuberkulosestämmen, sowie Kaltblütertuberkelbazillen und andere säurefeste Bazillen verwendet worden.

Kochs Tuberkulin „T.R.“: 1g scharf getrockneter Tuberkelbazillen wird in Maschinen so lange zerrieben, bis intakte Tuberkelbazillen nicht mehr nachweisbar sind. Die Pulvermasse wird mit 100 ccm sterilen destillierten Wassers aufgenommen und zentrifugiert. Die erhaltene Flüssigkeit wird als T. O. bezeichnet. Der Niederschlag (T. R. I.) wird von neuem scharf getrocknet, gepulvert und mit Wasser aufgenommen. Beim abermaligen Zentrifugieren erhält man wieder eine Lösung und einen festen Rückstand, welcher getrocknet, verrieben und in Wasser aufgenommen wird. Diese Aufschwemmung wird neuerdings zentrifugiert. Nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung der Prozedur bleiben schließlich keine unlöslichen Rückstände mehr zurück, als zufällige mechanische Verunreinigungen. Alle Lösungen werden vermischt. 1 ccm = 10 mg trockener Tuberkelbazillen. Das Präparat hat einen konservierenden Zusatz von 20 Proz. Glycerin.

Dosierung: Von 0,0002 ccm der Originalflüssigkeit beginnend unter allmählicher Steigerung bis zu 0,5 und 1 ccm.

Kochs „Neutuberkulin“: Glycerinbouillonkulturen werden filtriert, die Kulturmasse wird durch Abpressen zwischen Filtrierpapier von den anhaftenden Bouillonresten befreit, getrocknet und in Kugelmühlen auf das Feinste zermahlen (etwa drei Monate). Das Bazillenpulver wird in 50proz. Glycerinwasser aufgeschwemmt. 1 ccm = 5 mg Tuberkelbazillenpulver.

Diese beiden Präparate bestehen also aus Tuberkelbazillen, die ohne chemische Eingriffe auf rein mechanischem Wege aufgeschlossen wurden.

Dosierung: Subkutane Injektion von 0,0025 mg unter allmählicher Steigerung bis zu 20 mg.

„Tuberkuloplasmin“ Buchner und Hahn: Tuberkelbazillen werden mit Quarzsand verrieben und mit der Buchnersehen Presse unter hohem Druck ausgepreßt.

Der Impfstoff von Macfadyen und Rowland wird aus Tuberkelbazillen gewonnen, die in gefrorenem Zustande zertrümmert wurden.

Aus einer Kombination von Vakzin und Serum¹⁾: Die Methode von Calmette-Guèrin besteht in einer Mischung von Rindertuberkelbazillen, die auf Gallennährböden gewachsen sind, und Serum von Rindern, welche mit derartigen Bazillen intravenös vorbehandelt waren.

Serovakzin nach Bruschettoni: Eine Mischung von Tuberkelbazillen, welche im lebenden Organismus in Kontakt mit lebenden Leukozyten waren, mit Serum²⁾ von Pferden, die mit verschiedenen Tuberkelbazillenpräparaten vorbehandelt waren.

Dosierung: 1 ccm intramuskulär. Die ersten vier bis fünf Injektionen werden in Zwischenräumen von fünf bis sechs Tagen vorgenommen, dann noch fünf bis zehn Impfungen in Intervallen von acht bis zehn Tagen.

Tuberkuloseseravakzin (S. B. E.) nach Meyer und Ruppel: Mischungen von Immuneserum³⁾ und scharf getrockneten Tuberkelbazillen werden nach ein- bis zweitägigem Ver-

¹⁾ Hier einige Worte über die Herstellung der bekanntesten Tuberkulosesera. Das Serum von Maragliano wird von Pferden gewonnen, welche mit wässrigen Extrakten virulenter, abgetöteter Tuberkelbazillen und den Bazillen selbst behandelt worden sind. Das Serum soll bakterizid und antitoxisch wirken. (Berl. klin. Wochenschr. 1896, 1899 u. 1906.)

Marmorek gewinnt sein Serum ebenfalls von Pferden. Zur Behandlung derselben benutzt er ein durch Züchtung von Tuberkelbazillen in Leberbouillon gebildetes starkes Tuberkulosegift. (Berl. klin. Wochenschr. 1903 u. 1907.)

²⁾ Bruschettoni immunisiert die serumspendenden Pferde mit toten und lebenden Tuberkelbazillen, mit Bazillen, welche in Kollodiumsäckchen in der Bauchhöhle immunisierter Tiere waren, mit Bazillensextrakten und außerdem mit einem Toxin, welches aus der Lunge tuberkulisierten Kaninchen gewonnen ist. (Traitement de la Tuberculose, Gènes 1911.)

³⁾ Ruppel und Rickmann behandeln Pferde, Maulesel, Esel und Rinder mit menschlichen und Rindertuberkelbazillen, sowie mit Tuberkulinen intravenös (Ztschr. f. Immunitätsf., Bd. 6).

weilen im Brutschrank bei 37,5° im Schüttelapparat mit Glasperlen so lange geschüttelt, bis keine intakten Tuberkelbazillen mehr nachweisbar sind. Nach scharfem Zentrifugieren wird der Bodensatz mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und sodann mit 40 Proz. Glycerinwasser, mit einem Zusatz von 0,5 Proz. Phenol, fein emulgiert. 1 ccm = 5 mg Bazillen.

Nach einem Patentsatz (Nr. 231 056) lassen sich auch Impfstoffe herstellen durch Sensibilisieren von Tuberkulin und anderen Tuberkelbazillenextrakten.

Dosierung: Wie bei den Tuberkulinen.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1903 u. 1910. v. Baumgarten und Dibbelt, Arb. a. d. pathol. Institut Tübingen 1907 u. 1910. v. Baumgarten und Hegler, ebend. 1905. Bandelier und Röpke, Lehrb. d. spez. Diagnostik u. Therap. d. Tuberkulose. v. Behring, Deutsche Revue 1906; Behringwerks Mitteil., Heft I und II; Berl. klin. Wochenschr. 1903; Deutsche med. Wochenschr. 1904. Béranecq, Révue méd. 1905, 1906 u. 1907. Broll, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1910. Bruschetti, Intern. Medizinkongr., London 1913. Buchner, Münch. med. Wochenschr. 1897. Calmette, Ztschr. f. Immunitätsf., Bd. I; Ann. d. l'Inst. Pasteur 1912. Calmette und Guérin, Compt. rend., T. 149 u. 151; Ann. de l'Inst. Pasteur 1907 u. 1908; Révue vét. 1910. Denys, Le bouillon filtré du bacille de la tuberculose, Paris 1905. Deycke und Much, Münch. med. Wochenschr. 1909; Beiträge zur Klinik d. Tuberk. 1910. Ditthorn und Schultz, Ztschr. f. Immunitätsf. 1909. Dieudonné, Münch. med. Wochenschr. 1903 u. 1904. Ficker, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1912. Friedmann, Berl. klin. Wochenschr. 1912; Dtsch. med. Wochenschr. 1914. Gabilowitsch, Ztschr. f. Tuberkulose, Bd. 13. Häntgens, ebenda, Bd. 9; Tuberkulosis 1909. Heymans, Wiener klin. Wochenschr. 1908; 9. intern. tierärztl. Kongreß 1908. Hirschfelder, Dtsch. med. Wochenschr. 1897. Ishigami, Internation. Kongreß f. Tuberkulose. Washington 1908. Jacobs, Soc. intern. de la Tuberculose, Paris 1906. Jessen, Med. Klinik, Nr. 32; Münch. med. Wochenschr. 1908. Klebs, Wiener med. Wochenschr. 1891; Zentralbl. f. Bakt. 1896. Klemperer, Ztschr. f. klin. Medizin. Bd. 20 u. 41. Klimmer, Schweizer Archiv f. Tierheilk., Bd. 62; Zentralbl. f. Bakt., Ref. Bd. 46; Beitr. zur Klinik d. Tuberkulose usw., Bd. 17. Koch, Dtsch. med. Wochenschr. 1890, 1891, 1897 u. 1901. Koch-Schütz-Neufeld-Miessner, Ztschr. f. Hyg., Bd. 51. Landmann, Hyg. Rundschau 1898, 1900; Zentralbl. f. Bakt., Bd. 27. Leber und Steinhardt, Münch. med. Wochenschr. 1908. Levy, E., Zentralbl. f. Bakt. 1903; Med. Klinik 1905. Levy, Blumenthal und Marxer, Zentralbl. f. Bakt. 1906 u. 1908. Levy und Krencker, Ztschr. f. Immunitätsf., Bd. 4. Lignières, Bull. centr. de méd. vét. 1905 u. 1907; Intern. tierärztl. Kongreß, Budapest 1905. Löffler, Dtsch. med. Wochenschr. 1904 u. 1913. Löwenstein, Kraus-

Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1910; Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Löwenstein und Pick, Biochem. Ztschr. 1911. Macfadyen und Rowland, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 34 u. 35. Marxer, Ztschr. f. Immunitätsf. 1911 u. 1912; Berl. tierärztl. Wochenschr. 1911. Metalnikoff, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 1910. Möller, Verhandl. d. Deutsch. Congr. f. innere Med. 1914. Moussu und Goupil, Compt. rend. 1907; Sem. méd. 1908. Much, Münch. med. Wochenschr. 1910. Noguchi, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 52. Rapin, Compt. rend., T. 67 u. 149. Renon, Le Traitement etc. de la Tuberculose, Paris. Römer, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908 u. 1911. Rosenbach, Dtsch. med. Wochenschr. 1910 u. 1912. v. Ruck, Münch. med. Wochenschr. 1899; Ztschr. f. Tuberculose 1906. Ruppel, Behrings Beitr. z. experim. Ther., Marburg 1910; Über Tuberkulin und andere spezif. Präparate, Berlin 1909. Ruppel und Rickmann, Ztschr. f. Immunitätsf. 1910. Sternberg, Verhandl. d. Deutsch. Congr. f. innere Medizin 1914. Weleminsky, Berl. klin. Wochenschr. 1912. Zeuner, Ztschr. f. Tuberculose, Bd. 15; Zentralbl. f. Bakt., Bd. 50 und 54. Zwick und Titze, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Typhusimpfstoffe.

Aus abgetöteten Bazillen: Methode von Kolle-Pfeiffer: Zehn 24 Stunden bei 37° gewachsene Typhusagarröhrchen vom angenommenen Gehalt von zehn Normalösen (= 2 mg) werden mit 45 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, durch ein steriles Gazefilter in einen Erlenmeyerkolben filtriert, welcher 1½ bis 2 Stunden in einen Brutschrank von 60° gebracht wird. Dann erfolgt Prüfung auf Sterilität und zwecks Konservierung ein Zusatz von 5 ccm 3 proz. Phenollösung. Danach Abfüllen des Impfstoffs in sterile braune Fläschchen von 15 bis 20 ccm, Verschuß mit ausgekochten und carbolisierten Gummipfropfen, mit Stanniolkapsel und Plombe. Sodann eine nochmalige halbstündige Erwärmung auf 60°.

Dosierung: 1 ccm des Impfstoffs = 2 mg Typhusbazillen; davon werden zuerst 0,3, 0,8 und als dritte Injektion 1,0 ccm subkutan gegeben.

Dauer des Impfschutzes: ein Jahr.

Der Wrightsche Impfstoff unterscheidet sich dadurch von dem von Kolle-Pfeiffer, daß zur Züchtung der Typhusbazillen flüssige Nährböden (ein- bis zweitägige Bouillonkulturen) statt fester (Agarkulturen) verwendet werden. Wesentlichere Modifikationen wurden von Leishman und Harrison eingeführt. Sie

benutzten avirulente Kulturen, und die Abtötung erfolgte bei niedrigerer Temperatur (52° während einer Stunde). Russels Impfstoff wird aus Agarkulturen eines avirulenten Bazillenstammes hergestellt, unter Anwendung derselben niedrigen Temperatur wie bei dem von Leishman. Die Zählung erfolgt nach der Wrightschen Zählmethode.

Dosis: Erste Injektion 500 Millionen = $\frac{1}{2}$ ccm. Zweite Injektion 1000 Millionen. Als dritte Injektion wird die letzte Dosis wiederholt. Die Impfungen werden alle sieben bis zehn Tage vorgenommen.

Dauer des Impfschutzes: zwei bis drei Jahre.

Die Herstellung des in Deutschland üblichen Impfstoffes geschieht nach Sachs folgendermaßen: 24-stündige Agarkulturaufschwemmung (mit Kochsalzlösung) wird auf Reinheit geprüft und $1\frac{1}{4}$ bis $1\frac{1}{2}$ Stunden im Wasserbade von 55° gehalten. Prüfung auf Sterilität. Verdünnung, daß 1 ccm = $\frac{1}{3}$ Öse = etwa 1000 Millionen Keime enthält = auf ein Schrägagarröhrchen 30 ccm und auf eine Kollé-Schale 600 ccm. Zur Konservierung wird 0,5 Proz. Phenol oder 0,25 Proz. Trikresol zugesetzt.

Die Dosierung ist dieselbe wie beim Leishmanschen Impfstoff.

Methode von Löffler: Getrocknete pathogene Typhusbakterien werden auf 120 bis 150° erhitzt. Friedberger-Moreschi empfehlen nur auf 120° zu erhitzen.

Dosierung: $\frac{1}{50}$ bis $\frac{1}{4000}$ Normalöse (0,0156 bis 0,000195 mg Bazillenleiber) intravenös.

Fornet stellt seine Vakzine aus eiweißarmen Medien dar. 48-stündige Kultur von Typhusbazillen in Langendorfscher Salzlösung mit 0,5 Proz. Pepton wird 55 Minuten auf 55° erwärmt und gegen Langendorfsche Salzlösung, jedoch ohne Peptonzusatz, dialysiert. Bei täglichem Wechsel der Außenflüssigkeit geht eine beträchtliche Menge des im Nährboden übrig gebliebenen Peptons in die Außenflüssigkeit über, während das spezifische Typhuseiweiß ungeschädigt zurückbleibt.

Die Dosis beträgt am ersten Tage 0,5 ccm, am zweiten Tage 1,0 ccm und 1,5 ccm am dritten Tage subkutan.

Lüdke wandte bei Typhus dasselbe Verfahren wie bei Cholera an; s. dieses.

Impfstoff nach Levy-Blumenthal-Marxer: 10 mg feuchte Typhusbazillen werden in 10 ccm 25proz. Galaktoselösung bei 37°

im Schüttelapparat geschüttelt und im Vakuum bei niederer Temperatur zur Trockne eingedampft.

Zum Impfschutz für Meerschweinchen und Kaninchen genügt die subkutane und die intraperitoneale Einspritzung von 1 bis 4 mg.

Bassenge und Krause schlagen vor, die Typhusbazillen mit Glycerin, Renaud mit ultravioletten Strahlen abzutöten.

Aus Extrakten: Methode von Hahn: Typhusbazillen werden mit Quarzsand gut zerrieben und mittels der hydraulischen Presse gut ausgepreßt. Das erhaltene Typhusplasmin hinterläßt beim Meerschweinchen eine langandauernde Immunität.

Macfadyen und Rowland zermahlen die Bazillenleiber im gefrorenen Zustand bei einer Temperatur von -190° (Temperatur der flüssigen Luft). Siehe auch unter Typhustoxin.

Verfahren von Neisser-Shiga ist unter „Choleraimpfstoffe“ beschrieben. Wassermann läßt die Kulturen statt zwei Tage fünf bei 37° autolysieren und trocknet nach Filtration im Vakuum. Er injiziert von diesem Pulver 0,0017 = etwa 12 mg Kultur.

Methode Brieger-Mayer ist analog der zur Herstellung des Choleraimpfstoffs.

Bergell und Meyer schwimmen zweitägige Massenkulturen mit physiologischer Kochsalzlösung ab, zentrifugieren und waschen den Bodensatz mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung aus. Das Sediment wird im Vakuum bei Temperaturen unter 40° getrocknet und mit wasserfreier Salzsäure, die durch flüssige Luft kondensiert war, behandelt. Das flüssige Gas wird unter Vermeidung von Wasserzutritt verdampft. Darauf Schütteln in Kochsalzlösung und Filtration durch Berkefeldkerzen.

Prüfung an Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Hammeln.

Impfstoff nach Vincent: Lebende 24-stündige Typhusbazillenkulturen werden bei 37° mit physiologischer Kochsalzlösung autolysiert, zentrifugiert und der Abguß wird durch Schütteln mit Äther sterilisiert. Er verwendet zahlreiche (10 bis 12) alte, unvirulente Typhusstämme, denen noch Paratyphus A- und B-Kulturen zugefügt werden (polyvalenter Impfstoff). Vincent empfiehlt vier Injektionen ($\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$ und 2 ccm) in Pausen von acht bis zehn Tagen. Der Impfstoff ist ohne weiteres Konservierungsmittel haltbar. 1 ccm = 400 Millionen Keime.

Serovakzin: Aus sensibilisierten Typhusbazillen hergestellt, wie das Choleraserovakzin (Besredka).

Literatur: Bassenge und Mayer, Deutsche med. Wochenschr. 1905. Bergell und Meyer, Med. Klinik 1906. Besredka, Ann. Pasteur 1904. Brieger, Deutsche med. Wochenschr. 1902. Brieger und Mayer, ebenda 1903. Friedberger und Moreschi, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Dieselben, Deutsche med. Wochenschr. 1906. Friedberger, Kraus-Livaditi, Handb. d. Technik usw. Fornet, Kolle v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Gaffky, Kolle, Hetsch, Kutscher, Klin. Jahrb. 1905. Hahn, Münch. med. Wochenschr. 1897. Harrison, Zit. nach Deutsche militärärztl. Ztschr. 1907. Kraus, Wiener klin. Wochenschr. 1914. Leishman, Zit. nach Deutsche militärärztl. Ztschr. 1907. Levy und Blumenthal, Med. Klinik 1906. Levy, Blumenthal und Marxer, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Löffler, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Macfadyen und Rowland, Zentralbl. f. Bakt. 1903. Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Pfeiffer und Kolle, Ztschr. f. Hyg. 1896. Dieselben, Deutsche med. Wochenschr. 1896. Pfeiffer und Marx, ebenda 1898. Sachs, Med. Klinik 1914. Shiga, Berl. klin. Wochenschr. 1904. Vincent, Journ. of state med. 1912. Derselbe, Sem. méd. 1910. Wassermann, Festschr. z. 60. Geburtstage v. R. Koch. Fischer, Jena 1904. Wright, Antityphusinokulation. Fischer, Jena 1906. Derselbe, Berichte d. Naturforschervers. Köln, 1908. Derselbe, Lancet 1907. Derselbe, Studien über Immunisierung usw. Jena 1909. Wright und Leishman, Brit. med. Journ. 1900.

Anmerkung: Dieselben Methoden können auch Anwendung finden zur Herstellung eines Vakzins gegen Ferkeltyphus, dessen Erreger zur Paratyphusgruppe gehören.

Impfstoff gegen Ulcus molle.

Bruck und Ito empfehlen ein Vakzin aus Ducreyschen Streptobazillen. Die Kolonien, die auf zwei schrägen Kaninchenblutagarröhrchen nach 24 Stunden bei 37° gut gewachsen sind, werden in 1 cm physiologischer Kochsalzlösung fein emulgiert, mit 0,5 Proz. Phenol versetzt und zwei Stunden bei 60° erhitzt.

Die Behandlung geschieht intramuskulär, mit einer Anfangsdosis von 0,5 bis 0,7 cm, auf die eventuell eine höhere Dosis (1 cm) folgt.

Literatur: Tetsuta Ito, Arch. f. Dermat. u. Syph 1913.

B. Heilsera.

I. Allgemeiner Teil.

Allgemeine Technik der Antikörpergewinnung.

Zur Darstellung der Antikörper bedarf es nach unseren bisherigen Erfahrungen unbedingt des lebenden tierischen Organismus. Für die Serumdarstellung im großen kommen Pferde, Esel, Maultiere, Maulesel, Rinder, Ziegen und Schafe in Betracht. Weil am blutreichsten, ist das bei weitem am meisten benutzte Tier zur Erzeugung der Schutz- und Heilsera das Pferd. Auf dieses werde ich mich im folgenden bei Beschreibung der Technik am häufigsten beziehen.

Vor Benutzung der Tiere zur Serumdarstellung müssen dieselben genauestens auf ihren Gesundheitszustand untersucht werden. Vor allem ist darauf zu achten, daß sie nicht an Infektionen leiden, die auf den Menschen übertragbar sind. Krankhafte Zustände an den Knochen und Gelenken sowie Sehnen können sehr unangenehm werden, wenn es sich um Tiere handelt, die zur Gewinnung von Kokkenserum dienen sollen. Diese Stellen bedingen ein schnelles und öfteres Lahmwerden der Pferde. Auf diese Weise kann man gezwungen werden, wochenlang solche Pferde unbenutzt zu lassen. Zur Diphtherieserumdarstellung sind Tiere mit den erwähnten krankhaften Affektionen ohne weiteres brauchbar, ja solche Leiden heilen häufig infolge der Ruhe während der Antikörpergewinnung gänzlich aus.

Bei allen frischen Pferden wird eine diagnostische Untersuchung auf Rotz und Tuberkulose vorgenommen. Die neuangekauften Tiere kommen zunächst in einen Quarantänestall und erst nach etwa sechs bis acht Wochen in den allgemeinen Stand,

wenn eine Ansteckung nicht mehr erfolgen kann. Während der ganzen Behandlungszeit bleiben die Tiere unter ständiger tierärztlicher Kontrolle. Bei gänzlicher Entblutung eines Serumtieres wird die Sektion ausgeführt.

Man nimmt nicht zu junge und nicht zu alte Pferde, am besten im Alter von vier bis acht Jahren. Ich habe auch schon gutes Serum von mehr als 12-jährigen Pferden erhalten. Solche Tiere lassen sich bei der guten Stallhaltung, die ja während der Immunisierung absolut nötig ist, jahrelang zur Entziehung von Serum benutzen. Der besseren Verteilung der subkutanen Injektionsmengen wegen wähle man Pferde von besseren Rassen, die eine feinere leicht verschiebbare Haut besitzen

Als Futtermengen sind durchschnittlich pro Pferd 6 bis 8 kg Hafer und 4 bis 5 kg gutes Heu nötig. Ich habe gute Erfahrungen mit Haferbrot gemacht, das von den Tieren besser ausgenutzt wird, da der Hafer zerquetscht ist und einen Zusatz von Zucker und Salzen hat. Auch Tiere mit schlechtem und unregelmäßigem Gebiß verwerten das Haferbrot besser als gewöhnlichen Hafer. Die Fütterung ist eine bequemere und raschere. Wenn man nicht vorzieht, den Tieren ständig Wasserbehälter zur Verfügung zu stellen, ist eine dreimalige Tränkung nötig.

Bei Reinhaltung der Stallungen ist für eine sorgfältige Säuberung der Tiere selbst zu sorgen. Wöchentlich vier- bis fünfmal sind die Tiere im Freien zu bewegen, oder man läßt sie in einem großen Laufstand etwa zwei bis drei Stunden sich tummeln.

Zur Erzeugung der Antikörper muß man den Tieren die entsprechenden Antigene in Lösung oder Suspension injizieren. Je nach der Art des zu gewinnenden Serums ist die subkutane, intravenöse oder intraperitoneale Einverleibung die erfolgreichste. So wird man zur Darstellung des Diphtherieserums das Diphtherietoxin den Pferden subkutan, zur Gewinnung eines Antistreptokokkenserums die Bakterienemulsion intravenös und zur Herstellung eines Schweinepestserums die Rinder mit dem das Virus enthaltenden Blut intraperitoneal injizieren.

a) Injektionstechnik.

Zum Zwecke der Injektion sind zahlreiche Injektionsapparate konstruiert worden, die in den Katalogen der einschlägigen Instru-

mentenfabriken einzusehen sind. Zur subkutanen und intraperitonealen Einverleibung der Antigene hat sich mir eine 100 ccm fassende Asbestkolbenspritze sehr gut bewährt. Größere Spritzen zu verwenden ist nicht ratsam, weil sie selten längere Zeit dicht halten. Um bei der Injektion durch plötzliches Unruhigwerden und Seitensprünge der Pferde nicht behindert zu werden, die Nadel nicht abzubrechen und den Glaszylinder der Spritze nicht zu zertrümmern, bringt man einen Gummischlauchansatz von etwa 25 bis 30 cm an der Spritze an. Vorn wird eine etwa 8 cm lange Injektionsnadel mittels Bindfaden eingebunden und hinten ein Ansatzstück, das mit einem Hahn versehen ist. Die Injektionsnadel und das Ansatzstück, beide am besten aus nahtlosem Metall, endigen in einer Olive, die im Gummischlauch steckt und bequem durch Bindfaden festzumachen ist. Der Konus des Ansatzstückes ist genau auf den Spritzenansatz eingeschliffen, so daß er bei festem Andrücken gut hält.

Spritze und Schlauch mit eingebundener Injektionsnadel und Ansatzstück werden vor und nach dem Gebrauch in einem mit Deckel versehenen Topf mit so viel Wasser, daß die Spritze bedeckt ist, etwa fünf Minuten lang gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Spritze herausgenommen, das Diphtherietoxin, welches in eine große Doppelschale gegossen wurde, aufgezogen und nun der Gummischlauch mit dem Ansatzstück auf die Spritze gesetzt. Jetzt wird so viel Toxin in den Gummischlauch gepreßt, daß er voll ist, und der Hahn des Ansatzstückes geschlossen, damit der Schlauch gefüllt bleibt. Die Spritze wird sodann wieder gefüllt und der Schlauch wieder auf die Spritze gesetzt. Darauf wird die Nadel in die Subkutis eingestochen, der Hahn des Ansatzstückes geöffnet und die Spritze durch langsamen Druck entleert. Der Hahn des Ansatzstückes wird jetzt wieder geschlossen, und nur die Spritze wird zur neuerlichen Füllung entfernt, ohne daß man die Injektionsnadel herauszieht. Durch Schließen des Hahnes des im Gummischlauch am hinteren Ende eingebundenen Ansatzstückes wird ein Zurückfließen der Flüssigkeit durch den subkutanen Druck verhindert. Man kann so zahlreiche Spritzen injizieren, ohne Toxin zu verlieren.

Um kleinere Flüssigkeitsmengen zu injizieren, benutzt man eine Rekordspritze von etwa 20 ccm Fassungsvermögen, die entweder ganz aus Glas oder deren Kolben aus Metall besteht, der

mit Glyzerin eingefettet ist. Ein Schlauchansatz ist bei solchen kleinen Mengen überflüssig.

Zur Einverleibung von kleineren Flüssigkeitsmengen in die Blutbahn kommt man auch mit der eben erwähnten Glas- oder Rekordspritze aus. Für größere Flüssigkeitsmengen ist folgender Apparat zweckdienlich. Ein Gummischlauch von etwa 40 bis 50 ccm Fassungsvermögen von dem Durchmesser, wie er gewöhnlich an Irrigatoren benutzt wird, wird an einem graduierten Trichter befestigt. Am unteren Ende des Schlauches wird ein Dreiweghahn eingebunden, an dessen einer Seite wieder ein kleiner Schlauch von 10 bis 15 cm Länge angebracht ist. In diesen kleineren Schlauch ist die Injektionsnadel eingebunden, an der ebenso wie an der Nadel zur subkutanen und intraperitonealen Injektion eine Metallscheibe angebracht ist, die ein bequemes Anfassen zum Einstecken der Nadel ermöglicht. In den Trichter mit Schlauchapparat wird nun physiologische Kochsalzlösung gegossen, um den Gummischlauch luftleer zu machen. Das Kochsalzwasser läßt man so lange abfließen, bis die Luft entfernt ist, und gießt dann eventuell so viel frische Lösung nach, daß der Trichter bis zum ersten Strich seiner Graduierung gefüllt ist. Darauf gibt man die zu injizierende Menge in den Trichter zu plus der Menge Kochsalzlösung, die der Schlauch bis zum Dreiweghahn enthält. Der Hahn ist natürlich jetzt so gestellt, daß aus dem Trichter nichts abfließen kann. Die Injektionsnadel wird nun in das gewählte Blutgefäß, beim Pferd in die Vena jugularis externa, eingestochen, so daß Blut abfließt. Durch das nachströmende Blut wird nun bei etwas emporgehaltenem Schlauch die Luft auch aus diesem kleineren Gummischlauch entfernt. Ist das herausfließende Blut nicht mehr mit Luftblasen untermischt, so wird der Hahn des Dreiwegs jetzt so gedreht, daß die Flüssigkeit aus dem Trichter in den kleineren Schlauch und somit in die Blutbahn fließt. Durch Höher- und Niedererheben des Trichters ist man in der Lage, jede beliebige Schnelligkeit des Injektionsstromes zu erzielen. Ist die Flüssigkeit am ersten Strich der Graduierung des Trichters angelangt, so hat man die gewünschte Menge einverleibt, der Hahn des Dreiwegs wird abgedreht und die zurücklaufende Flüssigkeit aus dem kleineren Schlauch in einem Gefäß mit Desinfektionslösung aufgefangen. Um nun beim letzten der zu behandelnden Tiere die Injektionsflüssigkeit, welche sich im Schlauch befindet,

nicht zu verlieren, spült man mit Kochsalzlösung nach. Nach dem Eingießen der Flüssigkeit in den Trichter wird derselbe immer sofort mit der Pergamentkappe wieder bedeckt, mit der er im Trockenschrank sterilisiert war. Der Schlauch mit Injektionsnadel wird durch Kochen in Wasser sterilisiert. Nach dem Gebrauch wird der Trichter, wenn es sich um infektiöses Material handelte, in 5 proz. Carbolsäure- oder 3 proz. Trikresollösung gelegt und der Schlauch wieder ausgekocht.

Die intraperitoneale Injektion geschieht am besten in der sogenannten Hungergrube. Die Gefahr, den Darm anzustechen, wird vermindert, wenn man eine nicht zu scharfe Injektionsnadel benutzt. Die Haut wird verschoben, damit beim Zurückziehen der Nadel eine unverletzte Hautstelle die Einstichstelle in das Peritoneum bedeckt. Bewegt sich die Injektionsnadel oder entweicht Luft aus derselben, so befindet man sich im Darm und muß von neuem einstechen. Man wählt zur intraperitonealen Einverleibung eine etwas längere Injektionsnadel.

Zur subkutanen Einspritzung hebt man mit der linken Hand eine Hautfalte hoch und sticht die Nadel so ein, daß sie im subkutanen Bindegewebe frei beweglich ist. Nach Beendigung der Injektion wird unter Kompression des Stichkanals in der Haut die Nadel herausgezogen. Die Einspritzung soll an einer Stelle vorgenommen werden, die eine leicht abhebbare Haut hat. So kann man an einer Stelle größere Flüssigkeitsmengen injizieren, ohne dem Tiere besondere Schmerzen zu verursachen. Injektionen an Stellen, deren Unterhautzellgewebe nicht sehr locker ist und daher eine Verteilung der Injektionsmengen nicht zuläßt, führen häufig zu Abszedierungen und Nekrose der Haut, die langwierige Geschwüre im Gefolge haben. Die besten Stellen sind die seitlichen Halsflächen beim Pferd, Rind, Schaf und der Ziege; beim Kaninchen und Meerschwein die Bauchflächen und beim Geflügel die lockere Haut über dem Brustmuskel. Durch geeignetes Anbinden kann man die größeren Tiere hindern, sich an den Injektionsstellen zu scheuern. Das Zurückfließen des Injektionsmaterials aus dem Stichkanal wird durch Verschuß mit Jodoformcollodium unmöglich gemacht.

Die intravenöse Injektion wird bei größeren Tieren in die Vena jugularis externa gemacht. Der Kopf des Tieres wird etwas in die Höhe gehalten und die Vene etwas unterhalb der Einstich-

stelle manuell komprimiert. Durch die eintretende Schwellung der Blutader tritt diese nun deutlich hervor. Mit der nicht zu schräg abgeschliffenen Injektionsnadel wird die Haut durchstoßen, worauf man sie in das Lumen der Vene einführt, indem man nicht zu tief schräg nach oben geht, wodurch ein Durchstechen durch die hintere Venenwand vermieden wird. Man läßt etwas Blut abfließen und setzt dann die Spritze an, die jetzt langsam entleert wird. Zu größeren Flüssigkeitsmengen benutzt man den eingangs von mir erwähnten Apparat mit Dreiweghahn. Ausgeschlossen von der intravenösen Einspritzung sind Flüssigkeiten mit größeren Partikelchen wegen der Gefahr des Eintritts von Embolien in den Lungenkapillaren. Im Moment, wo man sich in der Vene befindet, hört natürlich die Kompression des Gefäßes auf, indem man die Hand entfernt. Die Flüssigkeit wird vor der Einspritzung auf Bluttemperatur erwärmt; auch darf die Injektionsgeschwindigkeit eine nicht zu schnelle sein. Bei der nötigen Vorsicht werden Kollapse, die plötzlichen Herzstillstand und Tod zur Folge haben können, völlig vermieden. Es lassen sich Mengen bis zu mehreren Litern in dieser vorsichtigen Weise injizieren.

Eine weitere Injektionsart ist die von Blumenthal zur Diphtherieserumgewinnung eingeführte intrapulmonale. Die Injektionsnadel muß hierzu etwa 12 bis 15 cm lang sein, und der Einstich erfolgt am Vorderrande einer Rippe, weil am hinteren Rande derselben die Blutgefäße verlaufen. Der Einstich darf nicht vor der fünften Rippe geschehen, damit das Herz nicht verletzt werden kann.

Die Stelle, die man zur Einspritzung wählt, wird bei jeder Injektionsart zuvor rasiert, mit Alkohol und dann mit Sublimat oder einem gleichwertigen Desinfiziens abgerieben. Man verhindert so ein Eindringen von Außenkeimen. Bei Injektion von lebenden gefährlichen Bakterien wird der Einstichkanal vor dem Herausziehen der Kanüle mit Sublimatwatte gepreßt, um damit eventuell die Tropfen aus der Kanüle aufzufangen, damit sie nicht auf die Haut und den Boden gelangen. Ein Heraustropfen des Materials wird fast unmöglich, wenn die Spritze mit der Kanüle verbunden bleibt. Auch kann durch Nachspritzen von etwas Luft der letzte Rest aus der Kanüle entfernt werden. Die Operationsstelle wird auch nachher wieder desinfiziert.

b) Sterilisierungstechnik.

Die Sterilisierung geschieht nach den bekannten Vorschriften der bakteriologischen Sterilisationstechnik. Instrumente aus Metall werden in Sodälösung ausgekocht, Glasgegenstände im Trockenschrank auf die nötige Temperatur (z. B. eine halbe Stunde auf 200°) erhitzt, Kautschukwaren im durchströmenden Dampf desinfiziert. Vorher müssen alle Gegenstände gründlichst mechanisch gereinigt werden. Die Sterilisation stößt auf Schwierigkeiten, wenn an einem Tage an zahlreichen Pferden ein Aderlaß vorgenommen werden muß. Trockensterilisatoren von solchem Umfang, daß die entsprechenden großen Glasgefäße auf einmal sterilisiert werden können, garantieren keine gleichmäßige Erhitzung des Materials. Während an einer Stelle die Watte und das Pergamentpapier bereits verkohlt sind, ist an anderen Stellen die nötige Temperatur noch nicht erreicht. Auch dauert die Sterilisierung im großen Trockenschrank unverhältnismäßig lange. So braucht ein Apparat von einem halben Kubikmeter Inhalt zur wirksamen Durchwärmung in vollbesichtigtem Zustande zur Erreichung von 165° im Inneren mehrere Stunden, auch wenn zur Heizung mehrere große Kronenbrenner benutzt werden. Es ist daher zu empfehlen, in größeren Betrieben die Sterilisierung im gesättigten, gespannten Dampf mit nachfolgendem Trocknen im Vakuum vorzunehmen. Von solchen Dampfkesseln kann jede gewünschte Größe benutzt werden. Ein besonders brauchbarer Dampfsterilisator wird von Kretz beschrieben. Bei dieser Sterilisierungsart ist darauf zu achten, daß Glasgegenstände weder mit der Metallwand des Kessels noch untereinander sich unmittelbar berühren. Das Material muß ein besonders gutes sein, es darf nur Glas von hoher Widerstandsfähigkeit und bester Kautschuk aus Paragummi Verwendung finden. Durch zweimalige Kondensation des Dampfes werden in dem von Kretz beschriebenen Sterilisator sämtliche Gegenstände völlig trocken. Der Kessel wird durch langsames Vorwärmen und nachheriges Kondensieren fast luftleer, wodurch die völlige Trocknung bewirkt wird. Die Dauer der Sterilisation ist je nach den zu sterilisierenden Gegenständen verschieden groß. Bei Gegenständen, die einen raschen Temperaturwechsel vertragen, wie Metall, Watte, Papier, kann dieselbe bereits in einer halben Stunde beendet sein. Bei großen Glaszylindern und Glaskolben dauert

die Sterilisierung ungefähr $1\frac{1}{2}$ Stunden, weil das Vorwärmen, Erhitzen, Kondensieren und Abkühlen entsprechend langsamer geschehen muß.

c) Technik der Serumgewinnung (Aderlaßtechnik).

Zur Serumgewinnung müssen den Tieren größere Mengen Blut abgezapft werden. Allgemeine Regeln dafür, ob es zweckmäßiger ist, zahlreiche Aderlässe von mehreren Litern zu machen oder das Tier völlig zu entbluten, nach Herstellung des gewünschten Serumtiters, lassen sich nicht aufstellen. Die Entscheidung hängt ab von den Beziehungen der erzielbaren Einnahmen für das Serum zu den Auslagen für die Unterhaltungskosten des Pferdes. Dies ist individuell verschieden infolge der Variation des Serumwertes während der Weiterbehandlung und überhaupt infolge der notwendigen Vorbehandlungsdauer zur Antikörperbildung beim einzelnen Tier.

Wird die öftere Abnahme von kleineren Serummengen bevorzugt, so macht man die Aderlässe aus der Vena jugularis externa. Das Pferd wird dazu am besten in einen Stand gebracht, der nach Art der Barren, wie sie zum Turnen benutzt werden, konstruiert ist. Die Höhe, in welcher die Querstange angebracht ist, beträgt etwa 110 bis 120 cm, die Breite der Entfernung der senkrechten Balken etwa 80 bis 90 cm. In der Regel wird das Pferd vorwärts hineingeführt. Wollen die Tiere dies nicht, so werden sie rückwärts, wie zum Anspannen in den Einspanner, hineindirigiert. In diesem Stand ist eine Seitwärtsbewegung des Tieres unmöglich. Um ein Entweichen nach hinten zu vermeiden, bringt man am hinteren Ausgang einen Querbalken an, den man durch zwei dort angebrachte Ringe oder Ösen hindurchschiebt. Ein Aufbäumen verhindert man dadurch, daß man zwei Riemen, die an beiden Seiten eines Kummets befestigt sind, an den Querbalken anschnallt. Vorn wird das Pferd von einem Wärter gehalten. Während des Einstiches in das Blutgefäß wird das Pferd durch Aufsetzen einer Bremse, die aus einem Stück Holz mit einer derben Schnur besteht, abgelenkt. Während des Aderlasses kann dann die Bremse meist entfernt werden. Diese Vorrichtung ist manchmal auch bei gewöhnlichen Injektionen nötig, wenn es sich um aufgeregte oder bösartige Tiere, die am besten jedoch gleich bei Beginn der Immunisierung ausgemerzt werden, handelt. Andererseits kann man auch häufig bei Aderlässen den

Operationsbox und jede Knebelvorrichtung entbehren und die Tiere einfach wie zur Injektion mit einer Kette, die an der Wand des Operationsraumes befestigt ist, am Zaum anbinden.

Zum Einstechen in die Vene läßt man den Kopf des Tieres etwas in die Höhe halten und vom Operateur abwenden. Die Vene wird mit der Hand oder mit einer starken Schnur, die geknotet ist, komprimiert, in der Weise, daß der Knoten in die Drosselrinne zu liegen kommt. Die Schnur darf nicht zu stark angespannt sein, weil sonst die Trachea und die andere Jugularis zu sehr gedrückt werden. Bei guter Kompression hebt sich die Vene als fingerdicker Strang von der Haut ab. Der Einstich erfolgt entweder direkt durch die rasierte und gut desinfizierte Haut in die Vene oder nach einem Hautschnitt. Letzteres ist fast nur bei Rindern nötig. Die Aderlaßkanüle ist etwa noch einmal so dick wie die Kanüle zur intravenösen Injektion. Einen Troikart benutze ich nie; auch lasse ich das Blut nie in ein offenes Gefäß laufen. Ich benutze lange zylindrische Gefäße mit 1 bis 2 Liter Inhalt, die mit Watte und Pergamentpapierkappen verschlossen sind. An der Aderlaßkanüle ist ein mit einem Glasrohr versehener Gummischlauch befestigt, welcher mit der Glasröhre dicht an der Wand des Gefäßes, um ein Schäumen des Blutes zu verhindern, in den Glaszylinder gesteckt wird. Die Pergamentpapierkappe ist vorher entfernt und der Wattestopfen so viel gehoben worden, daß man gerade mit dem Glasrohr hindurchkommt. Ist eine Röhre mit Blut gefüllt, so wird der Gummischlauch komprimiert und die Glasröhre desselben wieder in ein anderes Blutrohr gesteckt. Läßt der Blutstrom während des Aderlasses nach, so macht man das Pferd Kaubewegungen ausführen, indem man ihm Rübenschnitzel oder Hafer vorhält. Auch die Lockerung der Venenstrangulation führt manchmal zum Ziel.

Eine Blutstillung nach Abnahme des gewünschten Quantums ist meist unschwer zu erreichen, indem nach einem ruckweisen Herausziehen der Kanüle die komprimierende Hand oder Schnur entfernt wird. Dadurch hört fast immer infolge des negativen Druckes in der Vena jugularis beim stehenden Pferde jede Blutung auf. Zur Vermeidung des Reibens wird das Pferd darauf mehrere Stunden hochgebunden, und die Wunde ist inzwischen verklebt und gut verschlossen. Das Nähen der Wunden hinterläßt leicht Narben, die bei einer öfteren Punktion unangenehm werden.

Ohne Schädigung des Tieres können bei einem Aderlaß ungefähr 6 Liter Blut entnommen werden. Es gibt Tiere, die über 50 solcher Aderlässe aushalten. Entnimmt man größere Mengen, 8 bis 10 Liter pro Aderlaß, so wird die Zahl der möglichen Blutabzapfungen beträchtlich kleiner. Schon nach 10 bis 15 Aderlässen stellen sich dann Zeichen von Anämie ein.

Die völlige Entblutung eines Tieres nehme ich stets aus der Carotis vor. Zu diesem Zwecke muß das Pferd mit den üblichen Vorrichtungen gelegt werden. Nach Durchschneiden der Haut wird soviel wie möglich stumpf präpariert, alle eventuellen Blutungen durch Unterbindung gestillt und die Kanüle, die hierzu am besten stumpf ist, in die Carotis eingebunden. Gegen Ende der Entblutung wird das Tier hochgewunden, damit es besser ausblutet. Blutdrucksteigernde Mittel zwecks besserer Entblutung haben sich mir nicht bewährt. Bei dieser Art der Blutgewinnung erhält man ungefähr das $2\frac{1}{2}$ - bis 3-fache eines einzelnen größeren Aderlasses.

Benötigt man nur eine kleine Menge Serum zum Austitrieren des Antikörpergehalts eines Tieres, so macht man entweder mit einer dünnen Kanüle einen Aderlaß aus der Vena jugularis oder noch praktischer: man fängt die kleine Blutmenge von einigen Kubikzentimetern an einer Stelle auf, wo man durch Schnitt oder Stich in die rasierte und desinfizierte Haut eine Hautvene trifft. Durch geringe Kompression ist die Blutung schnell gestillt.

Zur Serumabscheidung werden die mit Blut gefüllten Röhren verschiedentlich behandelt. Die einfachste Art ist das Stehenlassen der Blutröhren in einem Raume von 10 bis 25° während 36 bis 48 Stunden. In dieser Zeit ist die Retraktion des Blutkuchens vollendet, und über dem Gerinnsel steht das bernsteingelbe, klare Serum. Die Menge des erhaltenen Serums ist eine verschiedene. Sie hängt nicht nur ab vom einzelnen Individuum, sondern auch vom Zustand, in welchem sich zur Zeit der Blutentnahme das betreffende Tier befand. Nicht peinlichst gesäuberte Röhren können ebenfalls eine Verminderung der Serummenge bedingen. Die Temperatur ist nicht gleichgültig, solche unter 10° hemmt die Gerinnung und es kommt zu einer Innenabscheidung, die nur etwa $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{6}$, ja ausnahmsweise $\frac{1}{20}$ des Gesamtvolumens des Blutes entspricht. Bei günstigster Abscheidung setzt sich die Hälfte des entnommenen Blutes als Serum ab. Infolge dieser wechselnden Abscheidung hat es nicht an Versuchen

gefehlt, durch bestimmte Manipulationen die Ausbeute des Serums zu steigern.

Im Institut Pasteur zu Paris benutzt man Blutbehälter von etwa 2,5 Liter Inhalt, die mit Metalldeckel abgeschlossen sind. Durch die Öffnung des Metalldeckels ist eine Drahtschlinge gezogen, die eine Metallplatte mit Zacken am unteren Ende direkt unter dem Verschußdeckel festhält. Vier Stunden nach der Blutentnahme, wenn alles Blut sicher geronnen ist, wird die mittels Bolzens befestigte Drahtschlinge mit einer Flamme sterilisiert und der Bolzen entfernt, so daß jetzt die schwere Metallplatte auf das Coagulum drückt und nicht unerhebliche Mengen Serum daraus auspreßt. Die Blutbehälter werden nun bis nach Abschluß der Prüfung des Serums bei einer konstanten Temperatur von 7° gehalten.

Auf demselben Prinzip beruht eine im Wiener Seruminstitut gebräuchliche Methode. Statt der im Pasteurinstitut üblichen Beschwerung mit einer Metallplatte werden hier sechseckige Zinnklötze, die in derselben Weise am Metalldeckel der Glasröhre befestigt sind, angewandt. Zum Niederhalten des Gerinnsels sind die Klötze aus reinem Zinn mit drei Haken versehen. Etwa drei Stunden nach der Blutentnahme werden die Zinnklötze in die Röhren versenkt. Es soll ziemlich konstant die Ausbeute des Serums zwei Fünftel der Blutmenge betragen.

Nach Vollendung der Serumabscheidung wird jetzt das Serum in größeren Flaschen gesammelt. Das Abheben des Serums geschieht mittels eines Glashebers, dessen einer Schenkel eine seitliche Einströmöffnung und ein rundes, abgeschlossenes Ende besitzt, während der andere durch einen etwa 60 cm langen Kautschukschlauch mit gläsernem Ausströmrohr gebildet wird. Das längere Glasrohr wird nach Abnahme des Verschlusses der einzelnen Blutröhren längs der Wand derselben bis zum untersten Ende der Flüssigkeit vorgeschoben und der Heber durch Ausquetschen der Luft aus dem Schlauch in Gang gebracht und durch entsprechend tiefe Stellung der Sammelflasche im Fließen gehalten. Läßt man den Fallschenkel durch Abklemmen mit der Hand nie auslaufen, so kann man ohne neuerliches Ausquetschen der Luft eine beliebige Anzahl Blutzylinder weiter aussaugen. Werden die Blutgefäße nochmals zwei Tage stehen gelassen, so erhält man noch etwa 5 bis 8 Proz. des Serums der ersten Ausbeute, das

dann von neuem in derselben Weise gesammelt wird. Diese letztere Ausbeute ist meist rötlich gefärbt, aber sonst gutes Serum. Auch ein langsames Auslaufen beim Aderlaß kann eine rötliche Färbung des Serums veranlassen. Hervorgerufen durch Erkrankungen der Leber, nimmt das Serum ab und zu außer der rötlichen eine gelbliche Farbe an, die durch Kerzenfiltration sich entfernen läßt. Gerinnenlassen unter 7° führt ebenfalls zu einer Rötlichfärbung des Serums; dieselbe unerwünschte stärkere Färbung tritt auch bei Temperaturen über 25° leicht ein.

Die bessere Ausbeute des Blutkoagulums durch Ausschleudern in einer Zentrifuge ist im großen sehr schwierig völlig steril auszuführen.

Das Serum in den Sammelflaschen wird zweckmäßig unter möglichstem Luft- und Lichtabschluß im Eisschrank aufbewahrt. Die Flaschen sind mit gut schließenden sterilen Gummistopfen verschlossen und möglichst ganz gefüllt. Der Gummistopfen wird mit carbolisiertem oder sublimatisiertem Pergamentpapier überbunden, um ein Eindringen der Luftkeime auszuschließen, da ein nicht steriles Serum schnell verdirbt. Ein nachheriges Sterilisieren ist nur durch Kerzenfiltration möglich, da solche Mengen von Antiseptics, wie sie zum Abtöten von allen Keimen nötig wären, eine beträchtliche Schädigung, ja völlige Vernichtung der Antikörper bedingen würden. Sporenlose Keime werden allerdings bald durch einen Zusatz von 0,5 Proz. Carbolsäure oder 0,4 Proz. Trikresol abgetötet. Aus diesem Grunde werden die Sera von vornherein vielfach mit 0,5 Proz. Carbolsäurezusatz oder dem dreimal ungiftigeren Trikresol in Mengen von 0,4 Proz. konserviert.

Ein weiteres Konservierungsverfahren ist noch das Eintrocknen des Serums im Vakuum. Diese Methode ist die zur Konservierung der Testsera übliche und von P. Ehrlich zuerst eingeführte und zugleich vollkommenste. Nach P. Ehrlich werden die nativen, zusatzfreien Sera in abgemessenen Mengen in die Serumröhrchen übertragen und im Exsikkator über Nacht vortrocknet. Danach wird das Röhrchen an ein phosphorsäureanhydridhaltiges Kölbchen angeschmolzen. Mittels einer Quecksilberluftpumpe wird nun bei Zimmertemperatur evakuiert. Dadurch wird der im Trockenserum bis zu 10 Proz. befindliche Wasserrest sowie der Sauerstoff entfernt. Nach Abschmelzen verbleiben die

Röhrchen noch eine Zeit unter dem Einfluß des Phosphorsäureanhydrids, bis dieses Feuchtigkeit nicht mehr aufnimmt (das durch Klopfen aufgeschüttelte Anhydrid bleibt dann unverändert). Ist dieser Zeitpunkt erreicht, so wird das Serumröhrchen abgeschmolzen und im Dunkeln und Kühlen aufbewahrt.

Die Eintrocknung im großen erfolgt in einem großen Vakuumapparat in flachen, sterilen Schalen auf heizbaren Platten, wie sie zum Verdampfen von Flüssigkeit technisch verwendet werden. Das Serum wird in millimeterdünner Schicht ausgegossen und zunächst bei einer Temperatur von 27 bis 30°, zum Schluß 35° bei hohem Vakuum in etwa zehn bis zwölf Stunden eingetrocknet. Es stellt jetzt eine hornartig glänzende, spröde, gelblich-rötliche Masse dar. Nach dem Abkratzen und Zerreiben in sterilem Mörser resultiert ein gelbliches Pulver, das sich ziemlich leicht in Wasser löst und mit der dem ursprünglichen Quantum entsprechenden Menge Wasser verdünnt wieder das gewöhnliche Serum darstellt. Der Vorteil der Konservierungsmethode durch Trocknen besteht darin, daß das Serum leicht und sicher ohne antiseptischen Zusatz steril gehalten werden kann und daß die Antikörper selbst durch Temperaturen bis zu 40° und darüber nicht geschädigt werden. Für die Verwendung der Sera in den Tropen oder unter sonstigen Bedingungen, die eine größere Haltbarkeit nötig erscheinen lassen, ist diese Methode deshalb die beste.

Das Serum in den Sammelflaschen, mit und ohne konservierenden Zusatz, setzt in einigen Tagen eine wechselnde Menge roter Blutkörperchen ab, die beim Abhebern aus den Blutzylindern durch Beschädigung des Koagulums mitgerissen werden. Durch Absaugen in neue Flaschen wird das Serum von diesen Bestandteilen befreit und wird nunmehr auf Sterilität und seinen Antikörpergehalt geprüft. Die Prüfung auf den Antikörpergehalt siehe unter den einzelnen Kapiteln. Die Prüfung auf Sterilität wird in der üblichen Weise auf Aërobier und Anaërobier ausgedehnt. Besser ist es, das Serum jetzt noch nicht abzugeben, sondern noch längere Zeit bei Eisschranktemperatur (6 bis 8°) lagern zu lassen. Es bildet sich dann ein weißlicher, an den Wänden haftender oder am Boden liegender Niederschlag, öfter auch eine dünnere oder dickere, im wesentlichen aus Cholestearin bestehende Haut. Nach diesen Abscheidungen bleibt das Serum meist jahrelang klar und in dünner Schicht von lichter, gelber Farbe.

Zum Abfüllen des Serums sind die verschiedensten Apparate in Gebrauch. Der einfachste ist eine graduierte Bürette nach Art der Titrierbüretten mit Nachfüllrohr, wie sie in den chemischen Laboratorien im Gebrauch sind.

Eine andere Methode zur Abfüllung kleiner Flüssigkeitsmengen ist von Kern¹⁾ beschrieben worden. Der Apparat ist ganz aus Glas, also gut sterilisierbar, und funktioniert automatisch. Er besteht aus einer Bürette mit Dreiweghahn, deren Füllhöhe durch einen Schwimmer aus Glas reguliert ist. Nach einmaligem Ansaugen und Abfüllen des angesaugten Quantums füllt sich das Volumen durch andere Stellung des Dreiweghahns aus einem mit diesem in Verbindung stehenden Serumbehälter ganz von selbst. Diese Zeit kann dazu benutzt werden, die Ampullen zuzuschmelzen oder die Fläschchen zu verkorken. Eine Person kann so bequem allein abfüllen. Der Apparat ist vielfach im Gebrauch.

Ein ebenso praktischer Apparat ist im Pasteurinstitut in Benutzung. Er besteht aus einer größeren Flasche für das Serum, deren obere Öffnung mit einem Wattestopfen verschlossen ist. Unten befindet sich eine seitliche Öffnung mit abgelenktem Glasrohransatz, der durch einen Gummischlauch mit einem Meßzylinder in Verbindung steht. Vom unteren Ende dieses Zylinders setzt sich ein zweites rechtwinkelig abgelenktes Glasrohr fort, dessen freie Öffnung kapselartig erweitert ist. Die Verbindungsschläuche zwischen dem Meßzylinder einerseits, dem Reservoir und dem Abflußrohr andererseits tragen je einen Quetschhahn. Ein Druck auf ein Pedal öffnet das zuführende Rohr und schließt den Abfluß; ein Nachlassen des Druckes verschließt das zuführende Rohr und läßt den Meßzylinder ausfließen. Die im Meßzylinder abgemessene Menge füllt nun das Fläschchen, welches, in die Glaskappe eingestülpt, in Verbindung mit der Ausflußöffnung gebracht war.

Bezüglich der Sterilisierung gilt natürlich das unter Sterilisierungstechnik Gesagte.

Am besten geschieht die Abfüllung in Ampullen, die zugeschmolzen werden können. Werden Fläschchen benutzt, so erfolgt der Verschuß mittels Gummistopfen, die leichter zu sterilisieren sind als Korkstopfen. Bei Verwendung letzterer ist darauf zu achten, daß sie eine glatte Fläche besitzen, die in die Flaschen-

¹⁾ Zentralbl. f. Bakt. **25**, 75 (1899).

öffnung gesteckt wird. Die verkorkten Fläschchen werden mit einer dicht schließenden Gummikappe überzogen oder mit sublimatisiertem Pergamentpapier gut überbunden.

Trotz aller aseptischen Kautelen bei der Blutentnahme und Weiterverarbeitung des Serums ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß das eine oder andere Fläschchen nicht völlig keimfrei ist. Daher empfiehlt es sich, das Serum ohne Zusatz nach Abfüllen in kleineren Mengen nochmals eine Stunde in das Wasserbad von 56 bis 60° zu bringen.

Das Trockenserum wird abgeteilt und in Ampullen gebracht, die dann zugeschmolzen werden.

Die Fläschchen oder Ampullen werden jetzt mit Etiketts versehen, die den Inhalt und die Fabrikationsstätte angeben, und sind versandfertig.

Zusammenfassende Literaturübersichten: Heller und Krumbein, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Kretz, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. für Immunitätsforschung 2 (1909). Levaditi, ebenda. Madsen, ebenda.

Chemisch-physikalische Eigenschaften der Antikörper.

Über das Wesen der Antikörper ist nur wenig bekannt. Eine Eigenschaft, die allen Antikörpern eigen ist, gab Veranlassung, diese große Gruppe unter einem Namen zusammenzufassen, sie sind nämlich alle streng spezifisch, d. h. sie wirken nur auf das Antigen, durch welches sie verursacht wurden. In dieser Spezifität ihrer Reaktion liegt gleichzeitig ihr wichtigstes Unterscheidungsmerkmal. Je nach der Herkunft des Antigens teilen wir die Antikörper ein in solche bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Ursprungs. Das Unterscheidungsmerkmal jedoch, das uns hier am meisten interessiert, ist bedingt durch die Art der Reaktion der Antikörper mit dem Antigen. Wir trennen die Antikörper z. B. in Antitoxine, das sind Seren, welchen die Fähigkeit zukommt, Toxine zu neutralisieren, ihre Giftwirkung aufzuheben, und Lysine. Unter letzteren verstehen wir jene Gruppen von Antikörpern, welche dadurch wirken, daß sie ihre Antigene auflösen. Weiter kennen wir Präzipitine, Agglutinine, Opsonine, Tropine, die alle ihre Benennung von ihrer Wirkungsart haben.

Eine Reindarstellung der Antikörper ist bisher nicht möglich gewesen. Unsere Kenntnisse über die chemische Struktur der Antikörper sind daher sehr gering; ihre chemische Natur ist unbekannt. Wir wissen nicht, ob sie Eiweißstoffe sind, jedenfalls stellen sie große Moleküle von kolloidaler Beschaffenheit dar. Beim Passieren durch gewöhnliches Filtrierpapier büßen sie schon etwas von ihrer Wirksamkeit ein, von ganz engen Bakterienfiltern werden sie zum großen Teil zurückgehalten. Durch tierische Membranen gehen sie nicht durch.

Das Verhalten der Antikörper chemischen und physikalischen Einflüssen gegenüber ist stark getrübt durch das Medium, in dem sie sich befinden. Sie zeigen hauptsächlich die Eigenschaften des Serums oder eines Eiweißkörpers desselben, an welches sie gebunden sind. Verdünnte Säuren und Alkalien schädigen die Antikörper bei niedriger Temperatur nicht (bis 37°), während saure Reaktion bei höheren Temperaturen (60° eine Stunde) oder längere Zeit bei niedrigeren Temperaturen (drei Tage bei 37°) einen ungünstigen Einfluß bei den meisten Antikörpern hervorruft. Durch starke Säuren und fixe Alkalien werden sie zerstört. Wie letztere wirken auch Harnstoff und Amide (Spiro für Eiweißkörper, Pick für Immunkörper). Schwefelharnstoff verhält sich ähnlich. Formaldehyd macht die Eiweißkörper inkoagulabel und hebt die Wirkung der Antikörper auf. Alkohol fällt zahlreiche Immunkörper und schwächt sie allmählich bis zur völligen Wirkungslosigkeit ab (Winterberg). Gegen Äther und Chloroform scheinen die Antikörper ziemlich resistent zu sein.

Gegen Pepsin-, Trypsin-, Papayotin-Verdauung sind Agglutinine resistent (Winterberg), ebenso Antitoxine und Präzipitine gegen Trypsinverdauung, während sie durch Pepsin rasch zerstört werden (Pröscher, Obermayer und Pick). Antitoxine werden durch Papayotin (Brieger) und Bakteriolyse durch Pepsinverdauung (Pfeiffer und Proskauer) allmählich vernichtet.

Siedehitze zerstört die Antikörper sofort, bei 60 bis 70° tritt eine mehr oder minder große Schädigung ein. Im getrockneten Zustande dagegen vertragen die Seren bedeutend höhere Hitzegrade (nach Camus eine halbe Stunde auf 110°, eine Viertelstunde auf 140°). Gegen tiefere Temperaturen sind sie unempfindlich (Bujwid).

Der Sauerstoff der Luft, Wasserstoff, Kohlensäure sowie direktes Licht wirken zerstörend auf die Immunkörper (Müller, Palmirski und Orłowski). Nach Müller ist gelbes und rotes Licht unschädlich, dagegen blaues und grünes sehr schädlich. Die ultravioletten Strahlen machen ein antitoxisches Serum unwirksam (v. Baroni und Jonesco-Mikaiești). Hausmann und Pribram fanden, daß die Galle bei Belichtung durch photodynamische Wirkung Antitoxin zerstören kann.

Trotz zahlreicher Versuche, die hypothetischen Antikörper zu isolieren, ist deren Trennung von den Eiweißkörpern des Serums noch nicht geglückt. Da alle Mittel, welche die Eiweißkörper denaturieren, auch die Immunkörper vernichten, mußte man naturgemäß zu solchen Methoden seine Zuflucht nehmen, welche eine Trennung der Eiweißkörper des Serums ermöglichten. Es ging somit die Isolierung der Antikörper parallel mit der Differenzierung der Eiweißkörper im Serum.

Der Eiweißgehalt des Serums beträgt 6 bis 11 Proz. Wir kennen jetzt drei Eiweißstoffe im Säugetiereserum: das Serumalbumin, das Serumglobulin und ein Nucleoprotein, das für die Antikörpergewinnung nicht in Frage kommt.

a) Die Globuline des Serums.

Sie lösen sich in verdünnten Lösungen von Neutralsalzen (Chlorammonium, Chlornatrium, Magnesiumsulfat) und Alkalien; sie sind meist unlöslich in Wasser. Man kann sie fällen durch Verdünnung ihrer Lösung mit Wasser, ferner durch schwache, verdünnte Säuren. Im Säureüberschuß lösen sie sich wieder. Die Globuline sind labil und werden leicht unlöslich. Nur im frisch gefällten Zustande sind sie wieder löslich.

Die Globulinlösung gerinnt bei einem Kochsalzgehalt von 5 bis 10 Proz. bei einer Temperatur von 69 bis 76°.

Entsprechend ihren Eigenschaften gelingt ihre Gewinnung durch Verdünnen, Dialyse, Säure- oder Neutralsalzfällung.

1. Durch Verdünnen oder Ansäuern (Hammarsten). Auf diese Weise gewinnt man nicht das gesamte Globulin. Es enthält noch das Fibrinogen und das Fibrinoglobulin.

2. Durch Fällen mit Neutralsalzen.

a) Fällung mit Ammoniumsulfat.

α) 46 Proz. kaltgesättigter neutraler Ammonsulfatlösung fällt das gesamte Globulin aus. Es enthält noch das Fibrinogen und Fibrinoglobulin. Wird der Prozentgehalt der Mischung an Salzlösung auf 64 Proz. erhöht, so scheidet das Serumalbumin aus (Hofmeister, Kander, Pohl).

β) Mit einer Sättigung von 30 Proz. kann man nach Reye ein fibrinogenfreies Globulin darstellen.

b) Fällung mit Kaliumacetat und Natriumacetat (Porges und Spiro).

c) Fällung mit Magnesiumsulfat (Hammarsten). Durch Sättigung bei 30° erhält man einen Globulinniederschlag, der noch fibrinogen- und fibrinoglobulinhaltig ist. Bei Dialyse fällt ein Teil des Globulins aus.

d) Fällung mit Natriumsulfat. Brunner und Pinkus geben folgende Fällungsgrenzen an bei einer Verdünnung des Pferdeserums 1:5:

Vollkommene Fällung des Fibrinogens . . .	14,0 Proz.
Globulinfällung	18,8 „
Albuminfällung	37,5 „

Bei einer Verdünnung 1:10:

Globulinfällung	20,0 Proz.
Albuminfällung	39,0 „

Trennung der Globuline.

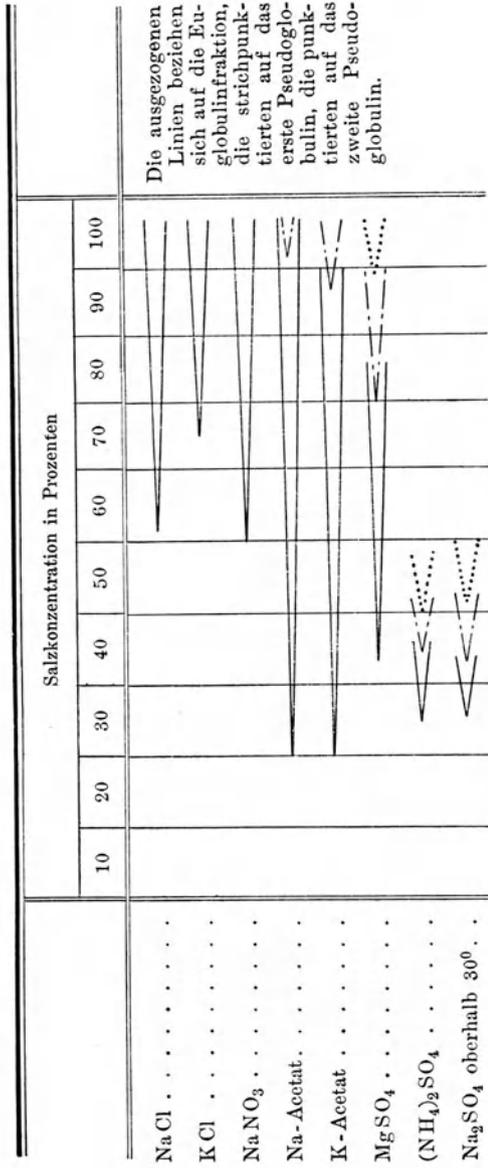
1. Nach Marcus gelingt eine Differenzierung in ein wasserlösliches und wasserunlösliches Globulin durch Dialyse.

2. Von Hofmeisters Mitarbeitern konnte eine Zerlegung in Euglobulin und Pseudoglobulin erzielt werden durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat (Fuld und Spiro, Porges und Spiro). Nach Rostoski ist das Pseudoglobulin in drei weitere Fraktionen von bestimmten Ausfällungsgrenzen zu teilen.

3. Freund und Joachim wandten zur Trennung eine Kombination von Salzfällung mit Dialyse an. Nach ihnen enthalten sowohl das Pseudo- als auch das Euglobulin einen wasserlöslichen

Globuline des Bluteserums.

Grenzen der Fällung durch verschiedene Salze aus den verdünnten Eiweißlösungen (Porges und Spiro).



und wasserunlöslichen Anteil (Para-Euglobulin und Para-Pseudoglobulin).

Eine chemische Differenzierung der verschiedenen Globuline ist bisher nicht möglich gewesen, sie unterscheiden sich nur durch ihre Fällungsgrenzen und teilweise durch ihre optische Wirksamkeit.

Die Gerinnungstemperatur der drei Körper liegt bei einem Gehalt der Lösung von 5 Proz. Ammonsulfat zwischen 70 und 75°.

Das Fibrinogen und das Fibrinoglobulin besitzen auch die Eigenschaften der Globuline. Ersteres gerinnt in 5 bis 10proz. Kochsalzlösung bei 50 bis 52°, nach anderen Angaben bei 52 bis 55°, in schwach alkalischer oder fast neutraler, salzärmer Lösung bei 56°. Es wird bereits durch geringere Ammonsulfatmengen, als zur Ausfällung der Serumglobuline nötig sind, gefällt. Bei völliger Sättigung mit Kochsalz befindet es sich quantitativ im Niederschlag. Die Koagulationstemperatur des Fibrinoglobulins, welches nur in geringen Mengen im Serum vorhanden ist, beträgt 64 bis 66°. Bei 28 Proz. Ammonsulfatsättigung wird es gefällt, desgleichen durch NaCl.

b) Das Albumin des Serums.

Das Serumalbumin ist wasserlöslich. Es ist fällbar durch konzentrierte Säuren und im Überschuß wieder löslich. Nur bei saurer Reaktion erfolgt eine Fällung bei Sättigung mit NaCl oder MgSO₄. Dagegen werden die Albumine nicht gefällt durch verdünnte Mineralsäuren, durch Halbsättigen der Lösungen mit Ammonsulfat oder Sättigen mit Magnesiumsulfat oder Kochsalz bei neutraler Reaktion. Die Koagulationstemperatur hängt stark vom Salzgehalt ab. Die salzhaltige Lösung gerinnt bei 70 bis 85°, die möglichst salzfreie Lösung koaguliert beim Kochen nicht. Nur bei Zugabe von Salz (NaCl) bedingt Alkohol einen Niederschlag.

Die Enteiweißung geschieht durch Mastix und Kaolin.

Durch das Studium der verschiedenen Fällungsmethoden für die Eiweißkörper suchte man die Frage zu lösen, ob die Antikörper Eiweißstoffe sind oder nur an einen bestimmten Eiweißkörper des Serums gebunden sind. Manche Arbeiten sprechen gegen die Eiweißnatur der Antikörper, so z. B. der Befund von Brieger und Boer, daß das Antitoxin vom kohlen-sauren Zink nur dann mitgerissen wird, wenn es vorher durch Zinksulfat

gefällt war, nicht aber, wenn Zinkchlorid benutzt wurde. Dann die Angabe von Pröscher, daß er durch Trypsinverdauung ein Diphtherieantitoxin ohne jegliche Eiweißreaktion gewonnen hat. Dieses Resultat konnte allerdings von Brieger nicht bestätigt werden. Auch konnte eine Beziehung zwischen Antikörpergehalt und Eiweißgehalt des Serums während der Behandlung bei fortgesetzter Steigerung des Immunkörpergehalts nicht konstatiert werden. Die Frage, ob die Antikörper Eiweißstoffe sind, ist indessen nicht mit Sicherheit zu entscheiden, wohl aber die andere Frage, an welche Eiweißkörper des Blutes die Immunstoffe gebunden sind. Die Entscheidung ist zugunsten der Globuline gefallen, und zwar sind es die löslichen Globuline, an welche die Antikörper gebunden sind. Ob das Diphtherieantitoxin ein Globulin ist oder lediglich bei der Globulinfällung mechanisch mitgerissen wird, konnte auch durch die Präzipitationsversuche von Atkinson und Banzhaf nicht entschieden werden. Normalserum-Antiglobulin (gewonnen durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Globulin aus Normalserum) fällt das Diphtherieantitoxin aus Lösungen ebenso aus wie ein Präzipitin, das nach Injektion von dem aus Diphtherieserum dargestellten Globulin erhalten war.

Von den verschiedenen Globulinen enthalten nur die Euglobuline und Pseudoglobuline Antikörper, die anderen Globuline können gefällt werden, ohne daß Immunkörper mitgerissen werden (Pick für die Fibrinoglobuline).

Merkwürdigerweise sind dieselben Antikörper nicht bei allen Tieren an die gleichen Globulinfraktionen gebunden; so konnte Pick das Antitoxin im Pferdeserum nur mit dem Pseudoglobulin

Verteilung verschiedener Immunkörper im Blute differenter Tiergattungen (E. P. Pick).

Immunkörper	Fibrinoglobulin	Euglobulin	Pseudoglobulin	Albumin
Diphtherieantitoxin . . .	0 *)	Ziege	Pferd	0
Tetanusantitoxin	0	(Ziegenmilch?) (Ehrlich und Brieger)	Pferd	0
Choleralysine Pfeiffer .	0	Ziege	0	0

*) 0 bedeutet, daß in den betreffenden Serumweißfraktionen kein Antikörper (Antitoxin) vorhanden ist.

ausfällen, während im Ziegen Serum das Euglobulin die Antitoxine enthielt.

Diese Befunde Picks sollen jedoch nach Porges und Pribram nicht konstant sein, sondern bei derselben Tierart, ja bei ein und demselben Serum je nach der Länge der Aufbewahrung Differenzen aufweisen. Sie weisen auf die Resultate von van de Velde hin, der die Eiweißfraktionen verschieden verteilt fand, je nachdem es sich um ein frisches oder längere Zeit gelagertes Serum handelte.

Die Methoden zur Darstellung, Konzentrierung und Reinigung der Antikörper siehe unter den einzelnen Kapiteln.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1893 u. 1894. Ascoli, Zentralbl. f. Bakt. **58** u. **63**. Atkinson und Banzhaf, Proc. of the soc. for exper. biol. and med. 1910. Bang, Hofmeisters Beiträge 1906. Brieger, Festschrift für Koch, Jena 1903. Brieger und Boer, Ztschr. f. Hyg. 1896. Brieger und Cohn, ebenda 1893. Brieger und Fränkel, Berl. klin. Wochenschr. 1890. Brieger und Ehrlich, Ztschr. f. Hyg. 1893. Brieger und Krause, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Brunner und Pinkus, Biochem. Ztschr. 1907. Buchner, Arch. f. Hyg. **17**. Bujwid, Zentralbl. f. Bakt. **22**. Dieudonné, Arb. Kaiserl. Ges.-Amt **13** (1897). Ficker, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1912. Freund und Sternberg, Ztschr. f. Hyg. **31** (1899). Fuld und Spiro, Ztschr. f. physiol. Chem. **31**. Gibson, Journ. of Biol. chem. 1906. Gibson und Collins, ebenda 1907. Gibson und Banzhaf, ebenda 1907. Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem. 1910. Heim, Lehrb. d. Bakt. Kretz, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2**. Landsteiner und Calvo, Zentralbl. f. Bakt. **31**. Kander, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **20**. Marcus, Ztschr. f. physiol. Chem. **28**. Michaelis, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. von Abderhalden **3**. Morawitz, Handb. d. Biochem. von Oppenheimer **2** (1909). Pfeiffer und Proskauer, Zentralbl. f. Bakt. **19** (1896). Pick, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **1**. Porges und Spiro, Hofmeisters Beitr. **3** (1903). Pribram, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2**. Pröschner, Patentanspruch (K 30) Nr. 13757, Juni 1902. Reye, Inaug.-Diss. Straßburg 1898. Rodhain, Hofmeisters Beitr. **3** (1903). Rona und Michaelis, Biochem. Ztschr. 1907 u. 1908. Samuely, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. von Abderhalden **2** (1910). Sames, Patentanspruch (K 30) Nr. 268 223, 1913. Seng, Ztschr. f. Hyg. **31**.

Allgemeine Vorschriften für die Herstellung und Prüfung antikörperhaltiger Seren.

Die weitverbreitete Anwendung des Serums gleich nach v. Behrings Entdeckung ließ es notwendig erscheinen, daß dafür gesorgt werden müsse, daß nur unschädliches Serum von einem

gewissen prüfbaren Werte in den Verkehr käme. Dies gab in vielen Staaten die Veranlassung, besondere Institute mit der Herstellung des Heilserums zu beauftragen, in Deutschland überließ man die Darstellung privaten Fabrikationsstätten und sorgte für eine Kontrolle durch staatliche Aufsicht.

Die Zulassung zur Serumfabrikation hängt ab von der Genehmigung des Preußischen Kultusministeriums, welchem das staatliche Prüfungsinstitut untersteht (nichtpreußische Fabriken müssen sich ebenfalls durch Vermittelung ihrer Regierungen an das Kultusministerium Preußens wenden). Einer Fabrik wird nur dann erlaubt, ein der staatlichen Kontrolle unterstelltes Serum in den Handel zu bringen, wenn bei der Lokalbehörde keine Bedenken gegen die Qualifikation des Leiters und die Einrichtungen der Fabrik bestehen und wenn sie die bestimmten Vorschriften befolgen will.

Beabsichtigt die Fabrik, ein neues Präparat der staatlichen Kontrolle zu unterstellen, so wird die Zulassung zur Prüfung davon abhängig gemacht, daß eine genaue Wertbemessungsmethode seiner spezifischen Wirksamkeit möglich ist.

Die allgemeinen Bedingungen, welche jede Fabrikationsstätte erfüllen muß, sind außer Hinterlegung einer Kautions sowie der Zahlung bestimmter Prüfungsgebühren folgende:

1. ist der Tierbestand der dauernden Kontrolle eines approbierten Tierarztes zu unterwerfen;
2. ist ein Hauptbuch zu führen, welches ersehen läßt:
 - a) die Nummern der Tiere, von denen Blut zur Herstellung des betreffenden Serums genommen ist,
 - b) Tag der Blutentnahme, Menge desselben und des erhaltenen Serums,
 - c) Ergebnis der Wertigkeitsbestimmung des Serums,
 - d) Tag des Abschlusses der amtlichen Kontrolle und Ergebnis der Kontrolle;
3. ist ein staatlicher Kontrollbeamter anzustellen, der die Einsendung der Proben, die Klausur des Serums während der Prüfung, die Überwachung der Abfüllung und die Plombierung auszuüben hat;
4. muß eine bestimmte Literzahl Serum als Mindestmenge zur Prüfung gestellt werden. Von diesem Quantum hat der

Kontrollbeamte vier Fläschchen à 5 ccm einzusenden (NB. beim Diphtherieserum acht Fläschchen);

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

6. soll mit jeder Prüfung ein Begleitschein nach bestimmtem Muster eingesandt werden.

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

je 10 Liter 400-fachen ¹⁾ Serums	640 <i>M</i>
„ 10 „ 500 „ „	700 „
„ 10 „ 800 „ „	960 „
„ 10 „ 1000 „ „	1000 „
usw.	

Damit der Staat auch die zweckmäßige Herstellung der Seren kontrollieren kann, sind die Fabriken verpflichtet, über die Gewinnung der Sera ausführlich Buch zu führen.

Außer der amtlichen Wertbemessung der Seren im Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Exzellenz Prof. Dr. Ehrlich), die unter den einzelnen Kapiteln nachzulesen ist, erstreckt sich die weitere staatliche Kontrolle auf die Untersuchung der Unschädlichkeit der antikörperhaltigen Präparate. Die eingesandte Serumprobe gilt als „unschädlich“, wenn sie

1. völlig klar und frei von gröberen Niederschlägen ist,
2. keine bakteriellen Verunreinigungen enthält oder bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seren den erlaubten Keimgehalt von 100 Keimen pro 1 ccm Serum nicht überschreitet,

¹⁾ 400-fach ist ein Serum, welches in 1 ccm 400 Immunitätseinheiten (= I.-E.) enthält. I.-E. siehe S. 8.

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

4. frei von Toxinen, speziell Tetanustoxinen, ist.

Das Serum muß bei makroskopischer Betrachtung völlig klar sein und darf höchstens einen geringen Bodensatz zeigen.

Die Sterilitätsprüfung wird nach den üblichen bakteriologischen Regeln auf aërobe und anaërobe Keime vorgenommen. Ein Agarröhrchen (Platte), zwei Traubenzuckerbouillonröhrchen und ein hochgeschichtetes Traubenzuckeragarröhrchen werden mit je fünf Tropfen Serum geimpft.

In Deutschland ist die Konservierung mit antiseptischen Mitteln vorgeschrieben, um die Möglichkeit einer Übertragung von Rotz auszuschließen. Nach den Untersuchungen Bonhoffs wird der Rotzbazillus in Serum, welches mit 0,5 Proz. Phenol versetzt ist, in 24 Stunden sicher abgetötet. Zur Prüfung, ob in einem Serum der gesetzlich vorgeschriebene Zusatz nicht überschritten ist, bedient man sich des Mäuseexperiments. Über 0,5 ccm einer 0,5 proz. Phenollösung (0,0025 g) töten nach subkutaner Injektion eine Maus von 15 g. Von einer 0,5 proz. Trikresollösung ist hierzu die doppelte Menge (1ccm = 0,005 g) nötig. Kleinere Dosen als die angeführten zeigen vorübergehend die charakteristischen Vergiftungserscheinungen (Zittern, Krämpfe).

Um die verhängnisvollen Tetanusfälle, wie sie im Auslande (Amerika, Italien) nach Injektion von Diphtherieserum vorgekommen sind, auszuschließen, werden gesunde Meerschweine mit 5 bis 10 ccm Serum subkutan injiziert. Die Tiere müssen völlig gesund und munter bleiben. Es dürfen dazu keine Meerschweine benutzt werden, bei denen man Wertbemessungsversuche vorgenommen hat, da diese im höchsten Grade gegen Serum überempfindlich sind (Theobald Smithsches Phänomen).

Eine Eindickung des Serums zwecks Konzentration des Antikörpergehalts ist nicht erlaubt. Die Staatskontrolle untersucht alle Sera auf Eiweißgehalt und beanstandet alle Seren, welche mehr als 12 Proz. Eiweiß enthalten.

Literatur: Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera. Jena, Gustav Fischer, 1906. Otto und Boehncke, Kolle-v. Wassermann, Handbuch d. pathog. Mikroorganismen 1913.

II. Spezieller Teil.

1. Antitoxische Sera.

Botulismusserum.

a) Das Botulismustoxin.

Das Botulismusgift wird gewonnen durch Züchtung des *Bacillus botulinus* in flüssigen Nährmedien. Der Bazillus gehört zu den obligaten Anaërobiern. Zur Herstellung des anaëroben Zustandes bedient man sich am bequemsten der Wasserstoffdurchleitung, Kohlensäure darf nach van Ermengem nicht angewendet werden, da sie schwach antiseptisch auf den Bazillus wirkt. Die optimale Temperatur liegt zwischen 18 und 25°.

Der flüssige Nährboden wird nach van Ermengem aus Schweinefleisch bereitet. Die Bouillon wird alkalisiert und mit 1 Proz. Glykose, 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Kochsalz und 2 Proz. Gelatine versetzt. van Ermengem erhielt auch ein gutes Gift mit einer Bouillon mit 2 Proz. Glykose, 1 Proz. Pepton und 0,6 Proz. NaCl. Die Alkaleszenz betrug pro Liter 10 bis 15 ccm normales Natriumcarbonat.

Eine solche Bouillon trübt sich regelmäßig durch Wachstum der Bazillen bei 20 bis 25° und entwickelt große Gasmengen (H , CH_4 , CO_2). Die Gasbildung dauert mehrere Wochen an. Die alten Kulturen haben einen charakteristischen säuerlichen Geruch wie der der ranzigen Butter.

Die Bouillon von Tchitchkin wird ebenfalls aus Schweinefleisch hergestellt (500 g Schweinefleisch auf 1 Liter Wasser). Die Bouillon erhält einen Zusatz von 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Dextrose und 0,5 Proz. Kochsalz. Die Bouillon wird in Kolben mit langen Hälsen verteilt, die etwas reines Calciumcarbonat enthalten, welches auf dem Boden liegen bleibt. Der Nährboden wird mit einer dünnen Schicht Vaseline überschichtet und an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine halbe Stunde bei einer Temperatur von 100° sterilisiert. Nach einem Wachstum der Kultur von zwei bis drei bis vier

Wochen bei 20° war sie so giftig, daß in der Regel 0,001 ccm genühten, um ein 300 bis 500 g schweres Meerschwein zu töten. Die Giftigkeit der Bouillon war jedoch verschieden. Die tödliche Minimaldosis schwankte zwischen 0,01 und 0,00005 ccm.

Zur Befreiung der Bouillon, in der das Gift in gelöster Form enthalten ist, von den Bazillen kann man sie ohne Schwierigkeit und ohne größere Verluste durch Chamberlandkerzen filtrieren. Das Toxin behält auch nach Kerzenfiltration seinen eigentümlichen penetranten Geruch.

Abweichend von den eben beschriebenen Nährmedien empfiehlt Forssman als besten Nährboden Schafffleischbouillon. Schafffleisch und 0,6 proz. Kochsalzlösung werden zu gleichen Gewichtsteilen gemischt und ohne Filtration und ohne weitere Zusätze sterilisiert. Während des 14-tägigen Wachstums bei 25° muß dafür gesorgt werden, daß die sehr reichlich entwickelte Luft entweichen kann. Die Kultur wird durch Chamberlandkerzen filtriert.

Im Gegensatz zu van Ermengem alkalisierte Forssman seine Fleischbrühe nicht. Durch vergleichende Versuche hatte er gefunden, daß die beste Giftbildung in einem schwach sauren Medium erzielt wurde. Forssman machte auch darauf aufmerksam, daß ein schwächeres Toxin erhalten wird, wenn die Bouillon mit einer anderen Bouillonkultur, als wenn sie mit einer frischen Gelatinekultur beimpft wurde. Derselbe Autor fand einen Kochsalzgehalt des Nährbodens von 0,5 bis 1 Proz. am günstigsten für die Toxinproduktion. Ein NaCl-Gehalt des Kulturmediums von über 2 Proz. hemmt nach van Ermengem das Wachstum des *Bacillus botulinus*.

Es gelingt keineswegs immer, ein gutes Gift zu erhalten, auch wenn die Vorschriften von van Ermengem und Forssman aufs genaueste eingehalten werden.

Eiweißfreie Nährböden eignen sich nicht zur Toxingewinnung.

Die Reindarstellung des Botulismustoxins ist von Brieger und Kempner versucht worden. Sie fällten das Gift aus dem toxischen Filtrat mittels Zinkchlorid und führten es so in einen unlöslichen Zustand über. Das Kulturfiltrat wird mit dem doppelten Volumen einer 3proz. Chlorzinklösung versetzt. Um bei zu starker Azidität des Filtrates ein Übergehen des Giftes in dasselbe zu verhüten, stumpft man den Säureüberschuß durch Spuren von Ammoniak etwas ab. Der Niederschlag wird sorg-

fältig ausgewaschen und mit einer 1proz. Ammoniumbicarbonatlösung schwach alkalisch gemacht. Das Gift wird sodann aus der Zinkverbindung durch Ammoniumphosphat wieder frei gemacht. Das unlösliche phosphorsaure Zink wird abfiltriert und das Gift durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat abgeschieden. Die Ausbeute mit dieser Methode ist quantitativ. Außer dem Toxin enthielt die Ammonsulfatfällung noch die Albumosen des Nährbodens. Versuche mittels Natriumsulfat, diese zu entfernen, hatten nicht den gewünschten Erfolg, da die Verluste zu groß waren.

Eigenschaften.

Das Botulismustoxin erfährt rasch Einbuße an seiner Wirksamkeit, wenn es dem Licht und der Luft ausgesetzt ist. Dagegen ist es im trockenen Zustande oder in zugeschmolzenen Röhren im Dunkeln aufbewahrt, lange Zeit wirksam. In zugeschmolzenen Röhren bleibt es mindestens zehn Monate unverändert wirksam (Forssman), nach Jahren ist es noch imstande, in Dosen, die kaum das 20- bis 30-fache der ursprünglichen tödlichen Dosis betragen, Versuchstiere zu töten (van Ermengem). Bei 37° geht die Zersetzung des wirksamen Prinzips des Toxins rascher vor sich als bei niedrigerer Temperatur. Dies trifft sowohl zu bei Aufbewahrung in luftleerem wie luftgefülltem Raum.

Die Wärmeresistenz des Toxins ist eine geringe. Temperaturen von 70 bis 80° zerstören es rasch. Die Wirksamkeit geht verloren bei dreistündiger Erwärmung auf 58° und halbstündiger auf 80°.

Verdünnte Säuren verändern das Gift nur wenig, während es von Alkalien, z. B. 3proz. Sodalösung, rasch unwirksam gemacht wird (van Ermengem). Faulende Stoffe, wie Faeces, zersetztes Blut, schädigen das Gift nicht.

Von Alkohol und Äther wird das Toxin gefällt. Es läßt sich aussalzen, ohne wesentliche Veränderungen zu erleiden. Durch Äther, Alkohol und oxydierende Substanzen wird es rasch zersetzt, während es gegen Reduktionsmittel, wie selbst Natriumamalgam, weniger empfindlich ist.

Sehr empfänglich für das Botulismusgift sind Kaninchen, Meerschweine, Mäuse und Katzen. Die Inkubationszeit beträgt 12 bis 24 Stunden. Nach Forssman ist die Inkubation und das Krankheitsbild fast gleich, wenn das Toxin subkutan, intrazerebral,

subdural, intraarteriell, intravenös, intratestikulär und in die Lymphdrüsen gespritzt wurde. Ein anderes Bild erzeugte die intraperitoneale, intrapleurale und intrapulmonale Impfung. Die Inkubationszeit wird verkürzt und die letale Dosis verringert. Bei der subkutanen Injektion kann die Latenzperiode bis zum Auftreten der ersten Symptome nicht unter sechs Stunden herabgedrückt werden; bei intraperitonealer Einverleibung kann sie nur vier Stunden betragen. Bei letzterer Impfarmt beträgt die Dosis, welche in etwa 48 Stunden tötet, nur $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{9}$ der subkutan eingespritzten. Forssman fand auch die Art der Einverleibung des Giftes von großem Einfluß auf den Verlauf und die Dauer der Krankheit. Dieselbe Menge, welche ein Meerschwein bei subkutaner Injektion in vier Tagen, bei intraperitonealer in zwei Tagen tötet, wirkt bei intrapulmonaler Einspritzung bereits in einem Tage tödlich.

Das Krankheitsbild des Botulismus zeigt besonders bei Katzen die charakteristischen Merkmale. Sie bestehen in Mydriasis, Lähmung der Blinzelhaut, Änderung der Pharyngeal- und Bronchialsekretion, völliger Aphonie, croupartigem Husten, Aphagie, Faeces- und Urinretention. Hohe Dosen töten nach einer Inkubation von 6 bis 12 Stunden innerhalb 36 bis 48 Stunden. Die allgemeine Parese und Kollaps treten rasch ein. Die Tiere gehen unter Erstickungsanfällen zugrunde. Ein besonders charakteristisches Zeichen ist der Zungenprolaps, der in perakuten Fällen häufig fehlt.

Bei Kaninchen bestehen die Symptome meist in Speichelfluß und Lähmungen, die sich manchmal auf einige Muskelgruppen beschränken. Das Krankheitsbild entwickelt sich meist plötzlich einige Stunden vor dem Tode. Bei Mäusen treten schon nach Injektion kleinster Mengen Lähmungen der Hinterbeine auf. Der Tod erfolgt innerhalb weniger Stunden.

Zur Wertbemessung des Botulismustoxins benutzt man meist Meerschweinchen und als Impfarmt die subkutane. Im Vordergrund des Symptomkomplexes steht die starke Muskeler schlaffung. Außerdem beobachtet man grünlichen Ausfluß aus dem Munde, Aphonie, Aphagie, eiterige Sekretion in den Augenwinkeln, Pupillendilatation, Obstipation, großen Gewichtsverlust und bei männlichen Tieren oft Penisprolaps. Atmungsbeschwerden treten erst im späteren Intoxikationsstadium auf. Dauert die Krankheit einige

Tage, so sitzt das Tier mit verklebten Augenlidern und herabhängendem Kopf still da, und die Respiration ist unregelmäßig und beschwerlich. Besonders macht sich eine große Muskelschlaffheit bemerkbar, die beim Anfassen namentlich deutlich ist. Daher eignet sich das Meerschweinchen bei subkutaner Injektion in hervorragender Weise zur quantitativen Bemessung des Toxins. Außer dem Gewichtsverluste und dem Tode erhält man feine Kriterien für die Wirksamkeit eines Giftes in der eigentümlichen Erschlaffung der Muskeln, vornehmlich der Bauchmuskeln, welche leicht fühlbar ist und lange andauert. Ein Drittel bis ein Viertel der tödlichen Dosis macht sich gut bemerkbar in Form der beschriebenen Muskelschlaffheit.

Hervorgehoben zu werden verdient noch, daß sich bei verschiedenen Tierarten die gleichen charakteristischen Erscheinungen erzeugen lassen, wenn ihnen das Gift auf dem Fütterungswege zugeführt wird. Man bedarf allerdings dazu bedeutend größerer Mengen als bei sonstiger Einverleibung. In diesem Verhalten des Botulismushiftes besteht ein auffallender Unterschied gegenüber der großen Mehrzahl der anderen Toxine, einschließlich des Schlangengiftes. Meerschweine, Mäuse und Affen sind besonders empfänglich für die Intoxikation auf Eingabe des Giftes per os. Ein Stückchen Brot mit ein bis zwei Tropfen Toxin angefeuchtet reicht schon aus, um ein Meerschweinchen in 24 bis 36 Stunden unter ausgesprochenen Lähmungserscheinungen zu töten.

Literatur: van Ermengem, Ztschr. f. Hyg. 26. Derselbe, Kolle v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Forssman, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Kempner, Ztschr. f. Hyg. 1897. Madsen, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1 (1908). Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 37 (1905), Ref.

b) Das Botulismusanantitoxin.

Zur Gewinnung des Botulismusanantitoxins dienen Pferde und Ziegen. Die zweckmäßigste Injektionsart des Toxins ist die subkutane.

Nach v. Wassermann wird die Immunisierung von Pferden so ausgeführt, daß man mit minimalen Dosen beginnt und allmählich, unter Vermeidung zu großer Sprünge, zu hohen Dosen ansteigt. Da für die praktische Verwendung ein sehr hochwertiges Serum nötig ist, muß die Behandlung der Pferde lange Zeit fort-

gesetzt werden. Im Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin ist folgendes Immunisierungsverfahren üblich: Von einem Gift, welches in Mengen von $\frac{1}{40}$ mg 250 g schwere Meerschweine binnen 24 bis 72 Stunden tötet, wird einem Pferde die 20-fache tödliche Meerschweinchendosis, also $\frac{1}{200}$ ccm, injiziert. In Zwischenräumen von vier bis fünf Tagen wird dann jedesmal die doppelte Dosis gegeben, also $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{50}$ ccm usw., bis etwa 200 ccm (Leuchs).

Wie Pferde sind auch Ziegen in der Weise immunisierbar, daß man gleich mit kleinsten Mengen reinen Toxins anfängt. Kempner gibt den Verlauf der Behandlung zweier Ziegen ausführlich an. Die erste Injektion betrug das Doppelte der tödlichen Minimaldosis (0,0002 ccm) für Meerschweinchen. Vier bis sieben Tage später, nach Ablauf der Reaktion, wurde ständig um etwa das Zweifache gestiegen. Nach einer Behandlungsdauer von 115 Tagen war so die Injektionsmenge auf 200 ccm gestiegen. Elf Tage später wurde durch Aderlaß Blut entnommen, und die Prüfung ergab einen Wert von 1000 Immunitätseinheiten in 1 ccm. 38 Tage nachher wurde die Immunisierung wieder aufgenommen durch Einverleibung von 100 ccm, 100 ccm, 200 ccm und nach weiteren 30 Tagen von 300 ccm Kulturfiltrat. Neun Tage nach der letzten Injektion hatte das Serum einen Titer von 100 000 Antitoxineinheiten im Kubikzentimeter.

Bei einer anderen Ziege wurde die Immunisierung in ähnlicher Weise durch anfängliches Steigen auf das Doppelte der vorhergehenden Dosis vorgenommen. Als die 1000-fache tödliche Meerschweindosis (0,1 ccm) erreicht war, wurde auf das Vier- bis Fünffache gestiegen, so daß $1\frac{1}{4}$ Monate früher als bei der vorigen Ziege, nach $2\frac{1}{4}$ Monaten bereits die Injektionsmenge 100 ccm betrug.

Die Immunisierung ist natürlich auch bei der Gewinnung des Botulismusserums nicht nach einem bestimmten Schema auszuführen, es gelten auch hier die allgemeinen Regeln der Antikörperdarstellung, d. h. eine neue Injektion darf erst dann gemacht werden, wenn die Reaktion völlig abgelaufen ist. Den besten Indikator für die Vornahme einer neuen Behandlungsdosis geben die Temperatur und das Körpergewicht der Tiere ab. Forssman injiziert in Zwischenräumen von 8 bis 14 Tagen, weil dadurch die Tiere mehr geschont werden. Doch wird man manchmal gezwungen sein, je nach dem individuellen Verhalten der Tiere,

noch längere Zeit zwischen den einzelnen Injektionen verstreichen zu lassen.

Die höchste Antitoxinkonzentration im Blut, also der beste Zeitpunkt für die Blutentnahme, ist um den 15. Tag erreicht. Nach den Untersuchungen von Forssman und Lundström fällt nach einer subkutanen Injektion zuerst der Antitoxingehalt, steigt dann schnell vom 4. bis 8. Tage, um am 15. Tage den Höhepunkt zu erreichen. Von da ab sinkt die Antitoxinmenge wieder rasch ab. Die Antitoxinkurve verläuft bei der subkutanen und intravenösen Einverleibung des Toxins nicht gleich. Im letzteren Falle fällt das Maximum anstatt auf den 15. auf den 10. Tag, und man bekommt nicht so hohe Antitoxinwerte.

Die Wertbemessung des Botulismusantitoxins kann entweder nach Kempner oder nach Forssman geschehen.

Kempner bezeichnet als Normalserum ein solches, welches in 1 ccm so viel Antitoxin enthält, daß es die Testdosis unschädlich macht. Als Testdosis gilt die Giftmenge, welche ein Meerschweinchen von 250 g in etwa 48 Stunden sicher tötet. Ein Serum, welches in einer Verdünnung 1:1000 diese Testdosis zu neutralisieren vermag, ist also nach Kempner 1000-fach.

Der Beweis dafür, ob alles Toxin neutralisiert ist oder nicht, ist die Schaffheit der Bauchmuskeln.

Forssman verwendet zur Prüfung eine Mischung von Serum mit Toxin. Er geht von einer bestimmten Serummengung aus, der so viel Toxin zugesetzt wird, bis die Mischung ein Meerschweinchen von 250 g in vier bis fünf Tagen tötet. Die Zahl der dazu nötigen Testdosen pro Kubikzentimeter Serum wurde als die Wertigkeit des Serums bezeichnet. Die Mischungen von Toxin und Serum enthielten bei bis 100 000-fachen Seren 200 Testgift-dosen, bei noch höheren Seren 500 Testdosen. Der Tod der Meerschweinchen nach vier bis fünf Tagen zeigt an, daß in der Mischung nur eine tödliche Dosis frei enthalten ist, denn die Tiere, welche nicht in dieser Zeit zugrunde gehen, überleben. Bei einer solchen Versuchsreihe ist auch die Wirkung des Botulismustoxins gut zu beobachten, die außer Gewichtsverlust (oder Tod) noch eine eigentümliche Erschlaffung der Muskeln, besonders der Bauchmuskeln, bewirkt, welche unschwer zu fühlen ist und wochenlang andauern kann.

Das Botulismusantitoxin besitzt die Eigenschaften der übrigen Antitoxine und kann auch nach denselben Methoden konzentriert und gereinigt werden.

Literatur: Brieger und Kempner, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Forssman, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Forssman und Lundström, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902. Kempner, Ztschr. f. Hyg. **26**. Kempner und Pollack, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Kempner und Schepilewsky, Ztschr. f. Hyg. **27**. Leuchs, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913. Madsen, Zentralbl. f. Bakt. **37** (1905), Ref. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2** (1909). v. Wassermann, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1913.

Choleraserum¹⁾.

a) Das Cholera-toxin (Endotoxin).

Die Cholera-toxine lassen sich auf ähnliche Weise gewinnen wie die Typhus- und Dysenteriegifte. Pfeiffer und Wassermann haben zuerst den Beweis erbracht, daß die Zelleiber der Cholera-vibrionen toxisch sind. Die giftige Wirkung der Vibrionen ist im Zelleib selbst enthalten. Nach den Untersuchungen von Pfeiffer soll sich das Gift durch Einwirkung von starkem Alkohol, Siedehitze oder länger anhaltendes Erwärmen auf 60° in ein viel weniger wirksames sekundäres Gift umwandeln.

Friedberger und Moreschi fanden, daß durch Chloroform abgetötete Vibrionen weniger giftig sind als die auf 60° erhitzten. Durch einstündiges Erhitzen auf 130° wurde die Toxizität völlig zerstört und damit die antikörperproduzierende Wirkung fast ganz aufgehoben.

Macfadyen hat ein lösliches Gift gewonnen, indem er die Cholera-bakterien der Temperatur der flüssigen Luft aussetzte, zerkleinerte und die Masse mit 1 Promille Kalilauge aufschwemmte. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren ausgeschleudert, und damit wurde eine obere bakterienfreie Schicht gewonnen, welche aus einem 10 proz. Extrakt der Bakterien bestand. Nach Behandlung dieses Extraktes mit Chloroformdämpfen war er steril

¹⁾ Cholera-, Ruhr- und Typhusserum werden mittels Ektotoxinen (den sogenannten echten Giften) und Endotoxinen gewonnen, stellen also keine rein antitoxische Sera dar. Sie enthalten Antikörper anti-toxischer und antiendotoxischer Natur.

und wirkte akut toxisch. Im Durchschnitt genügten $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{20}$ ccm, manchmal auch 0,3 bis 0,5 ccm, um Meerschweinchen von 300 g, intraperitoneal und subkutan einverleibt, zu töten. Für Kaninchen brauchte er bei intravenöser Applikation 0,3 bis 0,5 ccm, um dieselbe Wirkung hervorzurufen. Bei der Aufbewahrung werden die Zellsäfte rasch abgeschwächt, desgleichen durch Temperaturen von 55 bis 60°.

Auch Hahn gelang es, durch Autolyse während 48 Stunden aus den Choleravibrionen giftige Substanzen zu gewinnen, welche auf Meerschweinchen, Ziegen und Pferde toxisch wirkten. Mengen von 0,3 bis 1,5 bis 3,0 ccm töteten Meerschweinchen bei subkutaner Injektion. Die Empfindlichkeit der Pferde ist bedeutend größer als die der Meerschweinchen; so wird ein Pferd nach subkutaner Einspritzung von 10 ccm eines Autolysates getötet, dessen tödliche Dosis für das Meerschwein bei gleicher Impfarmt 1 ccm beträgt.

Strong versuchte durch einfache Aufschwemmung von Vibrionen (20-stündige Agarkulturen) in Wasser, die er 1 bis 24 Stunden auf 60° erhitzte und dann zwei bis fünf Tage bei 37° hielt, die Gifte aus dem Zelleib zu befreien. Durch Filtration erhielt er eine Flüssigkeit, die Kaninchen von 1500 g nach intravenöser Injektion von 2 bis 3 ccm tötete. Dieselbe Dosis braucht man, um ein Meerschweinchen intraperitoneal, und etwa 4 ccm, um es subkutan zu töten.

Roux, Metschnikoff und Salimbeni konnten mit einer Modifikation des Strong'schen Verfahrens viel stärkere Zellgifte gewinnen. Sie brachten die Vibrionenemulsion aus 18-stündigen Agarkulturen zunächst 24 Stunden in den Brutschrank bei 38° und erhitzen dann erst eine Stunde lang auf 60°. Die in zugeschmolzenen Röhren befindlichen Bakterienaufschwemmungen werden sodann, vor Licht und Luft geschützt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt, bis die meisten Vibrionen sich am Boden abgeschieden haben. Im allgemeinen dauert dies sechs bis acht Tage. Die sirupartige und oben leicht trübe Flüssigkeit wurde sodann abgehebert und zentrifugiert, um die noch in Suspension verbliebenen Bakterien zu entfernen. Zur Aufschwemmung verwandten sie Wasser mit 0,25 Proz. Kochsalz und 0,1 Proz. Soda. Die so gewonnene Flüssigkeit erwies sich als ungefähr noch einmal so giftig wie die nach der Strong'schen Methode gewonnenen Endo-

toxine. Von einer Maceration von 1 g Mikroben zu 20 ccm Wasser tötet 1 ccm ein Meerschweinchen von 200 g bei subkutaner Impfung.

Die Wirksamkeit der toxischen Flüssigkeit wurde beim andauernden Erhitzen auf 60° und bei Siedehitze kaum alteriert.

Ein noch wirksameres Gift konnten die eben genannten Forscher aus den Zellen der Vibrionen gewinnen, wenn sie dieselben auf einem besonderen Nährboden, dem von Nicolle angegebenen Kartoffelagar, züchteten. Der Kartoffelagar wird in folgender Weise hergestellt: 500 g Kartoffeln werden in 1 Liter Wasser 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen, ebenso behandelt man 500 g gehacktes Rindfleisch. Die Mischungen werden sodann durch Leinwand koliert und zu gleichen Teilen vermengt. Mit diesem Gemisch stellt man sich in üblicher Weise einen Nähragar her unter Verwendung von 3 Proz. Pepton, 1 Proz. Na-Cl, 3 Proz. Agar und 2 Proz. Glyzerin. Um eine zu starke Befeuchtung der Agarschicht mit Wasserdampf zu verhindern, wird dieser Agar in den Metallflaschen von Nicolle und Allilaire sterilisiert. Diese Flaschen sind an der Innenfläche mit mehreren Schichten Filtrierpapier belegt. Auf zu feuchtem Agar keimen die Cholera-vibrionen schlechter aus und sind schon nach 16 bis 18 Stunden teilweise autolytisch, wodurch man aus solchen Kulturen wenig konstante Produkte erhält.

Die Bakterien-schicht auf diesem Agar ist kleberig, von blasser Farbe und hat einen eigentümlichen Geruch. Die Reaktion der abgeschabten dichten Bakterienmasse ist in der Regel schwach alkalisch, manchmal neutral. Im allgemeinen erzielt man von einer Kulturfläche $5\frac{1}{2}$ bis 6 g feuchte Mikroben. Pro Gramm Bakterien wird $\frac{1}{2}$ ccm geringprozentiger Kochsalzlösung hinzugefügt und die ganze Masse in einen feuchten Raum von 38° gesetzt. Damit schafft man die günstigsten Bedingungen zur Autodigestion der Vibrionen und zur Befreiung der toxischen Substanzen. Nach einstündiger Bebrütung ist die vorher schwach alkalische oder neutrale Reaktion in eine saure umgeschlagen, welche immer stärker wird, um nach 18 bis 24 Stunden ihren Höhepunkt zu erreichen. Gleichzeitig wird die Bakterienmasse immer flüssiger, und Kulturversuche zeigen, daß mit dem Erreichen des Maximums der sauren Reaktion alle Bakterien tot sind. Zur Erzielung von stark toxischen Lösungen darf man diesen Zeitpunkt nicht abwarten, sondern muß den Bakterienteig spätestens nach 10 oder

12 Stunden mit sterilem, destilliertem Wasser verdünnen. Als beste Konzentration hat sich den Autoren das Verhältnis 1 g zu 40 ccm Flüssigkeit erwiesen. Die Verdünnungen werden nochmal 24 Stunden lang in den Brutschrank bei 38° gestellt und sodann durch Ausschleudern von den Vibrionen befreit. Die so erhaltene Flüssigkeit unterscheidet sich schon im Aussehen von den giftigen Lösungen, welche man durch einfaches Aufschwemmen in Wasser mit vorherigem oder folgendem Erwärmen auf 60° dargestellt hat. Es fehlt ihnen die mehr oder weniger sirupartige Konsistenz, welche diesen eigentümlich ist.

Die Wirksamkeit dieser autolytischen giftigen Substanzen ist viel größer als die der nach den anderen Methoden gewonnenen. Manchmal stellte $\frac{1}{10}$ ccm, entsprechend den Produkten aus $2\frac{1}{2}$ mg Vibrionen, die tödliche Dosis dar. Gewöhnlich liegt diese bei $\frac{1}{3}$ ccm bei subkutaner Einspritzung. Bei Injektion der einfach tödlichen Dosis scheint die subkutane Impfung wirksamer zu sein als die intraperitoneale.

Das in dieser Weise gewonnene Cholera-toxin verliert bereits nach zwei oder drei Tagen bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur oder im Eisschrank etwa die Hälfte seiner Wirksamkeit. Nach dieser Abschwächung hält sich das Toxin lange Zeit auf derselben Höhe. Um die Abschwächung des Toxins möglichst zu vermeiden, empfiehlt Salimbeni, die ganze Emulsion während der ersten Tage im Eisschrank zu lassen und erst vor dem unmittelbaren Gebrauch zu zentrifugieren. Auch der Hitze gegenüber ist dieses Toxin wenig resistent; bei Erhitzung auf 100° wird es nach wenigen Minuten bereits erheblich abgeschwächt.

Ein lösliches Gift in Cholera-bouillonkulturen hat zuerst Ransom gefunden. Das Gift von Ransom tötete 250 g schwere Meerschweinchen innerhalb 24 Stunden, in großen Dosen tötete es bereits in drei bis vier Stunden. Für Kaninchen ist das Gift erst in höheren Dosen (4 ccm) wirksam. Weiße Mäuse und Tauben verhalten sich refraktär. Es gelang ihm auch, das Gift zu fällen, welches dann in entsprechender Konzentration auf die Versuchstiere schneller tödlich wirkte. Das Gift vertrug die Siedehitze.

Roux, Metschnikoff, Salimbeni, die fast gleichzeitig mit Ransom lösliche Toxine in den Bouillonkulturen der Cholera-vibrionen nachwiesen, hatten die toxigenen Eigenschaften ihres Cholera-vibrio durch die Züchtung desselben in Kollodiumsäckchen

nach Roux und Nocard erhöht. Im allgemeinen ist diese Methode nicht brauchbar zur Erhöhung der giftbildenden Fähigkeiten eines Vibrio. Das Vermögen, Gifte zu produzieren, kommt nicht allen Cholerastämmen gleichmäßig zu. Wir haben hier ähnliche Verhältnisse, wie sie z. B. bei den Diphtherie- und Typhusbazillen bestehen.

Als Nährboden, der eine rasche Entwicklung des Cholera-vibrio gestattet, bewährte sich den genannten Autoren am besten Peptonwasser mit einem Zusatz von 2 Proz. Gelatine, 1 Proz. Kochsalz und 25 Proz. Pferdeserum. Zur Herstellung dieses Nährmediums benutzten sie das Martinsche Pepton (200g Schweinemagen: 1 Liter Wasser + 10 ccm HCl), welches konstantere Resultate gab wie das Handelspepton. Bei letzterem mußte jedenfalls sorgfältig darauf geachtet werden, daß es keine Spuren von Zucker enthält. Im übrigen wird die Nährflüssigkeit in folgender Weise bereitet:

Zu dem Peptonwasser werden 2 Proz. Gelatine zugegeben und bis zur völligen Lösung der Gelatine auf 100° erhitzt. Nachdem die Peptonwassergelatine bis zum Lackmusneutralpunkt alkalisiert ist, werden noch pro Liter 12 ccm normale Sodalösung zugefügt. Dieser Alkaleszenzgrad stellt das Optimum für die Giftbildung der Cholera-vibrien dar.

Der so alkalisierte Nährboden wird 20 Minuten lang aus 115° erhitzt, durch Papier filtriert und in Literflaschen gefüllt, die von 50 zu 50 ccm graduiert sind. Die Flaschen werden durch Erhitzung während 20 Minuten auf 110 bis 112° sterilisiert. Nach dem Erkalten erhält der Nährboden einen Zusatz von 25 Proz. Pferdeserum. Das Pferdeserum soll ungefähr drei Wochen alt und wenigstens eine Woche mit dem Blutkuchen im Kühlraum gewesen sein.

Je 50 ccm werden in Rouxsche Flaschen übergeführt, welche direkt für die Toxindarstellung aus Cholera-vibrien hergestellt sind. Sie ermöglichen die für die Gewinnung des Cholera-toxins absolut notwendige rasche und reichliche Entwicklung der Bakterien, indem man aus ihnen eine dünn-schichtige und breit-flächige Kultur erhält. Zur Inaktivierung des normalen Pferdeserums im Nährboden muß derselbe drei Stunden lang in einem Wasserbade von 60° gehalten werden.

Zur Impfung empfiehlt es sich, 16 bis 18 Stunden alte Agarkulturen zu verwenden. Nach 24-stündigem Aufenthalt im Brut-

schränk ist die Nährflüssigkeit bereits stark getrübt und die Oberfläche mit einem dicken Schleier bedeckt. Vom zweiten Tage an sieht man am Boden der Flaschen eine zarte schleimige Ablagerung, während die Flüssigkeit gleichmäßig stark trübe ist. Während der ersten vier Tage schüttelt man am besten die Kulturen täglich einmal.

Am dritten bis vierten Tage erweist sich die Kultur bereits giftig, doch ist der Höhepunkt der Giftbildung erst gegen den siebenten Tag erreicht. Die Toxizität geht darauf herunter, die Kulturen werden dann sehr alkalisch und riechend.

Zur Herstellung des Toxins werden die Kulturen am sechsten oder siebenten Tage aus dem Brutschränk herausgenommen, zunächst durch Papier filtriert und dann durch Chamberland- oder Berkefeldkerzen geschickt.

Brau und Denier gewannen ein lösliches Toxin in einem Nährboden, der aus 90 ccm normalem (älteren) Pferdeserum und 10 ccm defibriniertem (älteren) Pferdeblut bestand; das Nährmedium wird vor der Impfung drei Stunden bei 60° erwärmt. Die Nährflüssigkeit wird reichlich mit Kultur beimpft und öfters geschüttelt. Nach siebentägigem Wachstum bei 38° wird die Kultur in üblicher Weise filtriert. Mit diesem Nährboden erhielten die Forscher stärkere Gifte als bei Züchtung der Cholera Bakterien in alkalischer Martinscher Bouillon.

Die giftigen Lösungen, welche Roux, Metschnikoff und Salimbeni sowie Brau und Denier aus ihren Cholera bouillonkulturen erhalten haben, waren ungefähr gleich giftig. 0,1 bis 0,5 ccm des Filtrats töten Meerschweinchen von 250 bis 300 g bei subkutaner und intraperitonealer Einspritzung. Nach intravenöser Applikation von 0,5 bis 1,5 ccm wirkt das Gift in einigen Stunden für Kaninchen tödlich. Bei subkutaner Injektion erfolgt der Tod der Kaninchen nach 15 bis 20 ccm unregelmäßig erst in drei bis vier Tagen. Die Maus ist fast unempfindlich für das Cholera gift, Hund und Pferd sind dagegen ebenfalls empfänglich. Die Tiere gehen unter Temperaturabfall unter den gleichen Erscheinungen wie bei der Infektion mit lebenden Bakterien zugrunde.

Das Cholera gift ist sehr unbeständig und wird durch Licht und Luft geschädigt. Die Resistenz gegenüber höheren Temperaturen ist sehr bemerkenswert. Das Gift wird erst nach 20 Minuten bei 120° zerstört.

Eine Konzentration des Giftes gelingt durch Fälln mit Alkohol und Ammonsulfat.

Kraus benutzte zur Züchtung der Cholera-vibrionen eine Rindfleischbouillon mit 1,5 Proz. Wittepepton und 0,5 Proz. Kochsalz unter Variation der Alkaleszenz. Die Nährflüssigkeit wurde mit 24-stündiger Agarkultur beimpft.

Das Zeitoptimum der größten Giftbildung ist nach Kraus noch nicht mit Sicherheit festgestellt. Zwei bis drei Wochen alte Kulturen erwiesen sich vielfach ebenso wirksam als Bouillonfiltrate aus fünftägiger Kultur.

Zur Darstellung des Giftes benutzt man zweckmäßig wie bei der Gewinnung der Diphtherietoxine die Papierfiltration. Die Kulturen werden mit 0,5 Proz. Phenol oder 0,3 bis 0,4 Proz. Trikresol versetzt und bis zur vollkommenen Klarheit durch Papier filtriert. Anfangs hatte Kraus die Kulturen durch Reichelkerzen geschickt, wodurch ein größerer Verlust an Toxin eintrat. Die Wirksamkeit der Papierfiltrate auf Meerschweinchen ist eine intensivere als die mit dem Kerzenfiltrat. Nach Injektion von 0,5 ccm werden die Tiere nach zwei Stunden bereits krank und gehen innerhalb 24 Stunden zugrunde.

Es ist auffallend, daß bei intravenöser Einspritzung der Tod der Tiere nicht früher eintritt als bei Einverleibung des Giftes in die Bauchhöhle (Kraus). Von der Subkutis aus ist die Wirksamkeit eine geringere. Kaninchen sind weniger empfindlich als Meerschweine, ebenso verhalten sich Mäuse, Tauben und Hühner. Diese geringere Empfindlichkeit der eben genannten Tiere besteht nur für Gifte aus echten Cholera-vibrionen. Die Gifte anderer Vibrionen [El Tor¹⁾] sind sowohl für Meerschweinchen als auch Kaninchen und Vögel tödlichwirkend.

Außerdem besteht noch ein prinzipieller Unterschied in der Wirkungsweise der Kulturfiltrate der echten Cholera-vibrionen und anderer Vibrionen. Letztere rufen schon nach intravenöser Einverleibung des Giftes in einigen Minuten den Tod der Versuchstiere hervor, während die Tiere bei gleicher Impfmethode mit Filtrat aus echten Cholera-bakterien erst nach einigen Stunden sterben.

¹⁾ Kraus will den Cholera-stamm „El Tor“ nicht als echten Cholera-stamm gelten lassen wegen seiner Fähigkeit, besonders viel Hämolyse zu bilden.

Die große Labilität der Cholera-toxine aus den flüssigen Nährmedien wird auch von Kraus bestätigt. Die Unbeständigkeit dieses Giftes erinnert an die des flüssigen Tetanustoxins, sowie an die des Typhusgiftes.

In welcher Weise die löslichen Gifte aus den Cholera-bakterien entstehen, ist nicht bekannt. Ebensowenig wie für die Dysenterie- und Typhustoxine ist auch für das Cholera-toxin der sichere Beweis nicht erbracht, daß es ein echtes Sekretionsprodukt der Bazillen darstellt, oder ob es erst durch den Zerfall der Bakterien frei wird. Mit den Toxinen, die, wie z. B. das Diphtheriegift, als Sekretionsprodukte aufzufassen sind, haben diese Gifte die Eigenschaft gemeinsam, im Organismus spezifische Antitoxine hervorzurufen.

Literatur: Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, 1906. Brau und Denier, ebenda 1896. Catani, Deutsche med. Wochenschr. 1886. Gamaleia, Arch. de méd. exper. 1892. Gruber und Wiener, Wien. klin. Wochenschr. 1892; Arch. f. Hyg. 1892. Hahn, Münch. med. Wochenschr. 1906. Hetsch, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. path. Mikroorg. 1911. Hueppe und Scholl, Deutsche med. Wochenschr. 1891; Arch. f. Hyg. 1892. Koch, Berl. klin. Wochenschr. 1884. Kolle und Schürmann, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1911. Klemperer, Berl. klin. Wochenschr. 1892. Kraus, Zentralbl. f. Bakt. 1903 u. 1906. Derselbe, Wien. klin. Wochenschr. 1906. Kraus und Pribram, ebenda 1905. Dieselben, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Kraus und Prantschoff, Wien. klin. Wochenschr. 1906. Dieselben, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Kraus und Doerr, Zeitschr. f. Hyg. 1906. Macfadyen, Zentralbl. f. Bakt. 1907. Metschnikoff, Roux und Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur 1896. Petri, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1890. Pfeiffer, Ztschr. f. Hyg. 11, 15, 18 u. 20. Pfeiffer u. Wassermann, ebenda 14 (1893). Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1895. Rothberger, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Salimbeni, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1911. Wassermann, Ztschr. f. Hyg. 1893. Wesbrook, Ann. d. l'Inst. Pasteur 1894.

b) Das Choleraantitoxin (Antiendotoxin).

Das Choleraserum wird in der Regel durch Immunisierung von Pferden gewonnen. Rinder eignen sich zwar besser zur Gewinnung des Choleraserums, sie vertragen das Gift besser als Pferde und können sich an solche Giftmengen gewöhnen, wie sie Pferden niemals ohne Schaden gegeben werden können. Auch liefern sie ein viel stärkeres Serum als Pferde. Sie sind jedoch weniger blutreich als Pferde und ihr Serum ist an und für sich toxisch,

infolgedessen wenig geeignet zur Serumbehandlung am Menschen. Die Cholera-toxine werden intravenös und subkutan einverleibt. Der ersteren Injektionsweise bedienen sich hauptsächlich Roux, Metschnikoff und Salimbeni, der letzteren Kraus im Wiener serotherapeutischen Institut. Nach Salimbeni verdient von Anfang an die intravenöse Injektion des Giftes den Vorzug, weil das Toxin, vor allem das aus flüssigen Kulturen gewonnene, auch in kleinen Mengen subkutan schlecht resorbiert wird und immer große und langandauernde Ödeme zur Folge hat. Zur Injektion werden Gifte verwandt, die entweder aus flüssigen Kulturen oder aus Agarkulturen stammen und eine gewisse Toxizität haben. Nicht alle Cholera-bakterien eignen sich zur Herstellung des Giftes, es bedarf der Züchtung besonders toxischer Vibrien.

Die Behandlung der Pferde beginnt mit kleinen Dosen, nach Salimbeni mit 1 bis 2 ccm. Unter allmählicher Steigerung werden dann die intravenösen Toxingaben wiederholt unter Einhaltung von bestimmten Zwischenzeiten, die meist eine Woche betragen nach dem vollständigen Abfall der Temperatur. Die Wärme-reaktion und Gewichtsverhältnisse der Tiere geben die Fingerzeige für die Dauer der Intervalle und die Höhe der Dosis bei der nachfolgenden Einspritzung. Hält das Fieber längere Zeit an, so wird man den Zwischenraum bis zur nächsten Injektion größer wählen und mit der Dosis heruntergehen, jedenfalls nicht mehr injizieren als das letzte Mal. Unter Beobachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen bringt man die Tiere schließlich dazu, sich an ein Maximum der Toxingabe zu gewöhnen. Dieses Maximum darf jedoch nie überschritten werden, sonst gehen die Tiere ein. Als Höchstdosis des Giftes sind etwa 65 ccm aus flüssigen Kulturen und 80 ccm aus festen Kulturen stammendes Toxin zu betrachten (Salimbeni). Von gut immunisierten Tieren werden diese Dosen alle acht Tage recht gut vertragen. Nach Salimbeni wird mittels der intravenösen Einverleibungsart eine Immunität rascher erzielt und ein hochwertigeres Serum gewonnen.

Nach Kraus lassen sich Pferde auch gut von der Subkutis aus immunisieren. Die Tiere erhielten Bouillonkulturfiltrate, Agarkulturen oder Extrakte aus Agarkulturen subkutan. Man fängt mit 0,5 bis 1,0 ccm Toxin an und setzt die Behandlung in Intervallen von sechs bis acht Tagen unter langsamer Steigerung der Dosis fort. Einem Pferd wurden im ganzen 907 ccm Gift während einer

zehnmonatigen Immunisierung subkutan einverleibt. 5, 7, 10, 25, 30, 30, 40, 40, 30, 30, 20, 30, 40, 40, 40, 50, 60, 60, 20, 20, 30, 40, 30 ccm erhielt das Pferd in sechs- bis achttägigen Zwischenräumen subkutan (Kraus). Metschnikoff, Roux und Salimbeni konnten nach einer Behandlung von sechs Monaten 200 ccm Toxin als Einzelgabe verabreichen.

Dieselben Autoren hatten nach dreimonatiger Immunisierung ein Serum erzeugt, welches in Mengen von 3 ccm die eineinhalbfache dosis letalis neutralisierte. Nach weiteren drei Monaten wirkte das Serum bereits in einer Dose von 1 ccm gegen die vierfache letale Dosis, $\frac{1}{150}$ ccm dieses antitoxischen Serums schützte auch gegen die Infektion mit der einfachen tödlichen Dosis virulenter Kultur.

Metschnikoff, Roux und Salimbeni vertreten die Ansicht, daß die Immunisierung mit lebenden oder abgetöteten Cholera-vibrionen nicht identisch ist mit der mit Toxinen. Ein mit Bakterien dargestelltes Serum wirkte nicht antitoxisch, sondern bloß antiinfektiös, Phagozytose befördernd. Aus den Untersuchungen von Brau und Denier, Hahn, Macfadyen sowie Kraus und seiner Mitarbeiter geht jedoch hervor, daß es hauptsächlich darauf ankommt, ob zur Behandlung der serumliefernden Tiere toxische Stämme oder solche, die wenig oder gar kein Toxin produzieren, Verwendung finden. Mit Bouillonkulturfiltraten und Agarkulturen giftbildender Cholera-bakterien wird antitoxisches, bakteriolytisches und agglutinierendes Serum gewonnen. Mit Agarkulturen nicht toxischer oder schwach toxinproduzierender Vibrionen erzeugt man hauptsächlich bakteriolytische und bakteriotrope Immunkörper, die antiinfektiös wirken, und keine Antitoxine.

Die Pferde sind sehr empfindlich gegen die Toxine der Cholera-vibrionen. Schon auf kleine Dosen reagieren sie mit Wärme-reaktion. Die Temperaturerhöhung beträgt durchschnittlich 2 bis 2,5° bei intravenöser Applikation (Salimbeni), bei subkutaner Injektion schwankt sie zwischen 38,8 und 40,1 (Kraus), sie beginnt einige Stunden nach der Einspritzung und geht nach zwei Tagen gewöhnlich zurück. Nach Salimbeni erreicht das Fieber gegen die siebente Stunde nach der Injektion den Höhepunkt, um am folgenden Tage völlig zu verschwinden, manchmal dauert es aber einige Tage an. Die Impfreaktion besteht außerdem in Störungen des Allgemeinbefindens wie Fraßunlust mit Gewichts-

verlust und Niedergeschlagenheit. Sind die Impfdosen nicht allzu hohe gewesen, so erholen sich die Tiere bald wieder. Lokal tritt ein Ödem auf, welches fünf bis sechs Tage andauert. Bei Pferden kommt es trotz längerer Behandlung zu Temperatursteigerungen.

Der Aderlaß zwecks Serumbereitung wird 12 bis 16 Tage nach der letzten Injektion vorgenommen.

Eine einheitliche Eichmethode für das Choleraserum gibt es noch nicht. Roux, Metschnikoff und Salimbeni prüften den antitoxischen Wert ihrer Sera, indem sie zu gleichbleibenden Serumdosen wechselnde Toxinmengen zufügten und diese verschiedenen Mischungen Meerschweinchen von verschiedenem Gewicht subkutan injizierten. Nach den Resultaten stellten sie die Wirkungsweise fest und geben den Titer für ein bestimmtes Serum in der Weise an, daß 1 ccm des Serums imstande ist, gegen eine bestimmte Toxindosis zu schützen. Diese Methode ist sehr einfach, die Resultate sind aber sehr ungleichmäßig, da sich die antitoxische Kraft des Serums als sehr variabel erwies. Die Neutralisation des Toxins durch das Antitoxin folgt nicht dem Gesetze der Multipla. Man braucht um so mehr Antitoxin zum Neutralisieren, je größer die absolute Toxinmenge ist. So genügt 1 ccm des Serums, fünf bis sechs Dosen eines Toxins unwirksam zu machen, dessen tödliche Dosis für ein Meerschwein 0,5 ccm betrug, vier Toxindosen werden neutralisiert, wenn das Gift in Mengen von 1 ccm tödlich wirkte, aber nur zwei bis drei bei einem Gifte, dessen dosis letalis 2 ccm war. Es wurde weiter beobachtet, daß vier Giftdosen verhältnismäßig größere Serummengen zur Neutralisation brauchen als zwei Dosen desselben Toxins.

Konstantere Resultate erzielte Salimbeni mit einem Toxin, welches am siebenten Tage aus flüssiger Kultur durch Filtration gewonnen wurde. Es wird ein Toxin von mittlerer Stärke gewählt, welches in Mengen von 1 ccm bei subkutaner Anwendung in 12 bis 18 Stunden tötet. Zu den konstanten Giftdosen werden abgestufte Mengen des zu prüfenden Serums hinzugefügt, 10 Minuten *in vitro* in Kontakt gelassen und dann Meerschweinchen subkutan einverleibt. Zu jeder Versuchsreihe werden vier Meerschweinchen benutzt, und zwar erhalten zwei Meerschweinchen die einfache (ohne Serum), die anderen beiden die doppelte tödliche Toxinmenge im Gemisch mit Serum. Ein Serum, dessen Titer beispielsweise 0,15 beträgt, ist also imstande, durch 0,15 ccm nach 10 Minuten

Kontakt *in vitro* zwei Dosen eines Giftes unwirksam zu machen, von dem 1 ccm für ein Meerschwein von etwa 250 g die letale Dosis darstellt.

Macfadyen verwendet als Testgift die mittels der Gefrier-
methode gewonnenen endozellulären Gifte und läßt die Serum-
endotoxinmischungen vor der Injektion eine halbe Stunde bei 37°
stehen. Auch Hahn und Carrière u. Tomarkin prüften das
Neutralisationsvermögen ihrer Sera gegenüber Endotoxinen. Die
Wertbemessung der antiendotoxischen Wirksamkeit ist sehr
schwierig wegen der geringen Neutralisationsfähigkeit der Sera
und der verschiedenen Resistenz der Versuchstiere gegenüber den
Cholera giften. Auch bei dieser Prüfungsmethode hat das Gesetz
der Multiplen keine Geltung. Carrière und Tomarkin suchten
außerdem den Wert ihrer Sera gegenüber der intraperitonealen
Infektion mit lebenden Cholera bakterien zu ermitteln.

Kraus verlangt, daß das Choleraserum sowohl *in vitro* als
auch bei getrennter Injektion des Serums und Toxins ausgewertet
wird (s. auch Dysenterieserum). Die Injektion wird bei Kaninchen
intravenös und bei Meerschweinen intraperitoneal vorgenommen.
Das Neutralisationsvermögen eines Serums *in vitro* geht nicht
analog mit dem bei getrennter Injektion, ersteres entsteht sehr
bald bei der Immunisierung, letzteres später, schwächt aber bei
längerem Stehen des Serums rascher ab. Der Heilwert des Cholera-
antitoxins kann aber nur mit Hilfe der weniger giftempfindlichen
Mäuse festgestellt werden, ausnahmsweise bei anderen Tieren mit
einem schwächeren Gifte. Kraus konnte weiße Mäuse, sowohl die
mit Toxin vergifteten als auch die mit Kultur infizierten, noch
nach einer Stunde vor dem Tode retten. Es genügten 0,05 ccm
Serum, um die intraperitoneal gegebene fünffach tödliche Toxin-
dosis unschädlich zu machen. Ähnliche Ergebnisse bekam er in
Versuchen, in welchen mit lebenden Kulturen infiziert wurde.

Literatur: Salimbeni, Kraus-Levaditi, Handbuch d. Technik usw.
1911; s. auch Literaturangabe unter „Das Cholera toxin“.

Diphtherieserum.

a) Das Diphtherietoxin.

Das Diphtherietoxin wird durch Züchtung von besonders
toxigenen Diphtheriekulturen auf flüssigen Nährmedien gewonnen.
Alte Laboratoriumskulturen scheinen besseres Gift zu entwickeln

als diejenigen, welche direkt von einem Diphtheriepatienten gezüchtet worden sind. Zweckmäßig züchtet man die Kulturen immer auf einem Nährboden fort, von dem man weiß, daß der Bazillus darin Toxin bildet. Verliert der Bazillus bei längerer Fortzüchtung seine giftbildende Eigenschaft, so entnimmt man ihn mit Vorteil einer alten giftigen Kultur (v. Behring). Zu diesem Zweck hält man sich stets einen Vorrat älterer Kulturen. Ein sicheres Verfahren zur Erhaltung der toxigenen Kraft einer Kultur gibt es wohl nicht. Man versuchte noch die Giftbildung einer Kultur dadurch zu erhalten, daß man täglich auf Agar, Bouillon oder Serum überimpfte (Rosenau) oder die Kulturen nach zweitägigem Bouillonwachstum im Brutschrank fünf Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrte, um sie dann von neuem umzupflanzen. Spronck läßt die Kultur auf erstarrtem Loefflerschen Serum 24 Stunden bei 35° wachsen und bewahrt sie dann vor Licht geschützt auf. Zu jeder Toxinbereitung wird zunächst ein neues Serumröhrchen angelegt und von da in dieselbe Nährlösung geimpft, die zur Toxingewinnung dienen soll. Die Kölbchen werden sodann mit der Haut vom Proberöhrchen geimpft.

Man hat auch versucht, durch Tierpassagen die Giftbildung der Kulturen zu steigern, doch besteht kein direktes Verhältnis zwischen Virulenz und toxigenem Vermögen eines Diphtheriebazillus.

Die Idee, durch Symbiose mit Streptokokken die Giftbildung zu steigern, hat praktische Bedeutung nicht bekommen (Roux und Yersin, Funck, Gilbert und Hilbert, Bernheim, v. Dungern, Th. Smith u. a.).

Wenn auch von einigen Autoren Pferdefleischbouillon mit Erfolg angewandt worden ist (Aronson, Marenghi), so ist doch der gebräuchlichste Nährboden Bouillon aus Kalbfleisch oder Rindfleisch mit einem Zusatz von 0,5 bis 4 Proz. Pepton.

Von größter Wichtigkeit für die Entwicklung der Diphtheriebazillen und für eine gute Giftbildung ist die Reaktion des Nährbodens. Saure Kulturen sind atoxisch, man muß daher der Bouillon eine bestimmte Menge Alkali (NaOH oder KOH) zusetzen, um die Möglichkeit einer Giftbildung zu erhalten. Madsen gibt in einer Tabelle die Menge Alkali an, welche nötig ist, damit die Bouillon alkalisch bleibt.

Tabelle nach Madsen.

Nr. des Kölbchens	Vor der Impfung		Nach 3 Wochen bei 37°		Toxität
	Menge des pro Liter zugesetzten Normalnatrons ccm	Titer nach der Sterilisation ccm	Reaktion auf Lackmus	Titer ccm	
1	0	21	sauer	38	} atoxisch
2	0	21	"	35,5	
3	5	16,5	"	32	
4	5	16,5	"	33	
5	10	11	alkalisch	6	
6	10	11	"	6	} toxisch
7	12,5	9	"	4,5	
8	12,5	9	"	6	
9	15	6	"	3	
10	15	6	"	5	

Die Kölbchen mit weniger als 10 ccm Natronlauge waren nach längerem Wachstum stark sauer und ungiftig, dagegen alle mit einem Zusatz von 10 ccm Natronlauge und darüber alkalisch und toxisch.

Am meisten wird die Methode von Park und Williams zur Alkalisierung der Bouillon angewandt. Die Bouillon wird zuerst mit Lackmustinktur als Indikator neutralisiert. Am besten benutzt man ein Kontrollröhrchen, welches man mit einer dünnen Lackmuslösung füllt und mit einem Bouillonröhrchen vergleicht, dem man Natronlauge zugegeben hat. Ist die Bouillon dem Lackmus gegenüber neutral, so setzt man noch pro Liter 7 ccm Natronlauge zu. Eine auf diese Weise neutralisierte Bouillon bläut rotes Lackmuspapier, gibt aber keine Rotfärbung mit Phenolphthalein.

Nach den Untersuchungen von Roux und Yersin bedingt das Wachstum der Diphtheriebazillen auf leicht alkalischer Kalbfleischbouillon eine Veränderung der Reaktion des Nährbodens, welche anfangs meist sauer, nach einiger Zeit aber alkalisch wird. Erst in diesem Stadium nimmt die Kultur einen deutlich toxischen Charakter an.

Spronck hat zuerst darauf hingewiesen, daß eine verschiedene Entwicklung der Diphtheriekulturen möglich ist. Er unterscheidet drei Typen:

Type A. Mit zunehmendem Säuregrad der Kultur wird das Wachstum der Bazillen spärlicher, sie fallen zu Boden, und die überstehende Flüssigkeit erscheint klarer und ist ungiftig. Die Bazillen gehen allmählich zugrunde. Solange aber noch lebende Bazillen vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, daß die Bouillon alkalisch und toxisch wird.

Type B. Die Bouillon wird auch anfangs nicht sauer, sondern mehr und mehr alkalisch. Bei üppigem Wachstum überzieht sich die Oberfläche mit einer dichten Haut und die Flüssigkeit zeigt reichlichen Bodensatz. Nach zwei bis drei Wochen wird der Nährboden immer klarer, jedoch selten so klar wie bei saurer Reaktion. Diese Kulturen sind sehr toxisch.

Type C. Bei schnell eintretender saurer Reaktion der Nährbouillon wird das Wachstum spärlich, die Flüssigkeit ist klar. Allmählich wird die saure Reaktion schwächer und schlägt zuletzt in die alkalische um. Bei reichlichem Wachstum bildet sich jetzt eine Oberfläche und ein Bodensatz. Die Kulturen werden auch toxisch, aber nicht so rasch und nicht in demselben Grade wie beim Typus B.

Dieses Wachstum in verschiedener Weise läßt sich mit dem verschiedenen Gehalt der Nährlösung an Kohlehydraten erklären; diese werden unter Säurebildung gespalten und hemmen dadurch das Wachstum der Bazillen. Sind nicht zuviel Kohlehydrate vorhanden, so hört die Säurebildung bald auf, und das weitere Wachstum der Kulturen findet statt unter Bildung von alkalischen, besonders ammoniakalischen Produkten.

Daß der hohe Säuregrad einer Bouillon an dem spärlichen Wachstum und mithin der schlechten Giftbildung schuld ist, läßt sich damit beweisen, daß eine Bouillon mit schlechtem Wachstum, die, mit Natronlauge neutralisiert, von neuem beimpft wird, üppiges Gedeihen der Kultur gestattet mit einer kräftigen Toxinproduktion.

Die Quelle der Säure ist der Muskelzucker, welcher sich nach dem Tode aus dem Glykogen bildet. Um diese unerwünschte Säurebildung zu vermeiden, hat man einerseits empfohlen, ganz frisches Fleisch zu benutzen (Nicolle) oder so lange mit der Bouillonbereitung zu warten, bis der Muskelzucker vergärt ist (Spronck). Dies wird erreicht durch etwa 20-stündiges Stehenlassen bei 35°; ein Hefezusatz zu dem Fleischinfus ist unnötig

(Martin). Th. Smith verwandte eine 12- bis 14-stündige Kultur von *Bacillus coli*, womit die Bouillon eine Nacht im Brutschrank blieb. Er hält Dextrose (etwa 0,2 Proz.) an und für sich nicht für schädlich, sondern nur die sauren Produkte des Muskelzuckers. Diese sind entweder von denen der Dextrose verschieden oder die Bouillon enthält hemmende Stoffe, welche durch die Gärung mit *Bacillus coli* beseitigt werden.

Spronck, v. Turenhout unterdrückten die schädliche starke Säurebildung durch Zugabe von etwas kohlen saurem Kalk zu den Kulturen, Ruete mittels kleiner Marmorstücke, Mittel, welche die Säure, wie sie sich bildet, binden und dafür sorgen, daß die Kultur alkalisch wird.

In alkalischen Kulturen ist das Wachstum der Diphtheriebazillen mannigfaltig und die Toxinproduktion verschieden. In vielen bildet sich bereits vom zweiten Tage ab eine Haut, die mit jedem Tage dicker wird. Die Bouillon ist dabei wenig getrübt mit geringem Bodensatz. Zuweilen ist der Nährboden in den ersten Tagen mit zunehmender Azidität diffus getrübt wie bei den sauren Kulturen, erst nach einigen Tagen (vier bis fünf) schlägt die Reaktion um und die Bildung einer Oberfläche und eines Bodensatzes beginnt. Ausnahmsweise kann die Bouillon so alkalisch werden, daß sie mit Phenolphthalein Rotfärbung gibt. Mit dem Aufhören des Wachstums der Bazillen fallen dieselben zu Boden und die Flüssigkeit klärt sich. Da das Diphtheriegift ein echtes Sekretionsprodukt des Diphtheriebazillus ist, hört die Giftbildung naturgemäß dann auf, wenn die Bazillen nicht mehr wachsen; sie ist eine geringe bei schlechtem Fortkommen der Kultur. Auch aus diesem Grunde sind die sauren Kulturen atoxisch. Gobbet sah die Toxizitäts- und Alkaleszenzkurven anfangs in der Kultur parallel steigen, auf einem gewissen Punkte aber auseinandergehen; von hier ab steigt die Alkaleszenzkurve weiter, während die Toxizitätskurve wegen der starken Alkaleszenz des Nährmediums absinkt. In der Regel wird man also die stärkste Giftbildung nicht in den stärksten alkalischen Kulturen antreffen, die allzu starke Alkalibildung scheint vielmehr das Gift schädlich zu beeinflussen. Während in der sauren Kultur wegen des schlechten Wachstums der Bazillen wenig Toxin gebildet wird und diese geringe Menge in der sauren Flüssigkeit noch modifiziert wird, ist die alkalische Reaktion des Nährbodens Bedingung für ein

gutes Wachstum der Bazillen und mithin für eine reichliche Toxinbildung, es ist jedoch der Grad der Giftigkeit einer Kultur unabhängig von der Stärke der Alkaleszenz.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, für die Diphtheriegiftgewinnung besonders geeignete Methoden ausfindig zu machen. So gab Martin eine Bouillon an, die aus zwei Teilen bereitet wird: aus einem Fleischaufguß und aus einer Peptonlösung.

1. Die Peptonlösung. Die Mucosa und Muscularis von fünf Schweinemagen werden fein gehackt und im Verhältnis von 200 g zu 10 g reiner Salzsäure (20proz.) und 1000 g Wasser 12 bis 24 Stunden bei 50° digeriert. Bei dieser Temperatur wird das Gewebe durch das Pepsin der Mucosa in Pepton umgewandelt. Das Pepsin wird hierauf durch Erhitzen auf 100° zerstört und die Flüssigkeit durch Gaze oder durch eine dünne Schicht loser, entfetteter Watte filtriert. Pro 1000 ccm Filtrat setzt man 2 ccm Essigsäure zu, erhitzt die Flüssigkeit, alkalisiert bei 80° mit Natronlauge und filtriert durch Papier.

2. Der Fleischinfus. 500 g gehacktes Kalbfleisch werden mit 1 Liter Wasser gemischt und 20 Stunden im Thermostaten bei 35° gelassen, wodurch der Muskelzucker vergärt. Es wird ausgepreßt und 5 g Kochsalz zugegeben.

1 Liter des Fleischinfuses wird mit 1 Liter des Schweinemagenextraktes vermischt und die Mischung auf 70° erwärmt, bis die Eiweißstoffe gerinnen. Dann wird durch Papier filtriert und in der Weise alkalisiert, daß man zuerst so viel Natronlauge zugeibt, bis die Flüssigkeit gegen Lackmus neutral ist, und dann noch pro Liter 7 ccm Natronlauge zusetzt.

Die Bouillon wird nunmehr in Kolben verteilt und sterilisiert. Die Sterilisierung durch Filtration durch Chamberlandkerzen verdient den Vorzug.

Gute Resultate soll ein Nährboden von Th. Smith geben: Von Fett und Sehnen befreites Fleisch wird mittels Fleischpressers ausgepreßt, und der Preßsaft wird aufgefangen. Das Fleisch, dem das doppelte Gewicht Wasser zugesetzt ist, wird 24 Stunden bei 15° stehen gelassen und dann durch Gaze filtriert und kolibriert. Der so gewonnene Fleischaufguß wird gewogen und die Reaktion untersucht (in der Regel 3 bis 4 Proz. Azidität). Um für das Wachstum von Colibazillen günstige Bedingungen zu schaffen, wird bis 1,5 Proz. Azidität auf Phenolphthalein Natronlauge zugesetzt.

Nun werden pro Liter Fleischinfus 10 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur von *Bacillus coli communis* zugesetzt und 24 Stunden bei 37° bebrütet. Jedem Liter gibt man dann ein Eiklar zu und kocht 20 Minuten vorsichtig im Wasserbad, so daß das Eiweiß gerinnt. Das Ganze wird sodann warm durch Papier filtriert und dem Filtrat so viel Wasser zugegossen, bis das ursprüngliche Gewicht des Infuses wieder erreicht ist.

Nach Prüfung der Reaktion neutralisiert man mit Natronlauge auf eine Azidität von 0,5 Proz., setzt 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. NaCl und 0,1 Proz. Dextrose zu. Darauf erwärmt man wieder 20 Minuten im strömenden Dampf im offenen Autoklaven und neutralisiert nochmals, bis die Azidität der Flüssigkeit genau 0,5 Proz. ist. Der Nährboden wird durch Papier filtriert und in Flaschen gefüllt, die während 20 Minuten im Autoklaven auf 120° sterilisiert werden und nach dem Abkühlen zur Impfung mit Diphtheriebazillen geeignet sind. Gleichzeitig sterilisiert man einige Reagenzgläser mit Bouillon, um die endgültige Reaktion zu bestimmen, die während der Sterilisation um etwa 0,1 Proz. steigt.

Zum Nachweis, ob kein Muskelzucker mehr vorhanden ist, füllt man vor dem Zusatz von Dextrose einige Gärungskölbchen mit Bouillon und beschickt sie mit *Bacillus coli*. Findet während 48 Stunden im Brutschrank keine Gasproduktion statt, so war aller Muskelzucker verschwunden.

Ein anderes viel benutztes Nährmedium ist das von Dean angegebene. Glutaeenmuskulatur wird entweder in völlig frischem Zustande oder nach 7- bis 12-tägigem Aufenthalt im Kühlraum bei 8 bis 14° von Fett und Faszien befreit und in einer Fleischhackmaschine fein zerkleinert. Zu 500 g Fleisch braucht man 1 Liter Leitungswasser. In einem emaillierten Topf mit losem Deckel läßt man das Gemisch 1½ bis 2 Stunden kochen. Darauf wird durch schwedisches Filtrierpapier filtriert und das Fleisch mittels Kartoffelpressers ausgepreßt. Darauf werden 2 Proz. Pepton Witte und 0,5 Proz. Kochsalz zugesetzt und eine Stunde auf 100° erhitzt. Nach der Filtration macht man die Flüssigkeit auf Lackmus leicht alkalisch und setzt noch 7 ccm Normalnatronlauge pro Liter zu. Das Kulturmedium wird aufs neue eine Stunde auf 100° erwärmt und filtriert. Nachher wird die Bouillon in Erlenmeyerkolben verteilt und 20 Minuten bis 120° sterilisiert.

Der Nährboden von Spronck wird unter Benutzung von Handelshefe hergestellt. 1 kg Hefe wird mit 5 Liter Wasser angerührt und unter Umrühren 20 Minuten lang gekocht. Darauf wird die Abkochung in hohe Gläser gegossen und 24 Stunden stehen gelassen, wobei die Hefezellen zu Boden sinken und beim Abgießen der Flüssigkeit im Gefäß zurückbleiben. Nach dem Zusatz von 0,5 Proz. Kochsalz und 2 Proz. Pepton Witte wird die leicht saure Flüssigkeit mit Natronlauge neutralisiert und noch 7 ccm Normalnatronlauge pro Liter hinzugefügt. Der Toxin-nährboden wird jetzt erhitzt, durch Papier filtriert, in Kölbchen verteilt und bei 120° sterilisiert. Die Papierfiltration kann man auch weglassen, wenn sie besondere Schwierigkeiten bereitet.

Durch Züchtung bei 35° auf diesem Nährmedium hat Spronck ein 20-mal wirksames Toxin erhalten als mittels gewöhnlicher Bouillon von vergärem Fleisch. Die Diphtheriebazillen wachsen schnell unter Häutchenbildung. Das Maximum der Giftbildung ist schon nach fünf Tagen erreicht.

Zinno, welcher die Giftbildung in verschiedenen Organ-extrakten untersuchte, fand einen Gehirnextrakt besonders geeignet zur Züchtung von Diphtheriebazillen.

Rinder- und Lammsgehirne von mittlerer Größe werden fein zerrieben und mit doppelt soviel Wasser während 24 Stunden bei 8 bis 10° mazeriert. Die Mazeration wird teilweise ein bis zwei Stunden lang im Kochschen Apparat gehalten. Ein anderer Teil des Gemisches wird mit salzsaurem Pepsin (1 Proz. Pepsin. pur. und 1 Proz. HCl) versetzt und im Brutschrank bei 40° 15 bis 18 Stunden der künstlichen Verdauung überlassen. Nun kocht man und neutralisiert. Nach erneutem Kochen wird filtriert und die Bouillon zur Sterilisation in Kolben verteilt.

Zinno erhielt mit der Gehirnbouillon ein viel stärkeres Gift als in gewöhnlicher Fleischbrühe.

v. Dungern und Cartwright Wood züchteten die Diphtheriebazillen in Substraten mit Zusatz von nativem Eiweiß, v. Dungern verglich die Filtrate aus drei 14 Tage alten Kulturen von Bouillon, Aszites und Aszitesbouillon ($\frac{2}{3}$ Asz. + $\frac{1}{3}$ Bouill.) und fand die Asziteskultur dreimal so giftig wie die Peptonbouillonkultur, trotzdem diese ein reichlicheres Wachstum aufwies. Die Toxizität des Filtrates der Aszitesbouillon war noch viel größer, mindestens zwölfmal so stark. Madsen konnte diese Befunde nicht be-

stätigen, er fand zuweilen sogar in der Aszitesbouillon ein weniger gutes Gift als in gewöhnlicher Bouillon.

Wood empfahl speziell zur Antitoxinbereitung ein Serumtoxin, das in folgender Weise herzustellen ist:

Man impft gewöhnliche alkalische Peptonbouillon mit einem virulenten Diphtheriebazillus und stellt die Kultur eine Woche oder länger in den Thermostaten bei 37°. Nach einem Zusatz von 15 bis 30 Proz. sterilem Pferdeserum zur Kultur bleibt diese nochmals vier bis sechs Wochen im Brutschrank (37°). Die Bouillon wird darauf eine Stunde auf 65° erwärmt und durch Chamberlandkerzen filtriert.

Es sollen bessere Resultate erzielt werden, wenn das Serumtoxin mit Serum der Tierart zubereitet wird, die immunisiert werden soll (homoioplasmatisches Serumtoxin), als wenn Serum einer anderen Tierart benutzt wird (heteroplasmatisch).

Hida stellte Untersuchungen in der Richtung an, ob Zusätze von Gemüse und Wurzeln zu den Nährsubstraten eine die Giftbildung fördernde Wirkung ausüben. Dabei ergab sich, daß der Extrakt der japanischen Klettenwurzel (*Arctium lappa*, Kompositen) die Produktion eines hochgiftigen Toxins fördert. Der Nährboden wird folgendermaßen zubereitet:

500 g gehacktes Pferdefleisch, 40 g fein gehackte Klettenwurzel werden mit 1 Liter Wasser zwei Stunden lang gekocht und filtriert. Dem bläulichen Filtrate werden 20 g Pepton Witte, 5 g Kochsalz zugesetzt und unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wird unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator mit Alkali neutralisiert. Schließlich gibt man noch 6 ccm einer normalen Alkalilösung hinzu. Das Nährmedium wird nochmals eine Stunde lang gekocht, dann abgekühlt, filtriert, in Kölbchen gefüllt und im Dampftopf sterilisiert.

Auf die Oberfläche dieser Bouillon bringt Hida vorsichtig eine Öse der eintägigen Diphtheriekultur und läßt die geimpften Kölbchen entweder fünf Tage bei 35° und weitere fünf Tage bei 32° oder einfach zehn Tage lang bei einer Temperatur von 33°.

Die Giftigkeit dieser Kultur soll durchschnittlich so stark sein, daß 0,001 ccm des Filtrates ein 250 g schweres Meer-schweinchen innerhalb vier Tagen tötet. Manchmal ist die Toxizität etwas geringer, zuweilen stärker.

Diese Begünstigung der Giftbildung kommt jedenfalls nur der japanischen Klettenwurzel zu. Ich habe den Nährboden von Hida öfters hergestellt unter Benutzung unserer Klettenwurzel und erhielt regelmäßig viel bessere Gifte mit der Bouillon von Dean als mit der Nährflüssigkeit von Hida. Ich bekam nicht ein einziges Mal ein Toxin, von dem 0,05 ccm ein Meerschwein von 250 g tötete.

Um das Gift möglichst rein zu erhalten, hatte Uschinsky die Diphtheriebazillen auf einem eiweißfreien Nährboden von bekannter Zusammensetzung gezüchtet. Das Substrat enthielt folgende Bestandteile:

Wasser	1000
Glyzerin	30—40
Chlornatrium	5—7
Chlorcalcium	0,1
Magnesiumsulfat	0,2—0,4
Dikaliumphosphat	2—2,5
Ammonium lacticum	6—7
Natrium asparaginicum	3,4

Frisch vom Menschen gezüchtete Bazillen eignen sich nicht zur Züchtung auf diesem Medium, dagegen sollen ältere Laboratoriumskulturen angeblich ebenso üppig gedeihen wie auf Fleischbouillon, namentlich wenn sie mit einer Spur von Eisen versetzt sind. Für Stämme, die nicht gut wachsen, setzt man anfangs etwas Bouillon zum Nährboden zu und vermindert die Menge allmählich. Uschinsky bekam nach vier- bis sechswöchigem Wachstum in dieser Weise Gifte, die die gewöhnlichen Eiweißreaktionen nicht zeigten und in Mengen von 1,5 ccm Meerschweine von mittlerem Gewicht in 36 bis 40 Stunden in typischer Weise töteten.

Weitere Verfahren, eiweißfreies Toxin zu gewinnen, stammen von Guinochet (Züchtung auf eiweißfreiem Harn) und von Pröscher. Andere Forscher dagegen, wie C. Fränkel, Hougounencq und Doyon erhielten kein nennenswertes Wachstum auf eiweißfreien Nährmedien. Praktischen Wert haben alle diese Nährböden von bekannter Zusammensetzung zwecks Herstellung von Giften nicht, da die erzielte Giftmenge zu gering ist.

Daß die Art des Peptons von Wichtigkeit ist, hat neuerdings Hida wieder betont, der die Bedeutung der Peptone für die Giftbildung genauer untersuchte. Der für die Diphtheriegift-

bildung wichtigste Bestandteil des Peptons ist nach Hida die Deuteroalbumose, dagegen sind Heteroalbumose, Protalbumose und Amphopepton nur von untergeordneter Bedeutung. Entsprechend seinem Gehalt an dem wichtigsten Bestandteil des Peptons ist das Pepton Witte besser zur Toxinbereitung geeignet als Pepton Gehe und Pepton Aschmann. Von Ehrlich und Madsen wird das Chapoteautpepton empfohlen.

Keiner der erwähnten Nährböden gewährt eine absolute Sicherheit, daß man einigermaßen gleichartige Toxine erhält. Die Giftbildung hängt hauptsächlich vom Diphtheriestamm ab und von besonderen Faktoren, die uns noch unbekannt sind. So kann es vorkommen, daß eine größere Anzahl Kolben, die dieselbe Bouillon enthalten und in derselben Weise beimpft sind, nach einiger Zeit große Unterschiede in der Reaktion und Toxizität aufweisen. Ein Beispiel von Madsen möge illustrieren, wie verschieden die Toxinbildung bei ein und demselben Stamm sein kann. Madsen erhielt mit dem bekannten Bazillus Park Williams Nr. 8 in den ersten acht Zubereitungen (à 20 Kolben) von Deans Bouillon ein Gift, welches in Dosen von 0,003 bis 0,005 ccm Meerschweinchen von 250 g in drei bis vier Tagen tötete. In den folgenden zehn Zubereitungen nahm die Giftigkeit bis auf 0,0015 bis 0,003 ccm zu. In den nächsten 16 Zubereitungen war die Bouillon stark alkalisch, aber so wenig toxisch, daß 0,05 ccm nicht tödlich wirkte. Darauf lieferte der Bazillus wieder einige Male ein gutes Toxin (0,002 bis 0,004 ccm), um dann 24-mal hintereinander ein Jahr lang wiederholt saure Kulturen zu bilden, aber auch die, welche alkalisch blieben, waren in Mengen von 0,05 ccm bei Meerschweinchen ohne jegliche Wirkung. Madsen, der nun annahm, daß der Stamm seine toxigene Eigenschaft verloren hatte, war gerade im Begriff, einen neuen zu verwenden, als die letzte Kultur ein so gutes Gift produzierte, daß 0,0005 ccm genügten, ein Meerschwein in vier Tagen zu töten. Nachdem er also ein ganzes Jahr ohne Giftbildung geblieben war, lieferte der Stamm plötzlich das beste Toxin, welches wohl jemals erhalten worden ist.

Die während der ganzen Zeit zur Züchtung verwandte Bouillon war die von Dean angegebene, welche stets genau auf dieselbe Weise von derselben Person zubereitet war.

Bestimmte Regeln zur sicheren Erlangung eines guten Giftes gibt es also nicht. Im allgemeinen wählt man einen besonders

toxigenen Stamm (z. B. die amerikanische Kultur) und züchtet auf einem der angegebenen besonderen Nährböden. Ist die Giftbildung durchweg eine schlechte, so wechselt man das Pepton und die Nährmedien, ändert den Peptonzusatz und Alkaleszenzgrad des Substrates und versucht es schließlich mit Tierpassagen.

Burdach erzielte virulente Kulturen durch Hundepassagen. Trumpp schickte seine Kulturen durch Meerschweine, die vorher mit untertödlichen Dosen von Diphtheriegift behandelt waren. Martin sah eine wesentliche Zunahme der Giftbildung, wenn er die Diphtheriebazillen in Kollodiumsäckchen in der Peritonealhöhle von Kaninchen züchtete.

Der Zeitpunkt, zu welchem die Kulturen den höchsten Grad der Giftigkeit erreicht haben, ist je nach dem Bazillus und dem Nährboden außerordentlich verschieden. Manche schnell wachsende Kulturen haben das Maximum der Toxizität nach vier bis sieben Tagen erreicht, andere erst nach zwei bis drei Wochen. Ist aber auch nach vier Wochen eine gute Toxinproduktion ausgeblieben, so kommt es in der Regel zu einer weiteren Giftbildung nicht mehr. Es ist von besonderer Wichtigkeit, den Zeitpunkt zu kennen, bis zu welchem die Giftentwicklung dauert, weil das bereits gebildete Toxin bei der Brutschranktemperatur abgeschwächt wird und daher aus dem Thermostaten genommen werden muß. Mit Rücksicht auf die eventuelle Schwächung des Giftes bei etwa 37° züchtet man die Kolben gewöhnlich bei einer Temperatur von 33 bis 35°. Nach Murillo soll die Diphtherietoxinkurve in den ersten 14 Tagen steigen, in der dritten Woche absinken, um dann wieder anzusteigen.

Kennt man den Höhepunkt der Giftbildung eines Stammes nicht, so muß man in gewissen Zwischenräumen Proben aus einem der Kolben herausnehmen und die Giftigkeit messen.

Zur Zeit, wo der Höhepunkt der Toxinproduktion erreicht ist, werden die Kulturen aus dem Brutschrank entfernt, die einzelnen Kolben auf Aussehen und Geruch beobachtet. Ist nichts Abnormes wahrnehmbar, so werden die Kolben mikroskopisch, eventuell mittels Kulturanlage, auf Reinheit geprüft.

Die Reaktion der einzelnen Kolben gibt uns einige Fingerzeige für die Giftigkeit der Kulturen. Reagieren die Kulturen sauer, so sind sie unbrauchbar, da sie atoxisch sind. Nur alkalische Kulturen

sind giftig. Nach Feststellung der Reaktion gießt man die brauchbaren Kolben zusammen.

Ein anderes Merkmal für eine eventuelle reichliche Giftbildung ist eine kräftige Häutchenbildung, die ein üppiges Wachstum anzeigt. Es ist das Verdienst Aronsons, die Diphtheriebazillen zum Häutchenwachstum zuerst veranlaßt und die Hautbildner als die starken Giftproduzenten entdeckt zu haben.

Zu Immunisierungszwecken wird das Gift, welches der Hauptsache nach ein Sekretionsprodukt der Bazillen ist, von diesen durch Filtration getrennt. Gewöhnlich filtriert man nur durch Papier und setzt dem Filtrat ein Antiseptikum zu, Phenol 0,5 Proz. oder Trikresol 0,3 bis 0,4 Proz. Am gebräuchlichsten ist die von Ehrlich und Wassermann empfohlene Übersichtung des Toxins mit Toluol. Unter einer 1 bis 2 cm hohen Schicht bleibt das Filtrat, wenn es eine Woche lang täglich tüchtig geschüttelt wird, in der Regel steril.

Will man ein gänzlich bakterienfreies Gift bekommen, so schiebt man das Papierfiltrat durch keimdichte Porzellankerzen.

Die Natur des Diphtheriegiftes ist noch nicht des genaueren erforscht, da es bisher trotz zahlreicher Versuche noch nicht gelungen ist, das Diphtheriegift in reinem Zustand darzustellen.

Brieger und Fränkel dampften die Bouillon auf ein Drittel des ursprünglichen Volumens ein und fällten mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols unter Zusatz von etwas Essigsäure. Nach zwölfstündigem Stehen im Kalten wurde die Mischung filtriert. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und erneut mit Alkohol gefällt. Dieses Verfahren wurde so oft (sechs- bis achtmal) wiederholt, bis die wässrige Lösung des Niederschlages ganz klar war. Zum Schluß wurde die Lösung dialysiert und im Vakuum bei 40° getrocknet. Sie erhielten so den giftigen Stoff als schneeweißes Pulver, welches in Wasser leicht löslich war. Eine solche Lösung gerann nicht beim Kochen und gab mit Bleiacetat, Chlornatrium, Natriumsulfat, Magnesiumsulfat und Salpetersäure keinen Niederschlag, zeigte aber alle anderen Eiweißreaktionen. Die Giftigkeit wurde dabei bedeutend herabgesetzt.

Wassermann und Proskauer wandten eine Modifikation dieses Verfahrens an, indem sie vor der Fällung mit Alkohol

die Salze und Peptone durch Dialyse entfernten. Der Alkoholniederschlag wurde in Wasser aufgelöst und mit Ammonsulfat gefällt. Die Auflösung und Fällung mit Alkohol wurde mehrmals wiederholt. Nach dem Eindampfen im Vakuum bei etwa 37° erhielten sie so eine Substanz, die alle Albumosenreaktionen gab und bedeutend abgeschwächt war.

Einen weiteren Fortschritt brachte die Zinkfällung von Brieger und Boer. Der Niederschlag von 1 Tl. Toxin mit 2 Tln. 1 proz. $ZnCl_2$ -Lösung wurde mit Wasser gewaschen und mit 3- bis 6proz. Ammoniumcarbonatlösung ausgeschüttelt. Der Niederschlag wurde in Ammoniumphosphatlösung aufgenommen, wobei ein Bodensatz von ungelöstem Zinkphosphat übrig blieb. Dieser ungelöste Rest wurde auf einem gehärteten Filter gesammelt und reichlich mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt. Der in Wasser lösliche Niederschlag, der mit Natriumsulfat gefällt wurde, enthielt dann das Gift als unlösliches Zinkdoppelsalz in der Fällung.

Brieger und Boer hatten in dieser Weise ein toxisches Produkt erhalten, das keine chemische Eiweißreaktion mehr gab. Sie schlossen daraus, daß das Diphtherietoxin nicht zu den Eiweißkörpern zu rechnen ist. Die Substanz, die optisch inaktiv war, konnte chemisch nicht definiert werden. Madsen deutet das Resultat von Brieger und Boer jedoch dahin, daß die eventuelle Eiweißmenge in den so dargestellten Präparaten so gering war, daß sie zwar mit unseren gewöhnlichen chemischen Reagenzien nicht mehr nachweisbar war, eine physiologische Reaktion, die viel feiner ist als die chemische, aber zum Nachweis der Nichteiweißnatur des Toxins nicht angewandt worden sei.

Nach den Untersuchungen von Walbum scheinen die von Brieger und Boer angenommenen unlöslichen Zinkdoppelsalze weder hinsichtlich des Diphtherie- noch des Tetanustoxins zu existieren. Der Niederschlag, der mit den Zinklösungen in der Bouillon (toxinhaltigen und normalen Bouillon) entsteht, besteht aus phosphorsaurem Zinkoxyd, mit welchem die Farbstoffe und Toxine zum größten Teil mechanisch mitgerissen werden. Entfernt man die Phosphorsäure in anderer Weise ($NH_4Cl + MgSO_4 + NH_3$) aus der Flüssigkeit, so gehen die Toxine nicht mit in den Niederschlag. Sie finden sich im Filtrat, das dann mit Zinksalzen keinen Niederschlag gibt.

Durch Filtration durch ausgewaschene Knochenkohle ist es Walbum gelungen, die Toxine bequem von Farb- und Eiweißstoffen zu befreien bzw. diese so zu verringern, daß eine chemische Eiweißreaktion nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Zur Konzentrierung des Diphtherietoxins kann man vorsichtiges Einengen im Vakuum bei 37° anwenden.

Roux und Yersin konzentrierten das Diphtheriegift durch Fällung mit Chlorcalcium. Eine Lösung von Chlorcalcium wird tropfenweise unter Schütteln zu einem Kulturfiltrat zugesetzt. Dabei bildet sich auf dem Boden des Gefäßes ein Niederschlag, in dem Toxin enthalten ist. Wird das Kalksalz so zugesetzt, daß nicht alles Gift mitgerissen wird, so erhält man durch erneuten Zusatz von Chlorcalcium in dem klaren Filtrat eine neue Fällung, die noch toxischer ist als die erste.

Das Toxin kann auch durch Fällung mit Aluminiumchlorid niedergeschlagen werden. Die Ausbeute von Toxin ist jedoch hierbei nicht so groß wie bei der Kalkfällung.

Ein gebräuchliches Konzentrationsverfahren des Diphtherietoxins ist das Aussalzen mit Ammonsulfat und Natriumsulfat.

Zu dem Toxin, das in hohe zylindrische Gefäße gegossen wird, setzt man reines (nicht saures) Ammoniumsulfat zu. Während lebhaften Umrührens scheidet sich das Toxin als braune Masse auf der Oberfläche aus, von wo es leicht abgeschöpft werden kann. Man muß so lange Ammonsulfat zusetzen, bis eine Probe zeigt, daß keine Fällung mehr stattfindet. Eventuell wird der Prozeß des Auflöserns und erneuten Ausfällens wiederholt. Das ausgefällte Ammonsulfat wird auf Tontellern im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Das Gift läßt sich so quantitativ ausfällen und ist lange haltbar. Wegen des hohen Gehaltes an Ammonsulfat erzeugt ein solches Gift nach dem Auflösen bei der Injektion bei den Tieren große Schmerzen und häufig sterile Abszesse, wenn es in größeren Mengen injiziert werden muß. Zweckmäßig wird das Salz vor dem Gebrauch des Toxins durch Dialyse oder Abpressen entfernt.

Martin erwärmt die gifthaltige Bouillon auf etwa 37° und sättigt sie mit Natriumsulfat. Das ausgefällte Toxin klebt an der Wand des Gefäßes, so daß die konzentrierte Salzlösung leicht abgegossen werden kann. Die Fällung wird in wenig destilliertem Wasser gelöst, unter Umständen wird die Ausfällung wiederholt,

und bei 0° gehalten, wodurch ein großer Teil Na_2SO_4 auskristallisiert. Die Flüssigkeit enthält das Toxin dann in etwa fünffacher Stärke bei einer Natriumsulfatkonzentration von etwa 2,5 Proz., die unbedenklich injiziert werden kann.

Neuere Methoden stammen von Gessard und Loiseau sowie Heinemann. Die ersteren wenden das gleiche Verfahren an, das sie zur Gewinnung von Diastasen empfohlen haben. 200 ccm Toxin aus einer elftägigen Kultur in Martinscher Bouillon werden mit 20 ccm einer $\frac{1}{10}$ -Lösung von Chlorcalcium versetzt. Darauf werden unter ständigem Schütteln 30 ccm einer $\frac{1}{10}$ -Lösung von Natriumphosphat in kleinen Portionen zugegeben. Der Niederschlag wird auf dem Filter mit etwa 300 ccm destilliertem Wasser mehrmals gewaschen und jedesmal abzentrifugiert. Dann wird er in 60 ccm inaktiviertem Pferdeserum (eine Stunde auf 60° erwärmt) gelöst und vier Tage lang unter öfterem Umschütteln auf Eis aufbewahrt. Das Serum wird abzentrifugiert und soll das Gift in 20-facher Konzentration enthalten.

Heinemann versetzt 1 Tl. Toxin mit 2 Tln. gesättigter Ammonsulfatlösung unter dauerndem Umrühren. 24 Stunden später werden der bräunliche Niederschlag und Schaum abfiltriert und noch feucht in Kollodium- oder Pergamentsäckchen gebracht und fünf bis sechs Tage dialysiert. Das Dialysat wird filtriert. Die klare dunkelbraune Flüssigkeit enthält das konzentrierte Gift.

Durch Dialyse kann man Salze und Peptone entfernen. Man verliert zu gleicher Zeit einen Teil des Toxins, da die Salze aber rascher diffundieren, kann man durch frühzeitige Unterbrechung der Dialyse eine salzarme, aber toxinreiche Flüssigkeit erhalten. Eine gänzlich salzfreie Lösung wird man aber nur unter großen Toxinverlusten erzielen.

Als Dialysiermembranen eignen sich sehr gut Fischblasen, Dickdärme, Dünndarmschlingen und Schweinsblasen, am besten solche von jungen Tieren. Pergament und Kollodium sind zu wenig durchlässig.

Chemisch-physikalische Eigenschaften.

Die Eigenschaften des Diphtheriegiftes sind von vielen Forschern eingehend untersucht worden. Das Diphtheriegift ist sehr unbeständig. Die Umstände, die zur Änderung des Toxins führen, sind nicht bekannt. Man kennt jedoch gewisse Maß-

nahmen, die das Diphtheriegift wirksam erhalten. Das Tageslicht schädigt das Gift bereits nach einigen Tagen, das Sonnenlicht noch schneller. Es kann unter Luft- und Lichtabschluß einige Monate konstant erhalten bleiben. Dabei kann es unter einer 1 bis 2 cm hohen Schicht Toluol aufbewahrt werden oder mit 0,5 Proz. Phenol oder 0,2 bis 0,3 Proz. Trikresol versetzt werden. Nach der Herausnahme aus dem Brutschrank erfährt das Diphtherietoxin stets eine gewisse Abschwächung. Nach Arrhenius und Madsen folgt der Prozeß ungefähr dem monomolekularen Typus. Folgende Daten zeigen die Schwächung eines Giftes im Verlauf eines Jahres, wie sie von Madsen gefunden worden sind. Die Toxizität des Bouillonfiltrates bei einer tödlichen Minimaldosis von 0,07 ccm, die sich aus der ersten Untersuchung ergab, ist gleich 100 angenommen.

Datum	Tötende Minimaldosis ccm	Toxizität
20. Oktober 1897	0,07	100
4. Januar 1898	0,096	72,8
11. Mai 1898	0,112	62,3
27. August 1898	0,145	48,3
13. September 1898	0,149	47,1
17. Oktober 1898	0,2	35,0

Die Abschwächung geht sehr langsam vor sich, wenn sich das Gift in getrocknetem Zustand befindet, z. B. im Vakuum eingedampft oder mit Calciumphosphat gefällt wird. Nach den Untersuchungen von Roux und Yersin ist das getrocknete Toxin der Hitze gegenüber bedeutend widerstandsfähiger als das flüssige. Letzteres wird durch eine Erwärmung auf 58 bis 60° abgeschwächt; das getrocknete Gift verträgt dagegen längere Zeit eine Temperatur von 70° und eine von 100° 20 Minuten lang ohne wesentliche Schädigung. Das Toxin ist lange haltbar bei niedriger Temperatur, es sind deshalb starke Kälte und namentlich Gefrierenlassen ausgezeichnete Konservierungsmittel.

Die Abschwächung des Giftes wird beschleunigt durch starke Alkalien und Säuren. Madsen glaubt, eine größere Haltbarkeit zu erreichen, wenn die alkalischen Produkte durch Dialyse

entfernt oder durch Säure die alkalische Reaktion abgestumpft würde. Nach v. Behrings Feststellungen ließ eine 1proz. Salzsäure einen beträchtlichen Teil des Giftes unbeeinflusst. Ohne Einfluß sind ferner 1proz. Carbolsäure oder andere Benzolderivate, Jodoform und Chloroform, wenn das Gift im Dunkeln steht.

Eine Inaktivierung des Giftes bedingen Peroxyde und Oxydasen tierischer und pflanzlicher Herkunft (Sieber). Nach Strubell soll das Gift durch Einwirkung von Pyocyanase abgeschwächt werden.

Smirnow sowie Krüger setzten das Diphtheriegift konstanten Strömen von Elektrizität aus und beobachteten zwar eine Abschwächung, aber keinen Verlust des immunisierenden Vermögens. Marmier konnte zeigen, daß bei der Elektrolyse mit konstanten Strömen Hypochlorite entstanden und Chlor aus dem Natriumchlorid frei wurde und daß diese oxydierenden Substanzen das Toxin abschwächten und in Toxoide umwandelten.

Die Abschwächung des Toxins, die d'Arsonval und Charin mit hochgespannten Wechselströmen von großer Wechselzahl bewirkten, rührt nach Marmier von der starken Erwärmung her. Wird diese vermieden, so bleibt auch die Abschwächung des Giftes aus.

Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf das Diphtheriegift ist neuerdings von Calcaterra und Gerhartz studiert worden. Ersterer sah eine $3\frac{1}{2}$ -stündige Bestrahlung ohne Einfluß auf das Toxin, Gerhartz dagegen beobachtete eine gewisse Abschwächung durch die Röntgenstrahlen, die er darin erblickt, daß mit Gift subkutan behandelte Kaninchen nach Röntgenbestrahlung länger lebten als Kontrolltiere.

Das Diphtheriegift diffundiert langsam durch Pergament, durch Kollodium scheint es nicht zu gehen (Roux und Yersin).

Nach Madsen wird von Chamberlandkerzen Marke F ein Teil des Toxins zurückgehalten, der Verlust beträgt aber selten mehr als 5 bis 10 Proz.

Zur Messung des Diphtheriegiftes benutzt man fast nur Meerschweinchen.

Früher injizierte man oft 500 g schwere Meerschweinchen und gab an, wieviel Toxin nötig war, um sie in 28 bis 30 Stunden zu töten. Jetzt bedient man sich meistens solcher Tiere, die ein Gewicht von etwa 250 g (240 bis 260 g) haben, die gleichartiger

zu sein scheinen. — Das Gewicht normaler Meerschweine schwankt täglich zwischen 10 bis 20 g, so daß man selten viele Tiere von genau 250 g hat. — Sie sind zudem billiger und leichter zu beschaffen.

Th. Smith und Ehrlich haben festgestellt, daß unter den einzelnen Stämmen von Meerschweinchen große Unterschiede in der Empfänglichkeit für das Diphtheriegift herrschen. Einzelne Stämme sind viel weniger empfänglich, auch scheint eine relative Immunität erblich zu sein. Ehrlich fand auch, daß gewisse englische Meerschweine widerstandsfähiger waren als deutsche. Man tut also gut daran, nur solche Tiere zu verwenden, deren Provenienz man kennt. Mit selbst gezüchtetem Material erhält man viel regelmäßiger Resultate, als wenn man die Tiere kurz vor dem Gebrauch von verschiedenen Händlern zusammenkauft. Die frisch gekauften Tiere sind meist empfindlicher als die eigenen. Man läßt daher zweckmäßig die gekauften Tiere eine gewisse Zeit unter denselben Lebensbedingungen, wie sie nachher während des Versuches sind.

Nach den Erfahrungen Madsens kann man zu praktischen Zwecken unbedenklich Tiere verwenden, deren Eltern zu Serum- oder Toxinprüfungen gebraucht worden sind, da ihre Empfänglichkeit in der Regel nicht verschieden von der ungebrauchter Tiere ist. Zu Versuchen von theoretischer Bedeutung wird man sie jedoch nicht verwenden.

Wo es auf besonders sorgfältige Untersuchungen ankommt, benutzt man nur Tiere, deren Abstammung, Alter usw. man kennt.

Das Diphtheriegift wirkt auf das Versuchstier in charakteristischer Weise. In den ersten Stunden nach Injektion einer tödlichen Dosis tritt die Wirkung nicht zutage, es verstreicht eine gewisse Zeit, bis sich die krankhaften Symptome bemerkbar machen. Diese Inkubationszeit kann verringert werden durch übermäßig hohe Giftdosen, ganz verschwindet sie aber nie. Die Dauer beträgt beim Meerschwein mindestens 8 bis 12 Stunden. Aber bereits innerhalb dieser Zeit sind Temperaturveränderungen nachweisbar. Nach Minne tritt schon eine Stunde nach der Injektion eine Temperaturerhöhung ein, die ungefähr bis zur sechsten Stunde zunimmt. Auf dieser Höhe bleibt sie einige Zeit stehen, um dann abzufallen. Der Abfall unter die Norm beträgt häufig mehrere Grade. Die Hypothermie bleibt aus, wenn das Tier die Vergiftung überlebt.

Gleichzeitig mit der Temperatursenkung entwickeln sich die krankhaften Symptome. Das Tier ist weniger lebhaft, verkriecht sich in die Streu des Käfigs. Es sitzt zusammengezogen mit gesträubten Haaren. Die Atmung ist beschleunigt. Das Tier fühlt sich kalt und schlaff an. Auf den Rücken gelegt kann es sich nicht mehr umdrehen. Zuletzt fällt es auf eine Seite und stirbt meist in dieser Stellung. Die Tiere sind in dieser Krankheitsperiode sehr empfindlich gegen Temperaturveränderungen und andere äußere Einwirkungen. So können Handgriffe, wie Einfangen, Temperaturmessung, Palpation und Wiegen den plötzlichen Tod verursachen.

Mit dem Auftreten der ersten Krankheitszeichen entwickelt sich an der subkutanen Injektionsstelle ein Ödem, das in akut verlaufenden Fällen kaum palpabel ist. In den langsamer verlaufenden Fällen fühlt man über größere oder kleinere Flächen ausgebreitet eine schmerzhaft Infiltration. Nach und nach grenzt sich diese ab, wird hart und trocknet ein. Schließlich wird das nekrotische Stück abgestoßen und es entsteht eine leicht blutende Granulationsfläche, die bald abheilt und eine strahlenförmige Narbe hinterläßt.

Mit den Vergiftungserscheinungen geht eine Gewichtsabnahme einher. Verläuft bei einem Tiere der Vergiftungsprozeß schnell, so sinkt das Gewicht gleichmäßig bis zum Tode, sonst beginnt der Gewichtsverlust erst nach 24 Stunden. Der größte Gewichtsverlust fällt gewöhnlich auf den fünften Tag, worauf das Gewicht langsam wieder steigt. Madsen fand im Durchschnitt folgende Verluste bei Meerschweinen von 250 g, die eine Dosis bekommen haben, welche in der Regel in vier bis fünf Tagen tötete. Überlebt das Tier, so findet dann wieder eine Gewichtszunahme statt. Der Gewichtsverlust beträgt am:

1. Tag	26 g	6. Tag	66 g
2. „	35 g	7. „	63 g
3. „	47 g	8. „	52 g
4. „	54 g	10. „	34 g
5. „	66 g	14. „	7 g

Werden untertödliche Dosen injiziert, so kommt es häufig zu typischen Lähmungen, die dann beginnen, wenn das Tier sich scheinbar wohl befindet. Die Lähmungen fangen an den Hinter-

beinen an, um dann auf die Vordergliedmaßen, Thorax und Zwerchfell überzugreifen, und können den Tod durch Ersticken hervorrufen. Wenn solche Lähmungen auftreten, so geschieht dies meistens zwischen dem 15. und 30. Tage (Ransom, Dreyer und Madsen, Dean).

Der wichtigste Befund bei der Sektion eines an akuter Diphtherievergiftung gestorbenen Meerschweinchens ist an der Injektionsstelle das sülzige, oft speckige und hämorrhagische Ödem, welches sich fast immer über die ganze Bauchfläche erstreckt. Die inneren Organe sind stark hyperämisch. Besonders typisch sind die Blutungen in die Nebennieren. Neben der Rötung der Nebennieren und Blutfüllung der Mesenterialgefäße sieht man geringes Exsudat in der Bauchhöhle. In der Brusthöhle und im Herzbeutel befindet sich meistens rötliches Exsudat, die Lungen weisen Verdichtungsherde auf.

Bei Meerschweinchen wendet man in der Regel die subkutane Einverleibungsart an. Die tödliche Minimaldosis Diphtheriegift ist nur ein Drittel so groß, wenn das Gift in die Blutbahn gebracht wird (Morgenroth).

Madsen hat in nebenstehender Tabelle die Wirkung verschiedener Mengen Diphtheriegift bei subkutaner Einspritzung auf Meerschweine von 250 g Gewicht wiedergegeben.

Madsen bezeichnet als „kleine Infiltration“ eine solche, die etwa 2,5 cm lang und 2 cm breit ist, als „mittlere“ eine, die 4 bis 5 cm lang und 2,5 bis 3 cm breit ist. Eine „große Infiltration“ füllt die ganze Bauchfläche aus.

In dieser Tabelle sieht man sehr schön die Wirkung von den kleinsten kaum noch Symptome hervorrufenden Dosen bis zu großen, die den Tod in etwa 24 Stunden verursachen.

Benutzt man Kaninchen zur Diphtheriegiftmessung, so erhält man bei intravenöser Applikation gleichmäßigere Resultate als bei der subkutanen. Die dosis letalis ist für Kaninchen von 1200 bis 1700 g bei intravenöser Injektion dieselbe wie bei subkutaner Einspritzung für Meerschweine von 250 g (Madsen).

von Behring hat folgende Skala aufgestellt, die die Empfindlichkeit der verschiedenen Tiere für das Diphtheriegift anzeigt. Am wenigsten empfänglich ist die Maus, dann folgen Ratte, Hund, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Kuh, Pferd, Ziege.

Dosis ccm	Tod nach Tagen	Maximale Gewichts- abnahme g	Lokale Erscheinungen			Parese		
			Infiltration	Nekrose Größe d. Fläche cm	Enthaarung	nach Tagen	Verlauf	
0,03	1,25	20	kleine weiche					
0,03	1,5	20	"					
0,02	1,25	15	"					
0,02	1,0	20	"					
0,01	1,5	15	"					
0,01	2,0	15	"					
0,008	2	10	"					
0,008	3	20	mittlere					
0,006	4	55	große					
0,006	4	50	mittlere					
0,005	5	45	große					
0,005	6	60	"					
0,004	8	60	"					
0,004		50	"					
0,003		35	"					
0,003	13	20	"					
0,0025		40	"					
0,0025		45	"					
0,002		15	"					
0,002		15	"					
0,0015		5	"					
0,001		0	mittlere					
0,001		20	große					
0,0007		Zunahme	mittlere					
0,0007		0	kleine					
0,0005		Zunahme	"					
0,0005		"	"					
					talergroße		18	Tod am 23. Tage
					"		17	Tod am 25. Tage
					"	über den ganzen Bauch	21	nach 14 Tagen wieder gesund
					"		22	Tod am 26. Tage
					"		22	
					"	fleckenweise	23	nach 12 Tagen wieder gesund
					"			
					"	ausgedehnte		
					"	mittlere		
					"	ein bifchen		

2 × 2
3 × 2
4 × 3
2 × 1
1 × 1
1/2 × 1/2
1 × 1

Die übliche Einheit ist die Menge Toxin, welche ein Meerschwein von 250 g in vier bis fünf Tagen tötet. In dieser Weise wird der direkte Giftwert ermittelt.

Die Toxinmessung nach Ehrlich geschieht mit Hilfe von Antitoxin. Im Gegensatz zur vorigen gibt diese den indirekten Giftwert an. Bei Mischung von einer bestimmten Menge Antitoxin, z. B. einer Antitoxineinheit mit steigenden Mengen Gift, die man zur Bindung einige Stunden bei 37° hält, bekommt man außer den ganz unwirksamen Mischungen solche, welche die ersten schwachen Vergiftungserscheinungen (lokales Ödem, Gewichtsverlust, Mattigkeit, Lähmungen usw.) hervorrufen. Diese Grenze nennt Ehrlich L_0 (limes). Den anderen Grenzwert L_+ stellt die Mischung dar, welche ein Meerschwein in etwa vier Tagen sicher tötet.

In zahlreichen Versuchen hat sich gezeigt, daß die toxischen Eigenschaften eines Giftes abgeschwächt werden oder ganz verschwinden können, ohne daß das antitoxinbindende Vermögen abnimmt. Ehrlich erklärt dies damit, daß er annimmt, die Toxine bestehen aus zwei verschiedenen Gruppen. Die toxophore Gruppe entfaltet die Giftwirkung und ist verhältnismäßig labil; die haptophore Gruppe hat die antitoxinbindende Funktion und ist weit stabiler als erstere.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1894, Nr. 18. Arrhenius und Madsen, Acad. Royale des Sciences et des Lettres de Danemark 1904. d'Arsonval und Charrin, Compt. rend. de l'acad. 1896, Nr. 122. Behring und Wernicke, Ztschr. f. Hyg. **12** (1892). Bernheim, Arch. f. Hyg. **33** (1898). Brieger und Boer, Deutsche med. Wochenschr. 1896. Brieger und Fränkel, Berl. klin. Wochenschr. 1889, Nr. 11 u. 12. Cobbet, Ann. de l'Institut Pasteur 1897. v. Dungern, Zentralbl. f. Bakt. **19** (1896). Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1904, Nr. 8 u. 9. Ehrlich, Wertbestimmung des Diphtherieheilserums. Jena 1897. Derselbe, Deutsch. med. Wochenschr. 1898. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 35 u. 37. Funck, Manuel de sérothérapie antidiphthérique. Paris 1895. Fränkel, C., Berl. klin. Wochenschr. 1890. Derselbe, Hyg. Rundschau 1894. Gerhartz, Berl. klin. Wochenschr. 1909. Guinochet, Zentralbl. f. Bakt. **12** (1892). Hilbert, Ztschr. f. Hyg. **29** (1898). Hida, ebenda **61** (1908), Zentralbl. f. Bakt. **53** (1910) und Mittel. aus d. Kaiserl. Institut f. Infektionskrankh. Tokio 1911. Hougounnecq und Doyon, Soc. de biol. 1896. Krüger, Deutsche med. Wochenschr. 1895. Madsen, Ztschr. f. Hyg. **26** (1897). Derselbe, Ann. de l'Institut Pasteur 1899. Derselbe, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi 1908. Marenghi und Garino, Soc. Med. Chir. di

Pavia 1898. Marmier, Ann. de l'Institut Pasteur 1896. Martin, ebenda 1896. Morgenroth, Ztschr. f. Hyg. 1904. Murillo, Zentralbl. f. Bakt. 1904. Neisser und Gins, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Nicolle, Ann. de l'Institut Pasteur 1896. Park und Williams, Zentralbl. f. Bakt. 1896. Pröscher, ebenda 1902 und Münch. med. Wochenschr. 1902. Rosenau, Hygienic Laboratory Bull. April 1905, Nr. 21. Roux und Yersin, Ann. de l'Institut Pasteur 1888, 1889, 1890. Roux und Martin, ebenda 1894. Smirnow, Berl. klin. Wochenschr. 1895. Smith, Th., The Journal of Med. Research. 1905. Derselbe, The Journal of experim. Med. 1899. Derselbe, Ref. Zentralbl. f. Bakt. **20** (1896). Strubell, Münch. med. Wochenschr. 1902. Spronck, Ann. de l'Institut Pasteur 1895, 1898. Turenhout, Ref. Zentralbl. f. Bakt. **31** (1902). Ushinsky, Zentralbl. f. Bakt. 1893, 1897. Wassermann und Proskauer, Deutsche med. Wochenschrift 1891. Wood, Cartwright, Zentralbl. f. Bakt. **31** (1902). Zinno, ebenda **31** (1902).

b) Das Diphtherieantitoxin.

Zur Gewinnung des Diphtherieantitoxins im großen bedient man sich fast ausschließlich des Pferdes. Brauchbar sind noch Maultier, Esel, Ziegen und Schafe. Die Pferde produzieren in der Regel mehr Antitoxin als die anderen Tiere. Sie vermögen auch größere Mengen reinen, hämoglobinfreien Serums zu liefern. Ob sich bestimmte Pferderassen besonders zur Herstellung des Diphtherieserums eignen, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Man hat ebenso von Halbblütern, Vollblütern wie Kaltblütern hochwertige Sera erhalten. Dasselbe gilt bezüglich des Alters der Pferde. Dasselbe soll nicht unter vier und nicht über acht Jahre betragen. Dagegen ist mit Bestimmtheit erwiesen, daß die allergrößten individuellen Schwankungen unter den einzelnen Pferden bestehen. Ohne jeden ersichtlichen Grund liefern einzelne Individuen unter denselben Verhältnissen ein sehr hochwertiges Serum, andere ein minderwertigeres, wieder andere sondern kaum Antitoxin in das Blut ab. Auf Freisein von äußeren chronischen Leiden braucht für die Zwecke der Diphtherieserumgewinnung kein besonderer Wert gelegt zu werden, absolut notwendig ist jedoch, daß die Pferde gesunde innere Organe haben.

Die Injektionen, die dazu dienen sollen, die Pferde zunächst giftfest zu machen, werden zweckmäßig subkutan, intramuskulär oder intrapulmonal vorgenommen. Um ein möglichst wirksames antitoxisches Serum zu erhalten, muß man ein möglichst wirksames

starkes Toxin anwenden. Der allgemein befolgte Grundsatz ist der, mit schwach wirkenden Dosen, also mit ganz geringen Mengen starken Giftes oder mit entsprechend größeren Mengen eines schwächeren Giftes zu beginnen und alsdann in allmählicher Steigerung zu höchsten Dosen des Vollgiftes anzusteigen. Während man kleinere Laboratoriumstiere auch mit den kleinsten Mengen unveränderten Giftes nicht giffest machen kann, ist dies bei Pferden bei großer Vorsicht möglich. Immerhin empfehlen verschiedene Autoren, nur mit abgeschwächten Giften zu beginnen. Roux und Martin versetzen das Gift in fallenden Mengen je nach dem Grade der gewünschten Abschwächung mit Lugolscher Lösung, Behring und Kitasato wandten Jodtrichlorid an; Fränkel erreichte die Abschwächung durch Erwärmen des Toxins auf 60°. Die Steigerung der Dosis richtet sich immer nach der Reaktion, welche die letzte Injektion hervorgerufen hat. Wurde dieselbe gut vertragen und ist sie sehr leicht, so kann man bei der nächsten Injektion steigen. Jedenfalls muß stets die letzte Reaktion vollkommen abgeklungen sein, ehe man zu einer neuen Injektion übergeht. War die vorhergehende Reaktion sehr stark, so steigt man nicht, sondern wiederholt die letzte Dosis noch einmal oder geht sogar darunter. Ein bestimmtes Schema läßt sich jedoch für die Immunisierung nicht aufstellen. Die Stärke des Giftes muß selbstverständlich, ehe dasselbe den Pferden injiziert wird, an 250 g schweren Meerschweinchen genau austitriert werden. Hierdurch gelangt man einigermaßen zu bestimmten Anhaltspunkten für die Dosierung der verschieden starken Toxine an Pferden. Es gilt nämlich der Grundsatz, daß das Pferd, auf dasselbe Körpergewicht bezogen, etwa 100-mal so empfindlich gegen das Diphtherietoxin ist wie das Meerschwein. Für das Pferd stellt ungefähr ein halbes Kubikzentimeter eines Giftes von 0,03 dosis letalis minima für 250 g Meerschweinchen die kleinste tödliche Dosis dar. Die genaue Dosierung wird jedoch erschwert durch ausgesprochen individuelle Differenzen in der Giftempfindlichkeit der Pferde. Jüngere Pferde sind ungefähr doppelt so empfindlich als vollkommen ausgewachsene Tiere. Andererseits vertragen verschiedene Pferde ohne erkennbaren Grund größere Giftmengen. Als Beispiel diene folgender Immunisierungsgang bei einer 665 kg schweren graviden Stute in einer von Salomonsen und Madsen angegebenen Tabelle.

Tag	Toxindosis ccm	Tag	Toxindosis ccm	Bemerkungen
1.	1	104.	800	
6.	1	119.	1000	
12.	3	135.	—	Aderlaß: 150 I.-E. ¹⁾
15.	5	154.	—	Geburt eines Fohlens
23.	10	177.	—	
27.	20	184.	100	Aderlaß: 45 I.-E.
36.	25	188.	200	
41.	50	195.	400	
45.	75	205.	700	
50.	100	213.	800	
57.	150	223.	600	
72.	250	232.	600	
81.	450	242.	1000	
92.	600	252.	—	Aderlaß: 120 I.-E.

Von dem von Salomonsen und Madsen in dem vorstehenden Versuche benutzten Gift tötete 0,1 ccm ein 500 g schweres Meerschweinchen innerhalb 48 Stunden. Es war ein mäßig starkes Diphtherietoxin, da häufig solche erhältlich sind, die fünf- bis zehnmal stärker wirksam sind. In einem solchen Falle müßte naturgemäß die Anfangsdosis bei dem Pferde nur ein Fünftel oder ein Zehntel der von den beiden Immunisatoren gewählten betragen.

Gefahrloser als die von Salomonsen und Madsen gewählte Methode zur Erzeugung einer Grundimmunität ist die im Institut Pasteur in Paris geübte. In diesem Institut beginnt man mit der Injektion von $\frac{1}{2}$ ccm Toxinlösung, die mit derselben Quantität Lugolscher Jodjodkalilösung versetzt ist. Diese Mischung wird, wie alle Injektionen, unter die Haut an der Schulter injiziert. Nach Ablauf der Reaktion wird dieselbe Dosis so oft wiederholt, bis das Pferd diese Menge reaktionslos verträgt. Erst dann wird zu 1 ccm reiner Toxinlösung übergegangen. Unter genauer Beobachtung der Reaktion wird dann auf 3, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 75, 100 bis etwa 300 ccm starken Diphtheriegiftes gestiegen. Jetzt wird ein Aderlaß gemacht und das Serum auf seinen Antitoxingehalt geprüft. Bei vorsichtiger Behandlung kann man so in drei bis vier Monaten auf ein Serum rechnen, welches in 1 ccm etwa 200 bis 250 Antitoxineinheiten enthält.

¹⁾ I.-E. = Immunitätseinheit, s. S. 8.

Wegen der erwähnten verschiedenen individuellen Empfindlichkeit gegenüber reinem unveränderten Toxin ist es für Anfänger und Ungeübtere empfehlenswerter, sich auch bei Pferden dieser Art des Immunisierens zu bedienen.

Heute wendet man jedoch in fast allen größeren Serumbereitungsstätten zur Abschwächung des Diphtheriegiftes statt der Einwirkung von Chemikalien und Wärme bei den ersten Injektionen Toxin-Antitoxingemische¹⁾ an. Diese Methode wurde zuerst von Babes, Kretz u. a. empfohlen, dann von Park systematisch angewandt. Park geht so vor, daß zuerst abfallende Mengen Antitoxin mit der gleichen Menge Toxin gemischt injiziert werden, dann nach Weglassen des antitoxischen Serums von der zuletzt angewandten Toxinmenge aus allmählich angestiegen wird.

Nach Park werden die Pferde jeden Donnerstag und Montag behandelt.

1. Injektion	25 cem	Antitoxin	+	25 cem	Toxin
2. "	10 "	"	"	+ 25 "	"
3. "	25 "	Toxin allein			
4. "	40 "	"	"	"	"
5. "	60 "	"	"	"	"
6. "	80 "	"	"	"	"
7. "	100 "	"	"	"	"
8. "	150 "	"	"	"	"
9. "	200 "	"	"	"	"
10. "	250 "	"	"	"	"
11. "	300 "	"	"	"	"
12. "	350 "	"	"	"	"
13. "	400 "	"	"	"	"
14. "	450 "	"	"	"	"
15. "	500 "	"	"	"	"

Statt mit der Injektion eines Antitoxin-Toxingemisches lassen sich nach demselben Prinzip auch gute Resultate in kurzer Zeit erzielen, wenn mit der Injektion von Serum begonnen wird. Das Pferd wird also zuerst passiv immunisiert und erhält dann eine Giftmenge, die nur um ein geringes größer ist, als diejenige, welche durch die vorher injizierte Antitoxinmenge neutralisiert wird. In folgenden Tabellen werden einige Protokolle mitgeteilt, aus denen ersichtlich ist, daß es so in ganz kurzer Zeit gelang, hochwertige Seren herzustellen.

¹⁾ Einen Impfstoff aus einem solchen Gemisch hat v. Behring neuerdings auch für die prophylaktische Impfung beim Menschen ausgearbeitet (Deutsche med. Wochenschr. 1913).

Versuch mit Pferd Nr. 3.

Injektion	Datum	Antitoxin- menge ccm	Toxinmenge ccm	Temperatur- reaktion °C
1.	8. Jan.	60	—	37,6
2.	9. "	—	10	37,6
3.	10. "	70	—	37,8
4.	11. "	—	20	37,8
5.	12. "	70	—	37,4
6.	13. "	—	40	38,9
7.	14. "	70	—	37,8
8.	15. "	—	60	38,1
9.	16. "	70	—	37,6
10.	17. "	—	100	37,6
11.	19. "	—	180	38,2
12.	22. "	—	300	38,4
13.	24. "	—	500	38,2
	25. "	—	—	37,8
14.	28. "	—	900	38,0
	30. "	—	—	38,0
	31. "	—	—	37,5
15.	1. Febr.	—	1300	38,2
	2. "	—	—	38,1
	3. "	—	—	37,5

Das beim Aderlaß am 6. Februar gewonnene Serum hatte einen Wert von 1000 Antitoxineinheiten im Kubikzentimeter.

Versuch mit Pferd Nr. 8.

Injektion	Datum	Antitoxin- menge ccm	Toxinmenge ccm	Temperatur- reaktion °C
1.	18. Jan.	70	—	37,5
2.	19. "	—	10	36,8
3.	20. "	70	—	37,6
4.	21. "	—	20	37,7
5.	22. "	70	—	37,3
6.	23. "	—	50	38,0
7.	24. "	70	—	37,6
8.	25. "	—	120	37,3
9.	27. "	—	300	38,2
10.	30. "	—	500	38,0
11.	2. Febr.	—	800	37,9
	3. "	—	—	38,0
12.	6. "	—	1200	37,4
	7. "	—	—	37,5

Am 13. Februar wurde Blut entnommen, dessen Prüfung ergab, daß im Kubikzentimeter Serum 600 Antitoxineinheiten enthalten waren. Ich konnte auf diese Weise sehr hochwertige Seren in kürzester Zeit gewinnen, ohne daß die Pferde auf die Injektionen besonders stark reagiert hätten.

Einen neuen Weg zur raschen Gewinnung eines stark antitoxischen Serums schlug Ph. Blumenthal damit ein, daß er eine andere als die sonst übliche subkutane Applikationsart wählte. Da die Resorption großer Toxinmengen vom Unterhautzellgewebe aus ziemlich langsam vor sich geht, injizierte Blumenthal das Toxin direkt in die Lunge. Die Menge des injizierten Giftes richtet sich auch bei intrapulmonaler Injektionsart nach der Stärke desselben. Man wird von einem schwach wirksamen Gift größere Mengen nötig haben als von einem stärkeren. Die Pferde vertragen große Mengen ohne Beschwerden. Allerdings treten bei den so behandelten Pferden mehr oder minder große nekrotische Herde in den Lungen auf.

Blumenthal fängt die Immunisierung mit sehr kleinen Quantitäten an, die von Injektion zu Injektion um ungefähr das Doppelte erhöht werden. Folgende Tabelle zeigt den Gang einer intrapulmonalen Impfung.

Injektionsnummer	Datum	Toxinmenge	Temperatur	Gewicht kg
1	18. April	0,01	—	344
2	20. "	0,02	—	—
3	24. "	0,04	—	336
4	26. "	0,08	—	—
5	28. "	0,2	38,5	—
6	1. Mai	0,4	—	—
7	4. "	0,8	—	—
8	7. "	2,0	—	—
9	10. "	4,0	38,5	—
10	14. "	8,0	—	—
11	17. "	15,0	38,9	—
12	21. "	30,0	39,2	340
13	24. "	60,0	38,8	336
14	28. "	125,0	39,4	—
15	1. Juni	250,0	39,2	—
16	6. "	400,0	39,4	344
17	12. "	600,0	39,7	340
18	20. "	1000,0	40,0	344

Die Methode ist auch noch mit Erfolg öfter anwendbar, wenn die subkutanen oder intramuskulären Toxininjektionen den gewünschten Antitoxingehalt im Serum nicht erzeugt haben. Da die Pferde die intrapulmonale Behandlung nur einmal vertragen, müssen sie am Schlusse derselben vollständig entblutet werden.

Die Reaktion, die nach Injektion des Diphtherietoxins auftritt, ist eine allgemeine und eine lokale. Die allgemeine Reaktion äußert sich in einer Erhöhung der Körpertemperatur. Die normale Temperatur des Pferdes, rektal gemessen, beträgt 36,8 bis 38,0°; sie steigt durchschnittlich infolge der Diphtherietoxininjektion bis 40°. Jede höhere Reaktionstemperatur läßt erkennen, daß die Dosis zu hoch war. Fiebertemperaturen, die erst nach einigen Tagen auftreten, deuten auf einen sich bildenden Abszeß an der Injektionsstelle hin, wenn nicht Symptome einer anderen Krankheit vorliegen. Beides ist für die Antitoxinbildung gleich ungünstig; der Wert des Serums kann dadurch nicht unbedeutend erniedrigt werden. So sah ich einmal infolge Erkrankung an Druse den Antitoxingehalt eines Serums von 450 Antitoxineinheiten auf 200 abfallen. Die allgemeine Reaktion äußert sich fernerhin in einer Verminderung der Freßlust und Abnahme des Körpergewichts.

Die lokale Reaktion besteht bei der subkutanen und intramuskulären Injektionsart in mehr oder weniger ausgedehnten Schwellungen und Infiltraten. Bei der Anwendung größerer Toxinmengen kommt es zuweilen zu sterilen Abszessen. Dies ist besonders an den Stellen der Fall, die sich durch schlecht verschiebbare Haut auszeichnen, wie an den unteren Stellen des Bauches. Man hüte sich, hier zu große Volumina zu injizieren. Bakterielle Abszesse sind stets die Folge einer nicht aseptischen Einspritzung. Ferner treten an den subkutanen Injektionsstellen nicht selten Indurationen auf. Diese Stellen sind ebenso wie die, an denen sich Abszesse gebildet hatten, für spätere Einspritzungen unbrauchbar. Die lokale und die allgemeine Reaktion müssen vollständig abgeklungen sein, ehe man zu einer neuen Dosis übergeht.

Als Zeitpunkt der Blutentnahme ist der Tag zu wählen, an dem das Blut den größten Antitoxingehalt aufweist. Die Antikörperproduktion verläuft auch bei der Diphtherieimmunisierung wellenförmig, wie dies Salomonsen und Madsen nachgewiesen haben. Grundlegend für die Kenntnis dieses biologischen Ver-

haltens der Antitoxine überhaupt war eine Arbeit von Brieger und Ehrlich, in welcher sie den wellenförmigen Verlauf des Antitoxingehaltes der Milch bei einer gegen Tetanus immunen Ziege nach einer neueren Toxinzufuhr fanden. Die Antikörperschwankungen verlaufen bei diphtherieimmunen Pferden nach den Untersuchungen von Salomonsen und Madsen in der Weise, daß nach einer Giftinjektion die ersten zwei bis drei Tage ein Sinken der Antitoxinkonzentration, dann ein Ansteigen bis zum Maximum, darauf wieder ein neuerlicher Abfall eintritt, dem eine Periode des Konstantbleibens des Antikörpergehaltes des Blutes folgt. Der höchste Gipfel der wellenförmigen Kurve ist bei der Diphtherieimmunisierung am zehnten Tage erreicht. Deshalb wird der Aderlaß am günstigsten am zehnten Tage nach der letzten Injektion gemacht. Da das Maximum des Antitoxingehaltes rasch wieder abfällt, um sich dann auf einer mittleren Höhe zu halten, ist es nötig, die Pferde immer wieder zu injizieren, um den Antitoxingehalt möglichst hoch zu halten.

Bei Pferden, die einmal hoch immunisiert waren, genügt es, alle Monate mehrere Injektionen zu machen, um sie lange Zeit auf der gewünschten Höhe des Antitoxingehaltes zu halten. Durch Probeaderlässe ist man ständig orientiert, welchen Wert ein Serum hat, und richtet dann danach die großen Aderlässe zur Serumgewinnung ein.

Für die Wertbemessung des Diphtherieserums ist eine von Ehrlich ausgearbeitete Methode jetzt allgemein üblich. Bei der in Deutschland gesetzlich eingeführten staatlichen Prüfung ist die Ehrlich'sche Wertbemessung Vorschrift.

Antliche Prüfungsvorschrift.

1. Als Maßstab für die Serumbestimmung dient ein unter Ausschluß von Sauerstoff und Wasser konserviertes Serumpulver von genau bekanntem Wert. Dasselbe befindet sich in genau abgemessenen Quantitäten in besonders gearbeiteten Vakuumröhrchen. Die jetzigen Apparate enthalten 2,0 g eines Trockenantitoxins von ursprünglich 1700-(jetzt 5925-)facher Stärke.

2. Die Auflösung des Serums hat, um eine möglichst genaue Haltbarkeit zu gewährleisten, in einem aus $\frac{2}{3}$ Glycerin und $\frac{1}{3}$ 0,85 proz. Kochsalzlösung bestehenden Gemenge zu erfolgen. Es ist alle zwei Monate ein Röhrchen zu öffnen und eine neue Lösung

herzustellen. Von dem zurzeit im Institut aufbewahrten Trocken-serum wird der Inhalt eines Röhrchens in 1185 ccm des oben angegebenen Gemisches gelöst und so eine Testserumlösung von 10-facher Stärke hergestellt.

3. Die jetzige Testgiftosis wird mit Hilfe einer I.-E. ermittelt, wie eine solche z. B. in 1 ccm der 10-fachen Verdünnung des in Nr. 2 erwähnten 10-fachen Testserums enthalten ist. Es wird diese Serummenge mit steigenden Mengen Gift versetzt und durch eine möglichst genaue Versuchsreihe der Grenzwert ermittelt, bei dem gerade ein den Tod des Versuchstieres in den ersten vier Tagen herbeiführender Giftüberschuß manifest wird. Das so ermittelte Giftquantum stellt die jetzige Prüfungsdosis dar. Mit der gleichen Serumdosis erfolgt zur genauen Charakterisierung des Giftes die Bestimmung eines zweiten Grenzwertes, welcher die Giftosis zu ermitteln hat, welche bei der Mischung mit der obigen Serummenge gerade neutralisiert wird.

4. Die Bestimmung des Wertes eines Diphtherieserums erfolgt mittels der nach Nr. 3 festgestellten Testgiftosis in folgender Weise: Die betreffende Testgiftosis wird mit 4 ccm einer dem angegebenen Prüfungswert entsprechenden Serummenge gemischt. Da die Testgiftosis auf 1 ccm des einfachen oder 4 ccm eines $\frac{1}{4}$ -fachen Normalserums eingestellt wird, wird bei einem Serum von x -facher Stärke die Serumverdünnung $\frac{1}{4} x$ sein müssen, also bei der Prüfung eines 100-fachen Serums $\frac{1}{400}$ betragen.

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

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

6. Als Testgift können sowohl flüssige wie feste Gifte verwandt werden, falls bei ihnen die in Nr. 3 definierten Grenzwerte scharf zu ermitteln sind. Kamen flüssige, durch Toluol konservierte Gifte zur Verwendung, so soll dieses nur geschehen, wenn: 1. durch längere Voruntersuchungen die Haltbarkeit der Prüfungskonstanten erwiesen ist, 2. wenn die Prüfungsdosis 1 ccm nicht überschreitet. Die Untersuchungen über die Qualität der Testgifte sind weiter fortzusetzen.

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

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

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

Die Prüfungen werden von zwei Beamten des Instituts unabhängig voneinander vorgenommen, und bei übereinstimmendem Ergebnis wird das Serum für den Handel freigegeben. Es muß natürlich auch den übrigen gesetzlichen Forderungen entsprechen.

Zur staatlichen Kontrolle gehört noch eine Nachprüfung des Wertgehaltes des Serums, die sechs Monate und zwei Jahre nach der ersten Prüfung vorgenommen wird. Alle Sera, die mehr als 10 Proz. ihres Antitoxingehaltes verloren haben, werden dem Ministerium als abgeschwächt angezeigt und dieses veranlaßt dann die Einziehung der betreffenden Nummern. Über mehr als zwei Jahre erstreckt sich diese Nachprüfung nicht, da Seren, die so lange gut geblieben sind, keine wesentliche und schnelle Abschwächung mehr erleiden. Wegen bisweilen erfolgter Infektion durch den Pfropfen hindurch findet auch eine erneute Prüfung auf Keimfreiheit statt. Mit der Sterilitätsnachprüfung ist außer dem Frankfurter Institut noch eine Reihe von Krankenhäusern beauftragt. Diese berichten dann an das Institut in Frankfurt,

wenn sie eine infizierte Flasche finden. Das Institut beantragt darauf die sofortige Einziehung der Serummer.

Ähnliche Vorschriften wie in Deutschland bestehen auch in Amerika (Report of the committee on antitoxic and immunizing sera. Public Health papers and reports. Vol. XXX, part. II, 1905 und Rosenau, The immunity unit for standardizing Diphtheria Antitoxin. Bull. No. 21, Hyg. Lab. U. S. Publ. Health and Marine-Hosp. Serv., Washington). In Deutschland, Amerika und Spanien ist das Diphtherieserum in die Pharmakopöe aufgenommen.

Deutsches Arzneibuch, V. Ausgabe:

Serum antidiphthericum. — Diphtherieheilserum.

Blutserum von Pferden oder Maultieren, die gegen das Diphtheriegift immunisiert sind. Diphtherieheilserum darf nur in den Handel gebracht werden, nachdem es durch das Königlich Preußische Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Immunisierungseinheiten (= I.-E.), auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol oder Kresol) geprüft und zum Verkaufe zugelassen worden ist.

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

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

Der Verschluss der Fläschchen und die Glasampullen sind staatlich plombiert. Auf der einen Seite der Plombe befindet sich ein Stempelzeichen der amtlichen Prüfungsstelle, auf der anderen Seite der Plombe eine Zahl, die die im Gesamthalte vorhandenen I.-E. angibt.

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

Diphtherieheilserum, das 500 und mehr I.-E. in 1 ccm enthält, gilt als hochwertiges Serum.

Die am meisten gebräuchlichen Abfüllungen sind:

Nr. 0	200 I.-E.	
" 1	600 "	(oder 500 I.-E).
" 2	1000 "	
" 3	1500 "	

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

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

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

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

Kühl, aber frostfrei und vor Licht geschützt aufzubewahren.

Chemisch-physikalische Eigenschaften.

Das Diphtherieserum behält seine antitoxischen Eigenschaften sehr lange, wenn es kalt, vor Licht und Luftzutritt geschützt, aufbewahrt wird. Es schwächt sich im Laufe der Zeit etwas ab. Diese Abschwächung scheint hauptsächlich bei hochwertigen und ganz jungen Seren vorzukommen. Eine Statistik über die Abschwächung des Serums wurde im staatlichen Prüfungsinstitut zu

Frankfurt gewonnen, wo ja alle in Deutschland sich im Handel befindlichen Seren nach 6 und 24 Monaten nochmals auf ihren Wert geprüft werden. Nach Marx sind von 1104 Prüfungsnummern während acht Jahren 34 = 3,08 Proz. wegen Abschwächung eingezogen worden. Es haben sich abgeschwächt

innerhalb	3 bis	4 Monaten	2	Nummern
„	6	„ 10	9	„
„	10	„ 25	23	„

Aus der Statistik geht weiter hervor, daß die Seren, welche wegen Verlust von Antitoxin eingezogen werden mußten, bedeutend an Zahl abgenommen haben. Wahrscheinlich kommt dies daher, daß jetzt nur möglichst abgelagerte Seren zur Prüfungsstelle gesandt werden. Während anfangs eine ziemlich rasche Abschwächung erfolgt, — die beiden in den ersten 3 bis 4 Monaten nach der Prüfung zurückgewiesenen Seren waren relativ frisch gewonnen in das Institut gesandt worden — bleibt der Antitoxingehalt nach 4 bis 6 Monaten lange Zeit auf derselben Höhe.

Kinyoun und Hitchens, welche 100 verschiedene amerikanische Handelsseren untersuchten, fanden, daß die Abschwächung in keinem direkten Verhältnis zum Antitoxingehalt oder zur Aufbewahrungszeit steht; sie war recht variabel. Etwa 65 Proz. der untersuchten Seren hatten während 12 bis 15 Monaten einen Antitoxinverlust von etwa 25 Proz.

Tropische Einflüsse scheinen nach Otto den Wert der Diphtheriesera nicht herabzusetzen. Seren, die während des Transports nach China längere Zeit auf Schiffen und an Land aufbewahrt worden waren, hielten sich gut. Aus Deutschland wird schon lange Diphtherieserum nach den Tropen geliefert, ohne daß dasselbe Schaden leidet oder schneller unbrauchbar würde.

Nach Müller verträgt allerdings das Diphtherieantitoxin Wärme nur sehr schlecht. Beim Stehen während einiger Monate bei 37° soll seine Stärke ziemlich bedeutend abnehmen.

Eine fünf Minuten lange Erhitzung auf 55° in offener und geschlossener Röhre zerstört das Antitoxin nicht.

Nach Dziergowsky bleibt der Wert bei 50 bis 60° vollkommen erhalten, erst bei 60 bis 65° wird er vermindert infolge partieller Ausscheidung von Eiweißstoffen, die das Antitoxin aus der Lösung mitreißen. Bei 65 bis 70° wird der antidiphtherische Antikörper vernichtet.

Eine genaue Feststellung der Schädigung durch höhere Temperaturen ist deshalb schlecht ausführbar, weil im Serum schon bei 60° leichte Koagulation einzutreten pflegt, die bei höheren Temperaturen naturgemäß noch stärker ausgesprochen ist. Sicher ist jedenfalls, daß Temperaturen von 60° aufwärts sehr starke Einbußen an antitoxischem Wert hervorrufen.

Kälte übt keinen schädigenden Einfluß auf das Antitoxin aus. Entgegen Gorjansky, der annimmt, daß das Serum unter der Kältewirkung von — 3 bis — 16° R leidet, fanden andere Autoren, vor allem Bujwid, der ja das Ausfrieren des Serums als Einengungsmethode für die Antikörper benutzte, daß mittels Kälte eine langdauernde Haltbarkeit zu erzielen war. Die Erfahrungen mit dem eingetrockneten Testserum, das bei niedrigen Temperaturen zur Vermeidung der Abschwächung aufbewahrt wird, sprechen ebenfalls dagegen, daß Kälte schadet.

Luft und Gase bedingen eine allmähliche Abschwächung des Diphtherieserums. Bei Aufbewahrung unter atmosphärischer Luft, Sauerstoff, Kohlensäure und Wasserstoff verliert das Serum nach und nach seine antitoxische Stärke, Sauerstoff macht es schon nach drei Monaten gänzlich unwirksam (Müller).

Derselbe Autor stellte auch Untersuchungen über die Einwirkung von Licht verschiedener Farben an. Das Diphtherieserum ist ziemlich widerstandsfähig gegen Tageslicht, vier Monate diesem ausgesetzt wird es doch merklich abgeschwächt. Unter den verschiedenen Farben des Spektrums wirken gelbes und rotes Licht viel weniger schädlich als grünes und blaues.

Das Serum, welches dem Tageslicht ausgesetzt ist, verändert seine Farbe und ein goldgelbes Serum verliert diese Farbe in wenigen Tagen fast vollständig. Im blauen Licht tritt diese Veränderung nach wenigen Wochen, im gelben noch etwas später ein. Im roten und grünen Licht wird das Serum nicht gebleicht.

Nach Ansicht der meisten Untersucher hat das Licht eine unerwünschte Wirkung auf das Diphtherieserum. Palmirski und Orłowski bemerkten bei einem Serum, welches am südlichen Fenster bei teilweise direktem Sonnenlicht gestanden hatte, eine Abnahme von einem Drittel seiner ursprünglichen Stärke. Nach Marenghi verursachte die römische Julionne fast gar keinen Antitoxinverlust.

Durch Behandlung des Diphtherieserums mit Säuren und Alkalien werden die Immunkörper schwer geschädigt. Brieger und Krause beobachteten jedoch keine Schädigung durch freie, chemisch reine Salzsäure, wenn der Chlorgehalt gleich dem der physiologischen Kochsalzlösung war (etwa $\frac{1}{6}$ n-HCl). Ein Verlust des Antitoxingehalts tritt ein bei tryptischer und peptischer Verdauung mit Salz- oder Milchsäure.

Das Serum stellt ein kolloidales Milieu dar und verliert daher schon bei Filtration durch gewöhnliches Filtrierpapier Eiweiß und mithin auch Antitoxin. Zuweilen ist es aber nötig, um das Serum von mechanischen Unreinheiten zu befreien oder es mit Sicherheit keimfrei zu machen, eine Filtration durch Porzellankerzen vorzunehmen. Je nachdem nun die Autoren mit verschiedenen Filtern und anderen Vorsichtsmaßnahmen gearbeitet haben, gelangten sie zu verschiedenen Resultaten. Cobbett¹⁾ stellte zahlreiche Versuche an über den Einfluß des Filtrierens auf das Diphtherieantitoxin und kam zu folgenden Schlußsätzen, die heute allgemein als gültig anerkannt sind:

1. Die Filtration von Diphtherieheilserum mittels Chamberlandscher oder Berkefeldscher Filterkerzen kann zweifelsohne, wie von de Martini angegeben, eine Einbuße an Antitoxin nach sich ziehen.

2. Der Grad dieser Einbuße ist sehr inkonstant und hängt von dem Durchlässigkeitsgrade des benutzten Filters ab. Sie kann, wie bei den Dziergowskyschen Versuchen, ganz unbedeutend sein, auf der anderen Seite kann sie sich bis auf mindestens 20 Proz. des ursprünglichen Serumwertes belaufen, wenn ein Berkefeldsches Filter zur Anwendung gelangt, und es kann sogar, wie in dem Falle de Martinis, der Antitoxinverlust ein totaler sein, wenn ein Apparat benutzt wird, der dem de Martinischen mit Gelatine verstopften Filter vergleichbar ist.

3. Der Antitoxinverlust ist progressiv und wächst in dem Maße, wie sich das Filter verstopft.

4. Bei der Bereitung des Diphtherieantitoxins im großen darf man wohl von der Filtriermethode Gebrauch machen; indessen dürfen nur die durchlässigeren Filterarten benutzt werden. Die Operation soll unterbrochen werden, sobald die Filter anfangen,

¹⁾ Zentralbl. f. Bakteriol. 1898, Bd. XXIV.

sich zu verstopfen, und man sollte nicht durch hohen Druck durch teilweise verstopfte Filterkerzen die Filtration forcieren.

5. Es ist beim Filtrieren unbedingt geboten, daß die Gewährleistung für die antitoxische Wirksamkeit sich auf eine nach erfolgter Filtration vorgenommene Bestimmung der Wertigkeit gründet.

Im dänischen Staats-Seruminstitut wird die Kerzenfiltration als Normalmethode benutzt und die dort gesammelten Erfahrungen bestätigen die Befunde Cobbetts. Madsen gibt an, daß man mittels der Chamberlandkerze Marke *F*, die vorher sorgfältig auf ihre Dichtigkeit geprüft ist, 1 bis 1,5, zuweilen 2 Liter Serum mit einem Antitoxinverlust von maximal 5 bis 10 Proz. filtrieren kann. Am besten wird eine Wasserluftpumpe mit einem negativen Druck von etwa 600 mm angewandt. Sobald die Filtration langsam wird, muß die Kerze gewechselt werden. Ein Forcieren der Filtration unter Anwendung besonders starken Saugens hat einen bedeutenden Antitoxinverlust zur Folge.

Wegen der Schwierigkeiten, die die Darstellung des hochwertigen Diphtherieantitoxins häufig darbietet, hat man schon frühzeitig versucht, ein solches durch Konzentrierung minderwertiger Antitoxinlösungen herzustellen. Trotzdem aber heute fast immer Diphtherieserum von 500 bis 1000 Immunitätseinheiten im Kubikzentimeter zur Verfügung steht, ist die Konzentrierung und Reinigung der Antikörper mit Rücksicht auf die Gefahren der Serumkrankheit immer noch erstrebenswert.

Zunächst wurde eine Serumkonzentration durch einfaches Eindampfen im Vakuum versucht. Einen Vorteil brachte dieses Verfahren nicht, da es auch sämtliche Eiweißkörper in entsprechend höherer Konzentration enthält. Wegen der vielen Übelstände, die diese dicke Flüssigkeit hat, dürfen in Deutschland keine Sera von höherem Eiweißgehalt als 12 Proz. verkauft werden.

Eine $2\frac{1}{2}$ - bis 3-fache Konzentrierung des Antitoxins wird erreicht, wenn das Wasser nach dem Verfahren von Bujwid durch Ausfrieren entfernt wird. Nach dem langsamen Auftauen eines gefrorenen Serums erhält man zwei Schichten, eine obere farblose, die fast ganz aus Wasser besteht und keinen antitoxischen Wert hat, und eine untere gelblichbraune, welche die Gesamtmenge des Antitoxins enthält. Wiederholt man das Verfahren

zwei- bis dreimal, so resultiert ein Serum von oben angegebenem Antitoxingehalt.

Bei den meisten Methoden zur Konzentrierung und Reinigung des Antitoxins findet das Prinzip des Aussalzens Anwendung. Zahlreiche Autoren hatten gefunden, daß das Diphtherieantitoxin stets in der Fraktion der löslichen Globuline zu finden ist, aus der es sich bis jetzt nicht rein gewinnen ließ.

Aronson benutzte zum Ausfällen des Antitoxins das Aluminiumhydroxyd, nachdem er festgestellt hatte, daß dasselbe bei der Filtration fast das gesamte Antitoxin zurückhielt: 100 ccm Blutserum wurden mit 100 ccm Wasser verdünnt und mit 70 ccm einer 10 proz. Aluminiumsulfatlösung versetzt. Zu der Mischung gibt man langsam so viel 5 proz. Ammoniaklösung hinzu, daß das Aluminiumsulfat zum größten Teil zersetzt wird, die Reaktion jedoch schwach sauer bleibt. Aus dem Niederschlag läßt sich das Antitoxin dadurch gewinnen, daß man denselben in einem Schüttelapparat mit destilliertem Wasser behandelt, dem man so viel Alkali (Soda, Ammoniak) zugesetzt hat, daß rotes Lackmuspapier deutlich, aber nicht zu stark gebläut wird. Bei der Filtration muß man zu vermeiden suchen, daß die Tonerde sich am Filtrierpapier festsetzt, wodurch Antitoxin im Papier zurückgehalten werden könnte. Der zurückbleibende Niederschlag wird durch Aufgießen von 150 bis 200 ccm alkalihaltigen Wassers gewaschen. Die Trichter sind während der Filtration häufig zu bewegen. Durch erneute Ausschüttelung mit alkalischem Wasser und Filtration ist es möglich, das Antitoxin fast ganz zu gewinnen. Aus dem eiweißhaltigen Filtrat kann das Antitoxin in fester Form durch Fällung mittels Alkohol oder Ammonsulfat oder durch Eindampfen der Lösung im Vakuum, nicht über 45°C, gewonnen werden. In derselben Weise wie die Tonerde können das aus Ferrocyankalium und Zincum sulfuricum entstehende Ferrocyanzink und das durch Fällung von Eisensalzen mittels Alkali sich bildende Eisenhydroxyd Verwendung finden. Mit dieser Methode ist eine 30- bis 100-fache Konzentration zu erreichen.

Brieger u. Boer erreichten durch Kombination von Kochsalz und Chlorkalium eine vollständige Aussalzung des Antitoxins: 100 ccm Serum werden mit 10 ccm destillierten Wassers verdünnt und mit 4 g Chlorkalium versetzt. Nach der Lösung wird dieselbe mit 4 bis 5 g Kochsalz, das zuvor fein zerrieben ist, kräftig

geschüttelt und die Mischung 18 bis 20 Stunden bei 30 bis 37° gehalten. Der Niederschlag enthält die Antitoxine. 10 ccm liefern 0,4 g getrockneten Niederschlag, der in gleichen Teilen Wasser löslich ist.

Die Niederschläge, die an Stelle des Chlorkaliums bei Blutwärme mit Jodkalium entstehen, sind unlöslich und enthalten die Antitoxine und einen Teil der Albumine. Das Antitoxin kann mit schwach alkalischem Wasser quantitativ ausgewaschen werden.

Dieselben Autoren arbeiteten noch eine große Reihe von Methoden aus, um die Antitoxine von den anhaftenden unwirksamen Albuminaten zu befreien. Nach sehr zahlreichen Versuchen mit Blei-, Cadmium- und Quecksilbersalzen erwiesen sich ihnen die Zinksalze als besonders geeignet.

10 ccm Diphtherieserum werden mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt und darauf 20 ccm einer 1proz. Zinksulfat- oder Zinkchloridlösung zugesetzt. Der antitoxinhaltige Niederschlag wird mit wenig Wasser vorsichtig gewaschen und in schwach alkalischem Wasser (1 Tropfen Normalnatronlauge: 20 ccm Wasser) gelöst. Wird nun durch die Lösung Kohlensäure geleitet, so werden die mit Zinksulfat vorbehandelten Antitoxine hierdurch in den Niederschlag hineingerissen, die mit Zinkchlorid gepaarten Antitoxine bleiben im Filtrat. Das Filtrat oder der Zinksulfatniederschlag werden im Exsikkator getrocknet und mit Wasser gelöst. Die Albuminate lösen sich, die „Zinkantitoxine“ bleiben ungelöst; sie werden aber in Kochsalzhaltigem oder schwach alkalischem Wasser leicht aufgenommen. Durch erneute Kohlensäurebehandlung wird der größte Teil des Zinks getrennt. 10 ccm Serum ergeben etwa 0,1 g Pulver, das leicht in Wasser löslich ist und das gesamte Antitoxin der Ausgangsflüssigkeit enthält.

Eine neuere Methode mittels Kochsalz geben Brieger und Krause an:

Das Diphtherieserum wird mit der gleichen Menge sterilen destillierten Wassers verdünnt, mit neutralem Ammoniumsulfat gefällt, der Niederschlag mit 10proz. wässriger Glycerinlösung gelöst und mit überschüssigem Natriumchlorid behandelt. Der Niederschlag enthält keine Antitoxine und wird von der Lösung, welche dieselben in der ursprünglichen Menge enthält, abfiltriert. Durch Einleitung von Kohlensäure wird ein antikörperfreier Niederschlag erzeugt, der abfiltriert wird. Das Filtrat hat fast denselben

Antitoxingehalt wie das Ausgangsmaterial. Mit den Niederschlägen wird bis zu 75 Proz. des Gesamtstickstoffs entfernt, ohne daß eine Schädigung der Immunkörper zu konstatieren ist.

Durch tropfenweises Zusetzen von 1 Proz. Ameisensäure unter Umrühren zu dem Filtrat wird dasselbe durch eine weitere Fällung noch mehr von antitoxinfreien Körpern befreit.

Freund und Sternberg hatten unter anderem gute Resultate mit einem kombinierten Fällungs- und Aussalzungsverfahren. Sie versetzen das Serum mit einem Drittel seines Volumens einer 5 Proz. Kalialaunlösung (Ausfällung der Albumine). Das Filtrat, das die Antikörper enthält, wird dialysiert und der dabei entstehende geringe Niederschlag abfiltriert. Die erhaltene Flüssigkeit wird zur Hälfte mit schwefelsaurem Ammoniak gesättigt und der Niederschlag nach Lösung und Dialyse im Vakuum eingeeengt. Von einem Liter Serum erhält man durchschnittlich etwa 18 g Trockensubstanz. Die braunrote, leimähnliche Masse ist in Wasser und physiologischer Kochsalzlösung (etwa 3 g auf 10 Wasser) löslich. Die Lösung hat denselben Heilwert wie das nicht filtrierte Präparat und verträgt einen konservierenden Zusatz von 0,5 Proz. Phenol. Um die Übelstände beim Lösen und Filtrieren der ganz getrockneten Substanz zu vermeiden, wird die Einengung am vorteilhaftesten nur bis zu einer gewissen Konsistenz getrieben.

Nach Seng gelangt man zu einer Reinigung der Antitoxine, indem man zunächst aus dem Diphtherieserum bei natürlicher Alkaleszenz durch Zusatz von $\frac{1}{3}$ Volumen einer 5 Proz. Kalialaunlösung die Albumine ausfällt. Die Antitoxine bleiben in Lösung, der Niederschlag wird durch Filtration mittels angefeuchteter Faltenfilter entfernt und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wird bis zur Salzfreiheit dialysiert. Der Niederschlag (unlösliche Globuline) wird durch feuchte Filter abfiltriert und so lange mit Wasser ausgewaschen, bis bei Überschuß von destilliertem Wasser keine Trübung entsteht. Die Globuline werden jetzt durch Magnesium- oder Ammonsulfat ausgefällt und der Globulinniederschlag in wenig Wasser gelöst.

Brunner und Pinkus gelangten zu einer Reinigungsmethode des Diphtherieantitoxins unter Benutzung der Eigenschaft des Natriumsulfats, daß es bei 34° sein Maximum der Löslichkeit von 55 Proz. hat, während es bei 18° nur zu 16,8 Proz., bei 6 bis 7° und bei 0° nur zu 5 Proz. in Wasser löslich ist.

125 ccm 250 faches Diphtherieserum werden mit gleichen Teilen Wasser verdünnt, auf 32° erwärmt und dann erst mit 50 g wasserfreiem Natriumsulfat vermischt. Die erhaltene Flüssigkeitsmenge betrug 260 ccm.

Das Kölbchen bleibt über Nacht im Brutschrank bei 32° und wird am nächsten Tag im Brutschrank filtriert. Nachmittags wurden 194 ccm des abgelaufenen Filtrats zur Seite gestellt und der Niederschlag auf dem Filter sorgfältig mit kleinen Portionen von im ganzen 100 ccm einer 20 proz. auf 32° erwärmten Lösung von Natriumsulfat gewaschen. Man paßt genau den Augenblick ab, in dem der Niederschlag auf dem Filter noch feucht ist, da sonst derselbe leicht eintrocknet und sich dann nur mit Schwierigkeit löst. Abends waren 118 ccm Flüssigkeit abgetropft und der noch immer feuchte Niederschlag schied kein Filtrat mehr ab.

Jetzt wurde der Niederschlag, 48 ccm, in eine Temperatur von 6° gebracht und durch Einlegen einiger Kristalle von Natriumsulfat die Kristallbildung angeregt. Diese entwickelt sich in kurzer Zeit, worauf das Protein in dicken Tropfen abzufießen beginnt.

Die Ausbeute betrug 26 ccm einer farblosen, klaren, leicht opaleszierenden Flüssigkeit von einem Antitoxingehalt von etwa 735 Antitoxineinheiten im Kubikzentimeter. Der Proteingehalt war jetzt von 0,40 g pro 1000 Immunitätseinheiten auf 0,19 g reduziert. Der Natriumsulfatgehalt war gegen 6 Proz., der durch Dialyse entfernt werden kann.

Die günstigen Erfolge mit dieser Methode wurden durch Pribram und H. Berger bestätigt. Auch Kretz fand sie brauchbar bei Konzentrierungen von großen Quantitäten, wie sie für Serumfabrikationsstätten allein in Betracht kommen. Es gelang ihm unter Umgehung einer Reihe von Schwierigkeiten so ein 100-faches Serum auf ein 500 bis 600-faches zu konzentrieren, wobei allerdings beträchtliche Verluste der absoluten Antitoxinmengen mit in den Kauf genommen werden mußten.

20 bis 30 Liter Serum werden in Flaschen, die nicht ganz vollgefüllt sind, auf etwa 35° erwärmt und mit 20 Proz. vorgewärmtem wasserfreiem Natrium sulfuricum versetzt. Wenn darauf geachtet wird, daß keine größeren Stücke in die Flaschen gelangen, löst sich das Salz bei tüchtigem Durchschütteln rasch auf und es bildet sich, in der ganzen Flüssigkeit verteilt, eine milchige Trübung. Die ganze Masse ist eben noch so flüssig, daß

sie mittels steriler Heber auf sterilisierte Glasrichter mit Papierfilter übergesaugt werden kann. Der größte Teil der Sole wird so im Brutschranke bei etwa 35° abfiltriert und der dicke breiige Filtrerrückstand mit den Trichtern wird danach in einen Kühlkasten gebracht.

Der Kasten besteht aus einer doppelwandigen Kiste, deren Zwischenraum zwischen den Wänden mit Isoliermaterial gefüllt ist. Die Innenfläche ist mit Zinkblech beschlagen und der Raum durch eine vertikale durchlochte Blechwand in einen kleineren und einen größeren Abschnitt geteilt; der größere Raum dient zur Aufnahme der Trichter mit der zu kühlenden Masse, der kleinere enthält das Eis. Um eine möglichst große Angriffsfläche für die Kühlflüssigkeit zu bieten, werden Trichter angewandt von 50 cm Höhe und 30 cm oberem Durchmesser. Diese Trichter werden durch Gummistopfen in den Boden des Kühlkastens eingedichtet und münden in die zur Aufnahme des gelösten Eiweißes dienenden Behälter, welche außerhalb des Kastens stehen. In den kleinen Abschnitt wird Wasser gegossen und ein Eisblock hineingelegt, der ab und zu mit Kochsalz bestreut wird. Nach etwa einer Viertelstunde ist das ganze Wasser auf 3 bis 5° gekühlt und durch entsprechend große Eisblöcke auf konstanter Temperatur gehalten worden.

Innerhalb 5 bis 6 Tagen ist das gesamte Serum konzentriert und kann zum Aufbessern minderwertiger Seren Verwendung finden, da die Konzentrierung eine starke Viskosität der Flüssigkeit zur Folge hat.

Ein weiteres Verfahren aus neuerer Zeit ist von Gibson beschrieben:

Geringwertiges Serum wird dadurch gefällt, daß man unter Umrühren ein ebenso großes Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung allmählich zusetzt (Mercks pur. cryst.). Nach ein- bis zwei-stündigem Stehen wird der Niederschlag in große Faltenfilter gesammelt und wieder in ebensoviel Wasser wie die ursprüngliche Serummenge gelöst. Zum Entfernen des Filtrierpapiers filtriert man durch Gaze und fällt wieder mit gesättigter Ammonsulfatlösung aus. Das Quantum der letzteren entspricht der zur Lösung benutzten Menge Wasser. Nach Sammeln des neuen Niederschlages im Filter wird derselbe mit doppelt soviel gesättigter Kochsalzlösung behandelt wie das ursprüngliche Volumen Serum betrug.

Das Filtrierpapier wird wieder durch Gaze entfernt. Der Chlornatriumauszug bleibt über Nacht stehen. Darauf saugt man die helle Lösung der antikörperhaltigen Globuline ab und filtriert sie. Das Ungelöste wird nochmals mit Kochsalzlösung ausgezogen und zu dem ersten Kochsalzauszug der nächsten Globulinpräparation hinzugefügt.

Nun werden die Auszüge mit 0,25 Proz. Essigsäure vollständig gefällt. Der Niederschlag wird in Faltenfiltern gesammelt und nach Abfluß des Filtrats werden die Filter ausgebreitet und zwischen dicken Lagen von Filtrierpapier (25 bis 50 Bogen) mit Hilfe von schweren Gewichten (etwa 25 kg) ausgepreßt. Dadurch wird das Präzipitat gründlich von Feuchtigkeit befreit und dann vom Filter entfernt und in einem Dialysierschlauch aus Pergamentpapier 12 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach vorsichtiger Neutralisation mit Soda wird die Dialyse noch 2 bis 3 Tage fortgesetzt. Zur Verhütung von Fäulnis setzt man etwas Chloroform zu. Ist die Dialyse beendet, so filtriert man die Lösung zunächst durch Papier und versetzt sie mit $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Proz. Kochsalz, worauf die Sterilisation durch Berkefeldsche Kerzen erfolgt. Die ersten durchgeflossenen Kubikzentimeter werden wegen ihres geringen Wertes nicht verwandt. Nach eventueller zweiter Filtration durch Berkefeldkerzen wird ein Antiseptikum zugesetzt.

Die Gibsonsche Methode arbeitet mit etwa 20 Proz. Verlust an Antitoxinen, wofür man allerdings eine 2- bis 3-fache Konzentration des Serums erzielt. Aus 9000 ccm Serum zu 300 Immunitätseinheiten pro Kubikzentimeter erhält man 3320 ccm eines 700 fachen Serums.

Durch stufenweises Zusetzen von immer höheren Konzentrationen von Ammonsulfat zu Pferdeblutplasma und nachheriges Lösen in Kochsalz konnten Banzhaf und Gibson die Einengung des Antitoxins aufs Fünffache bringen. Sie fanden nämlich, daß die in gesättigter Chlornatriumlösung löslichen Globuline von den höheren Fraktionen viel antitoxinreicher pro Gramm Protein sind als die von den niedrigeren Ammonsulfatkonzentrationen ausgefallten Globuline. Aus einem 400-fachen Serum konnten sie so eine Globulinlösung darstellen, die 2000-fach war.

Es sind dann noch zahlreiche Versuche angestellt worden, das Antitoxin durch verdauende Fermente vom Eiweiß zu trennen. Pröscher will eine Reinigung des Diphtherieantitoxins erzielt

haben, indem er Pankreassaft bei 32° auf das Serum einwirken ließ. Dadurch sollte das den Antikörpern anhaftende Protein peptonisiert und darauf das Antitoxin durch Fällen mit Ammonsulfat bei Halbsättigung vom Pepton getrennt werden. Durch Dialyse sollte der letzte Rest des Peptons dann entfernt werden.

Brieger konnte mit dieser Methode kein eiweißfreies Antitoxin erhalten, auch wenn er die Pankreatinverdauung auf 3 Wochen ausdehnte und frischen Pankreassaft hinzufügte. Auch Papayotin vermochte das Antitoxin nicht vom Eiweiß zu isolieren. Die Verdauungsversuche bedingten alle eine erhebliche Herabsetzung des Wertes der Seren.

Zu erwähnen ist noch eine Methode von Brieger und Ehrlich, die Wassermann modifiziert hat, und die eine quantitative Ausbeute des Antitoxins aus der Milch gibt: Zu einem Liter unter aseptischen Kautelen steril gewonnener Milch werden 20 ccm $\frac{1}{1}$ n-Salzsäure und die gerade zur Gerinnung ausreichende Menge Labferment zugesetzt. Nach erfolgter Kaseinabscheidung wird die Molke abgossen und durch Schütteln mit Chloroform entfettet. Die klare Molke wird mit 30 bis 33 Proz. Ammonsulfat versetzt. Die Fällung wird abfiltriert und rasch im Vakuum auf Tontellern getrocknet, sodann durch Abpressen vom überschüssigen Ammonsulfat befreit und in der gewünschten Menge Wasser gelöst. Will man eine 10-fache Konzentration, so löst man die aus 5 Liter Molke gewonnene Masse in 500 ccm Wasser.

Eine Reinigung des Diphtherieantitoxins, die dadurch sehr wertvoll ist, daß das Serum keine anaphylaktischen Erscheinungen beim Menschen mehr auslöst, ist in letzter Zeit v. Behring gelungen. Durch Fällung des Diphtherieserums mit Magnesiumsulfat und Ammonsulfat erhielt er eine Lösung, die hauptsächlich „Paralbumine“, an die das Antitoxin gebunden ist, aufweist.

Neuerdings hat sich Sames eine Reinigung des Diphtherieserums patentieren lassen. Ich bringe das Verfahren in dem Kapitel „Tetanusanitoxin“, weil es sich mehr zur Verbesserung geringwertiger Seren wie hochwertiger eignet, da bei letzteren die Verluste zu groß sind.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1894. Banzhaf und Gibson, The Journal of Biological Chemistry 1907. Babes, Bull. de l'acad. méd. 1895. v. Behring, Infektion u. Desinfektion, Leipzig 1894. v. Behring und Boer, Ges. Abhandl. z. ätiolog. Therap. von

ansteckenden Krankheiten, 2. Teil. Behring und Knorr, Ztschr. f. Hyg. 1893. Behring und Kitasato, Deutsche med. Wochenschr. 1890. Blumenthal, Ph., Berl. klin. Wochenschr. 1908. Brieger, Festschr. f. Koch 1903. Brieger und Boer, Ztschr. f. Hyg. 21. Brieger und Ehrlich, ebenda 13. Brieger und Krause, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Brunner u. Pinkus, Biochem. Ztschr. 1907. Bujwid, Zentralbl. f. Bakt. 22. Cobbett, ebenda 1898. Dziergowsky, Ref. ebenda 34 u. 21. Ehrlich, P., Klin. Jahrb. 1897. Ehrlich und Wassermann, Ztschr. f. Hyg. 1894. Ehrlich, Kossel und Wassermann, Deutsche med. Wochenschr. 1894. Freund und Sternberg, Ztschr. f. Hyg. 1899. Gibson, Journal of Biological Chemistry 1906. Gibson und Collins, ebenda 1907. Kretz, Handb. d. Technik usw. von Kraus u. Levaditi 1909. Kinyoun und Hitchens, Ref. Zentralbl. f. Bakt. 1907. Madsen, Ztschr. f. Hyg. 24. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 1908. Derselbe, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi 2, 1909. Marengi, Zentralbl. f. Bakt. 1897. Martin, C. r. de la soc. de biol. 1903. Marx, Festschr. f. Koch 1903. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. 38. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 1904. Müller, ebenda 1898. Otto, Arb. a. d. Königl. Inst. f. exp. Therap., Frankfurt a. M. 1906. Derselbe, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1906. Palmirski und Orłowski, Ref. Zentralbl. f. Bakt. 1896. Park und Throne, The Americ. Journ. of the Med. Sc. 1906. Pribram, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi 2, 1909. Pröschner, Münch. med. Wochenschr. 1902. Patentanspruch Nr. 13757 (P 30) 1902. Roux, X. Congrès internat. de méd., Paris 1900. Roux, Martin und Chaillou, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894. Sames, Patentanspruch Nr. 268223, Kl. 30 h, 1913. Salomonsen und Madsen, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898. Seng, Ztschr. f. Hyg. 1899. Wassermann, ebenda 1894. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1898. Wernicke, Handbuch der pathologischen Mikroorganismen von Kolle und v. Wassermann 1913.

Heufieberserum.

a) Das Heufiebertoxin.

Das Heufiebergift wird hauptsächlich aus Gramineenpollen, außerdem aus den Pollen der Ambrosia und Solidago hergestellt. Nachdem es schon Blackley gelungen war, wirksame Pollenprodukte zu gewinnen, blieb es Dunbar und seinen Mitarbeitern vorbehalten, das spezifische Pollentoxin zu finden.

Bei der Extraktion der fein zermahlenden Pollen mit Alkohol und Äther resultiert eine braune wachsartige Masse, die wie Fleischextrakt riecht und bei Einbringung in die Augenbindehaut des Menschen eine Reizung hervorruft. Diese Reizwirkung der Alkohol- und Ätherextrakte ist jedoch nicht spezifisch, weil sie sowohl bei

Normalpersonen wie bei heufieberempfindlichen Leuten beobachtet wird.

Das spezifische Gift wird gewonnen durch Extraktion der Pollen mit Kochsalzlösung. Am besten läßt man eine mit 0,5 Proz. Karbolsäure versetzte etwa 5 proz. Kochsalzlösung 5 bis 10 Stunden bei 37° einwirken. Beim Zentrifugieren erhält man einen Bodensatz der der Hauptsache nach aus leeren Pollenhüllen besteht, über denen weiße Stärkestäbchen in feiner Schicht lagern. Dieser Rückstand kann völlig vernachlässigt werden. Das wirksame Prinzip ist in der darüberstehenden Flüssigkeit enthalten, die durch entsprechende Verdünnung auf einen Kochsalzgehalt von 0,8 Proz. gebracht wird. Dieser Extrakt ist nur für Heufieberpatienten stark wirksam. Durch Berkefeldfiltration kann das Pollentoxin sterilisiert werden.

Das Toxin kann aus dem Extrakt durch Fällung mit Alkohol gewonnen werden. Die Ausfällung ist quantitativ, in das Filtrat gehen wirksame Substanzen nicht über. Ebenfalls können die Eiweißkörper mit der spezifischen Wirkung aus dem vollen Extrakt durch Dialyse gewonnen werden. Nach den Untersuchungen von Dunbar und Prausnitz ist das Pollentoxin an die Albumine gebunden. Aus dem aufgelösten Alkoholniederschlag wird das Toxin mit Magnesiumsulfat durch fraktioniertes Aussalzen dargestellt. Desgleichen wurde es aus dem Kochsalzextrakt mit Ammoniumsulfat gefällt.

Das gelöste Pollentoxin ist ziemlich unbeständig. Dagegen behält das durch Alkoholfällung gewonnene und getrocknete Polleneiweiß jahrelang seine Wirksamkeit unverändert.

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Pollentoxins sind des genaueren von Prausnitz und Kammann untersucht worden. Gegen Säuren ist das Gift sehr resistent, Alkalien vernichten es rasch. So trat in Lösungen mit 2,5 Proz. Schwefelsäure in 5 Stunden keine nachweisbare Veränderung des Giftes ein. Bei einem Zusatz von 2,5 Proz. Kalilauge verlor es etwa $\frac{3}{4}$ seiner Wirksamkeit.

Durch Verdauung mit einem Pepsinsalzsäuregemisch oder mit Trypsin wird das Gift größtenteils zerstört. Doch ist selbst nach mehrtägiger Verdauung nicht das gesamte Toxin unwirksam.

Das Pollengift ist ziemlich widerstandsfähig gegen höhere Temperaturen. Eine einstündige Erwärmung von 60 bis 70°

schädigt es nicht. Bei Temperaturen zwischen 80 bis 90° tritt ein Verlust von $\frac{1}{4}$, beim Kochen ein solcher von $\frac{3}{4}$ der ursprünglichen Wirksamkeit ein. Noch nach einer Erwärmung von 1 Stunde auf 120° war die Wirksamkeit der Giftlösung nicht völlig aufgehoben, erst bei 150° verliert das Gift die toxischen Eigenschaften.

Am empfindlichsten für das Pollentoxin sind die für die Heufiebererkrankung prädisponierten Menschen. Dieselben individuellen Unterschiede wie unter den Menschen bestehen innerhalb jeder Tierart. Doch sind Kaninchen, Ziegen und Pferde bei weitem weniger empfänglich für das Pollengift als der Heufieberpatient. Beispielsweise reagierte nur ein kleiner Bruchteil der von Prausnitz geprüften Pferde auf subkutane Injektion des Extraktes von 0,5 bis 1 g Roggenpollen. Auch unter den reagierenden Pferden machten sich große Differenzen bemerkbar. Bei einigen Tieren rief die Injektion nur eine lokale Anschwellung von 10 bis 20 cm Durchmesser an der Injektionsstelle und eine über den ganzen Körper verbreitete Urticaria hervor; bei anderen Pferden betrug der Durchmesser der Infiltrationen 50 bis 75 cm, verbunden mit hohem Fieber und schweren Allgemeinerscheinungen.

Eine lokale Giftempfindlichkeit der Schleimhäute, wie sie in hervorragender Weise beim heufieberempfindlichen Menschen besteht, sah Prausnitz bei diesen Tieren nie, dagegen ist sie von Gildemeister in einigen Fällen beobachtet worden. Von neun Pferden, die auf die subkutane Giftinjektion reagierten, zeigten drei nach Einbringung von 5 Tropfen einer 10 proz. Roggenpollengiftlösung in die Bindehaut eine deutliche Rötung der Schleimhaut.

Beim Heufieberpatienten genügt stets ein Tropfen einer Lösung des Trockentoxins 1:20 000 bis 1:40 000 in die Conjunctiva oder auf die Nasenschleimhaut, um die charakteristischen subjektiven und objektiven Erscheinungen des Heufiebers hervorzurufen. Bei besonders empfindlichen Patienten wirkt das Gift schon in millionenfacher Verdünnung.

Nach Instillation der eben angegebenen Giftmenge in die Bindehaut macht sich nach 2 bis 3 Minuten Jucken oder Brennen im inneren Augenwinkel bemerkbar. Nach weiteren 1 bis 2 Minuten tritt eine Gefäßinjektion auf, welche sich schließlich über die ganze Conjunctiva ausbreitet. Unter starker Lichtscheu und Zunahme des Juckens kommt es zu profuser Tränensekretion und Schwel-

lung der *Conjunctiva bulbi*. Nach einer halben bis mehreren Stunden klingen die Symptome ab.

Bei Einbringung der Giftlösung auf die Nasenschleimhaut kommt es zu heftigem Niesen, Gefäßinjektion und starker Schwellung der Nasenschleimhaut, die rasch bis zur völligen Verstopfung der Nasenhöhle zunehmen kann.

Literatur: Dunbar, Zur Ursache und spezifischen Behandlung des Heufiebers. München 1903. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 9. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1903. Derselbe, ebenda 1905. Kammann; Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 5, 1904. Liefmann, Ztschr. f. Hyg. 46, 1904; Hyg. Rundschau 1906. Prausnitz, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi 1, 1908. Derselbe, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann 1913.

b) Das Heufieberantitoxin.

Als Serumspender wählt man Pferde. Es sind jedoch nur die Tiere brauchbar, welche auf die Injektion von 0,5 g Pollen bzw. 0,2 g Protein reagieren. Alle anderen, etwa $\frac{2}{3}$ der geprüften Tiere, eignen sich nicht zur Gewinnung des Pollenantitoxins.

Das Gift wird subkutan injiziert. Nach völligem Ablauf der Reaktion, die auf die Einspritzung des Giftes auftritt, wird die Injektion mit steigenden Dosen wiederholt. Mit immer steigenden Dosen behandelt, ertragen die Pferde meist nach mehrmonatiger Behandlung das 20- bis 30-fache, manchmal sogar das 50-fache der Giftmenge, auf die sie anfangs starke Reaktionen zeigten. Es bietet somit die Immunisierung mit Pollentoxin keine besonderen Schwierigkeiten, wenn man die allgemeinen Vorschriften für die Immunisierung beobachtet.

Durch fortwährende Untersuchung des Serums während der Behandlung bleibt man über die Wertigkeit desselben unterrichtet und nach Feststellung des Maximums an Antikörpern, das bei jedem Tier verschieden ist, schreitet man zur Blutentnahme.

Das flüssige Antitoxin wird mit 0,25 proz. Phenol versetzt und behandelt wie andere Seren. Das im Vakuum bei 45° getrocknete Serum wird in Kugelmühlen fein gemahlen und mit der $1\frac{1}{2}$ -fachen Menge sterilen Milchzuckers gründlich vermischt. Die ganze Herstellung geschieht natürlich streng aseptisch.

Zur Prüfung für die Wertigkeit seines Serums hat Dunbar folgende Methodik gewählt. Als Testgiftosis nehmen

Dunbar und Prausnitz jene Verdünnung des spezifischen Toxins an, die bei Heufieberkranken die charakteristischen Erscheinungen an der Conjunctiva hervorzurufen vermag. Zu dieser Testgift-dosis wird das Serum in fallenden Mengen zu gleichen Teilen zugesetzt. Zur möglichst festen Bindung bleiben die Gemische 1 Stunde bei 37° stehen. Die Mischung mit der größten Serumverdünnung, welche, in den Conjunctivalsack eines Heufieberpatienten geträufelt, eben keine Reizwirkung mehr erzeugt, in welcher also das Toxin bis zur Reaktionslosigkeit neutralisiert war, gibt die Wertigkeit eines Serums an. Die in den Handel kommenden Seren müssen mindestens 30-fach sein. $\frac{1}{30}$ ccm eines solchen Serums macht $\frac{1}{40\,000}$ des Giftes (Testgift-dosis) völlig unwirksam. Die Fehlergrenze bei dieser Prüfungsmethode soll nicht über 10 Proz. betragen.

Der antitoxische Charakter dieses Serums wird allerdings von anderer Seite bestritten. Weichardt und Wolff-Eisner halten es für ein zytolytisches.

Bei $\frac{1}{2}$ -ständiger Erhitzung auf 60° in einer Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verliert das Pollenanti-toxin vollkommen seine Wirksamkeit. Die Haltbarkeit des Antitoxins bei Aufbewahrung bei 23° ist ziemlich beschränkt, nach Jahresfrist können schon Antitoxinverluste von 25 Proz. auftreten. Auch im Eisschrank aufbewahrt behält das Serum nicht gleichmäßig lange seine Wertigkeit.

Bei Fällung des Serums mit Ammonsulfat findet sich das Antitoxin bei der Globulinfraktion.

Literatur: Dunbar, Zur Ursache und spezifischen Behandlung des Heufiebers, München 1903. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1903. Derselbe, ebenda 1905. Kammann, ebenda 1906. Kammann und Gaechtgens, Ztschr. f. Immunitätsforschung 1912. Prausnitz, Berl. klin. Wochenschr. 1905. Derselbe, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi 2, 1909. Derselbe, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann 1913. Wolff-Eisner, Das Heufieber, sein Wesen und seine Behandlung, München 1906. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1907.

Rauschbrandserum.

a) Das Rauschbrandtoxin.

Grassberger und Schattenfroh bereiten den Nährboden für die Giftgewinnung auf folgende Weise: 10 g Pepton, 5 g Koch-

salz, 5 g Liebigs Fleischextrakt werden in einem Liter gewöhnlichen Wassers gekocht und neutralisiert. Je 750 g von der Lösung werden ohne Filtration in Erlenmeyerkolben von 1 Liter Inhalt gebracht und an vier aufeinanderfolgenden Tagen je $\frac{3}{4}$ Stunden im Dampftopf erhitzt.

Außerdem werden 50 g Stärkezucker oder gereinigte Dextrose in 50 g Wasser gelöst und $\frac{3}{4}$ Stunden unter einem Druck von 3 Atm. sterilisiert.

Zu jedem Erlenmeyerkolben mit 750 ccm der beschriebenen Nährlösung werden 50 ccm der Zuckerlösung hinzugefügt, dann erfolgt noch ein Zusatz einer größeren Menge dickflüssiger, unter Druck sterilisierter Schlemmkreide. Das Ganze wird jetzt eine Stunde bedampft und mit einer 3 cm hohen Schicht von bei 4 Atm. sterilisiertem Paraffinum liquidum bedeckt. Jetzt wird nochmals eine halbe Stunde sterilisiert, der Kolben rasch in Wasser gestellt und auf etwa 37° abgekühlt. Jeder Kolben wird mit einem ganzen Röhrenchen einer lebhaft gärenden Kultur von 24 Stunden beschickt.

Solche mit Massenkulturen geimpfte Kolben zeigen sehr häufig bereits nach einem Aufenthalt von 12 Stunden eine kräftig einsetzende Gärung. Der am Boden sitzende Kreideschlamm wird von jetzt ab täglich zwei- bis dreimal durch ruckweises Drehen aufgewirbelt. Dabei entweichen unter reichlicher Schaumbildung Gasblasen.

Je nach der verwendeten Ausgangskultur ändert sich der Zeitpunkt der größten Giftbildung in den Kolben. Nach Grassberger und Schattenfroh gibt der Ablauf der Gärung einen gewissen Maßstab hierfür. Häufig tritt nach den ersten zwei bis drei Tagen eine auffällige Steigerung der Schaumbildung ein. Geht die Gasentwicklung in weiteren fünf bis sechs Tagen stark zurück, so wird die Kultur aus dem Brutschrank herausgenommen und nach Zusatz von einigen Kubikzentimetern Chloroform im Eisschrank aufbewahrt. Solche Kulturen sollen unter diesen Verhältnissen acht bis zehn Wochen und länger ihre volle Toxizität behalten.

Die Bakterien werden durch Filtration durch Papier oder durch scharfes Zentrifugieren entfernt. Die Herstellung einer klaren Giftlösung gestaltet sich nach dem Verfahren von Grassberger und Schattenfroh in folgender Weise: Die Kultur wird in einen Scheidetrichter gebracht, wobei man vorsichtig

abgießt, so daß der kreidige Bodensatz zurückbleibt. Durch Öffnen des Hahnes des Scheidetrichters kann die Flüssigkeit abgelassen und vom Paraffin getrennt werden. Diese stark getrübbte Giftlösung wird jetzt mit größeren Mengen sterilisierter, fein gepulverter Kreide versetzt und durch Schütteln des Kolbens gut vermischt. Darauf wird durch einen Trichter mit doppeltem Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird wiederum mit trockener Kreide gemischt und durch Papier filtriert. Durch eine derartige Vorfiltration wird der größte Teil der suspendierten Bestandteile entfernt. Dadurch vermeidet man eine zu starke Verlegung der Filterporen bei der nachherigen exakten Filtration.

Das exakte Filter, welches die Giftlösung von den Rauschbrandbazillen und Sporen befreien soll, wird von Grassberger und Schattenfroh folgendermaßen hergestellt:

In einen Glastrichter von etwa 15 cm Durchmesser wird ein locker gedrehter, aber gut anliegender Wattepfropf so hineingesteckt, daß er etwa 2 cm in den Hals und 2 cm in den weiten Teil hineinragt.

Dieser Trichter wird außen am Übergang zwischen Hals und weitem Teil mit mehreren Lagen Watte umwickelt, damit er beim Aufsetzen auf einen großen Erlenmeyerkolben gut abgedichtet ist. Hierauf wird er oben mit einem Blechdeckel oder Pergamentpapier verschlossen. Die gesamte Filteranlage wird bei 160° sterilisiert.

Etwa 40 bis 50 g trockene sterilisierte Schlemmkreide, die in einem Kölbchen mit weitem Hals vorrätig gehalten werden, mischt man mit gut sterilisiertem, noch siedend heißem Wasser und gießt nun den dicken Kreidebrei über die Watte im Trichter. Es entsteht dadurch über dem Wattepfropfen eine nicht mehr bewegliche Kreidemasse mit glatter Oberfläche. Diese wird mit einem kreisrunden Stück sterilisierten Filtrierpapiers bedeckt.

Die vorfiltrierte Giftlösung wird nun durch einen Trichter mit engem Abfluß, anfangs in Tropfen, dann im dünnen Strahl auf das Filter gegossen. Nach Filtration von etwa 50 ccm Flüssigkeit wechselt man den Kolben, um das Gift nicht mit dem Wasser, welches aus der Kreideaufschwemmung stammt, zu verdünnen. Darauf wird die Filtration sich selbst überlassen. In 12 bis 24 Stunden soll man auf diese Weise etwa $\frac{3}{4}$ Liter Filtrat erhalten.

Eine Reinigung oder Kondensation durch Aussalzen der Giftlösungen mit Ammonsulfat sowie durch Fällung mit Alkohol

oder Alkoholäther gelingt nicht. Desgleichen schlugen die Versuche, durch Einengen im Vakuumapparat bei 30° die Kulturfiltrate zu konzentrieren, fehl. Das Gift wird bei diesen Prozeduren zum größten Teil zerstört.

Ein Trockentoxin mit ungeschmälerter Giftwirkung erhält man nur durch Eindampfen der vorher in Eis gekühlten Giftlösung im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure.

Eigenschaften.

Die keimfreien Giftlösungen sind verschieden lange haltbar. Die Wirksamkeit des Rauschbrandgiftes nimmt gelegentlich schon nach Tagen, meist nach Wochen ab, selbst wenn die luftdicht verschlossenen Proben in der Kälte aufbewahrt werden.

Grassberger und Schattenfroh konstatierten ferner eine Abnahme der Wirksamkeit, wenn die giftigen Lösungen mit Luft geschüttelt wurden.

Oxydationsmittel (Kaliumpermanganat) wirken stark schädigend auf das Rauschbrandgift. Eine besonders große Empfindlichkeit zeigt das Gift gegenüber Carbolsäure. Ein 1proz. Zusatz von Carbolsäure macht die toxische Lösung unwirksam, ein 1proz. Formalinzusatz bedingt dagegen eine Abschwächung des Giftes. Ohne Einfluß fanden Grassberger und Schattenfroh das Chloroform, welches sie daher zur Konservierung der Giftlösungen empfehlen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Leclainche und Vallée konnten die oben genannten Autoren die große Hitzebeständigkeit des Rauschbrandgiftes nicht bestätigen. Erwärmen der Giftlösungen auf 50° während einer Stunde zerstört sie vollständig.

Vom Delphinfilter, noch mehr von Chamberland- und Berkefeldkerzen wird ein großer Teil des Giftes zurückgehalten.

Die Wertbemessung des Rauschbrandgiftes nehmen Grassberger und Schattenfroh am Meerschweinchen vor. Sie bezeichnen eine Giftlösung mit der dosis letalis 0,01ccm als Normalgiftlösung. Das Rauschbrandgift zeigt ebenso wie das Diphtherie- und Tetanusgift eine Latenzperiode, nach welcher die ersten Symptome der Vergiftung bei den damit behandelten Tieren

auftreten. Die Inkubationszeit läßt sich durch Anwendung selbst der vielfach tödlichen Dosis nie ganz beseitigen, sie kann nur gegenüber der einfach tödlichen Dosis abgekürzt werden. So läßt sie sich nicht unter eine Stunde herunterdrücken, selbst nicht durch Injektion der 1000-fachen tödlichen Dosis.

Die Empfänglichkeit gegenüber der subkutanen Einverleibung des Giftes ist, auf das Kilogramm Körpergewicht berechnet, annähernd gleich groß bei Meerschweinchen, Kaninchen, Mäusen, Hunden, Igel, Affen, Schafen, Rindern, Hühnern und Tauben. Die Kaltblüter verhalten sich refraktär auf die Injektion des Giftes (Grassberger und Schattenfroh).

Die Intoxikationserscheinungen der Meerschweinchen sind ungefähr folgende. Einige Stunden nach der Injektion der einfach tödlichen Giftdosis bildet sich an der Injektionsstelle eine schmerzhaft teigige Infiltration, welche sich in acht bis zehn Stunden stark vergrößert. Dabei entstehen Blutungen in der Haut. Die Tiere werden teilnahmslos und verlieren die Freßlust. Im Anfang der Krankheit kommt es zu leichten Temperatursteigerungen, später fällt die Temperatur unter die Norm. Die Tiere zeigen erhöhte Reflexerregbarkeit. Wenige Stunden vor dem Tode beobachtet man einen blutigen Ausfluß aus Mund und Nase. Der Tod erfolgt in zwei bis vier Tagen.

Bei Anwendung von untertödlichen Dosen machen sich an der Impfstelle Schwellungen bemerkbar, die oft unter Nekrose und Narbenbildung ausheilen. Durch entsprechend höhere Dosen kann die Krankheitsdauer auf sechs bis sieben Stunden abgekürzt werden.

Bei intraperitonealer Einspritzung treten die Allgemeinerscheinungen rascher auf, die einfach tödliche Dosis ist jedoch ungefähr dieselbe wie bei subkutaner Impfung.

Kaninchen zeigen auf die intravenöse Injektion eigentümliche Erscheinungen. Eine bis mehrere Stunden nach der Impfung von mehreren tödlichen Dosen werden die Tiere unruhig. Sie springen aus dem Käfig, kauern vor demselben oder durchsetzen in Sprüngen den Raum, bis sie plötzlich an den Hinterbeinen gelähmt werden und gleich darauf unter Schreien und Krämpfen zugrunde gehen. Die einfach tödliche Dosis bei intravenöser Einverleibung ist kleiner als die bei subkutaner, auch ist die Inkubationszeit kürzer.

b) Das Rauschbrandantitoxin.

Grassberger und Schattenfroh gelang eine rasche Giftimmunisierung bei Rindern und Schafen. Schon nach einer subkutanen Injektion, auf die stärkere Reaktionserscheinungen gefolgt waren, zeigte sich eine starke Resistenzerhöhung gegen das Rauschbrandtoxin bei den damit behandelten Tieren. 3- bis 4-malige Einspritzungen von im ganzen 60 bis 70 ccm Normalgiftlösung erzeugten bereits einen derartigen Schutz, daß Mengen von 300 bis 1000 ccm der Normalgiftlösung ertragen wurden, ohne daß Reaktionen bis auf leichte Schwellung an der Injektionsstelle auftraten. Die Injektionen können in Intervallen von einer Woche wiederholt werden, da nach einer Woche post injectionem alle Reaktionserscheinungen völlig abgelaufen sind. Eine Überempfindlichkeit im Laufe der Behandlung ist selbst nach Überstehen der schwersten lokalen und allgemeinen Erscheinungen bei den serumspendenden Tieren gegenüber dem Gift nie beobachtet worden. Die Gewinnung eines hochwertigen Serums ist darum nicht besonders schwierig, es genügt meist eine 4- bis 5-monatige Behandlungszeit, um von Jungrindern ein 400-faches Serum zu erlangen. Bei Rindern und Schafen kann eine glatte Immunität auch leicht dadurch erzielt werden, daß die Behandlung mit einem überkompensierten Toxin-Antitoxingemisch, das also Serum im Überschuß enthält, begonnen wird.

Kitt vermochte schon vorher durch subkutane Verimpfung von Rauschbrandfleisch ein Immunserum zu gewinnen. Weiter gelang es dann noch Leclainche und Vallée, Dünschmann sowie Foth wirksame Rauschbrandsera herzustellen.

Die Prüfung auf den Wertgehalt des Serums wird nach Grassberger und Schattenfroh mittels der Mischmethode vorgenommen. Als Normalgift bezeichnen sie eine Giftdosis, die in einem Kubikzentimeter 100 tödliche Dosen für 250 g schwere Meerschweinchen enthält. Ein Serum, welches in Mengen von 1 ccm diese Testgiftdose neutralisiert, nennen sie Normalserum. Ein Serum, von dem beispielsweise 0,0025 ccm genügen zur Neutralisation der Normalgiftdosis, ist also 400-fach.

Das Rauschbrandantitoxin ist von außerordentlich langer Haltbarkeit, wenn es nur vor Licht geschützt aufbewahrt wird. Das Serum wird mit Chloroform versetzt in zugeschmolzenen

Glasgefäßen in der Kälte aufbewahrt. Selbst eine langdauernde Erhitzung auf 60° (19 Stunden) schädigt das Antitoxin nicht merklich.

In neuester Zeit ist es Detre¹⁾ gelungen, ein Rauschbrandserum vom Pferd zu gewinnen, welches gegen Infektion mit Kultur schützte.

Das Pferd war anfangs mit Leberbouillonkultur intravenös vorbehandelt worden. Die Anfangsdosis betrug 5 ccm 1 tägiger Kultur und wurde anstandslos vertragen. Detre steigerte sodann in Intervallen von 5 bis 14 Tagen die Dosen, wie folgt: 20, 30, 50, 95, 105 (Anaphylaxieanfall), 100, 100, 125, 150, 150 und 50 ccm 4-tägiger, aber sporenfreier Kultur. Nach dieser Behandlung hatte das Serum des Pferdes bereits bakterizide Kraft erworben, die jedoch durch folgende weitere Injektionen nicht wesentlich erhöht werden konnte: 100 (6-tägige), 100 (3-tägige) + 50 ccm (10-tägige Kultur). Erst die Verwendung von Rauschbrandkulturen in Leberstückbouillon unter sonst aëroben Verhältnissen brachte die gewünschte Erhöhung des Serumwertes. Von dieser Bouillonkultur gab Detre beispielsweise Dosen von 50 ccm 4-tägiger Kultur und 25 ccm 15-tägiger + 50 ccm 6-tägiger Kultur. Nach einer mehrwöchentlichen Behandlung hatte das Serum einen „Schutzwert“ von 0,005 bis 0,01 ccm. Um den Titer des Serums auf gleicher Höhe zu erhalten, genügt es, dem Pferde etwa alle 2 Monate etwa 50 bis 100 ccm der Kultur intravenös zu verabreichen. Sämtliche Injektionen werden ohne stärkere Reaktionen vertragen.

Detre prüft dieses antiinfektiöse Rauschbrandserum am Meerschweinchen. Das zu prüfende Serum wird in fallenden Mengen mit je einer Kulturdosis gemischt, die ein Meerschweinchen in 36 bis 40 Stunden sicher tötet. Die Mischung wird 15 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten und dann in einen Schenkel eingespritzt. Als „Schutzwert“ bezeichnet Detre diejenige Serumdosis, welche, in geschilderter Weise injiziert, ein Meerschwein vor dem Tode bewahrt.

Die Wirkungsweise des Serums von Detre im Tierkörper ist noch nicht geklärt. Gefunden sind in diesem Rauschbrandserum

¹⁾ Virchows Archiv **213**, September 1913.

bakterizide (nicht für Sporen), agglutinierende, präzipitierende, komplementbindende sowie phagozytosebefördernde Eigenschaften.

Literatur: Grassberger und Schattenfroh, Arch. f. Hyg. 1904 u. 1906. Dieselben, Über das Rauschbrandgift und antitoxische Serum, Leipzig und Wien 1904. Dieselben, Über die Beziehung von Toxin und Antitoxin, Leipzig und Wien 1904. Dieselben, Handb. d. Technik usw. von Kraus und Levaditi, 1 u. 2, 1909. Kitt, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann 1913. Leclainche und Vallée, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900.

Ruhrserum (Dysenterieserum¹⁾).

a) Das Dysenterietoxin (Endotoxin).

Nachdem von den verschiedenen Forschern die besondere Giftigkeit der Schiga-Kruseschen Ruhrbazillen erkannt worden war, die sich auch darin äußerte, daß abgetötete Bazillen in gleich niederen Dosen denselben Effekt hervorriefen wie die Einspritzung lebender Keime, nahm man an, daß das Gift den Bakterienzellen als solchen anhafte. Mit anderen Worten: man hielt das Dysenteriegift für ein strenges Endotoxin im Sinne Pfeiffers. Man versuchte daher, das Gift in möglichst schonender Weise durch Zerstörung der Bazillen zu gewinnen.

Conradi schlug zuerst diesen Weg ein. In großen Kulturschalen wurden auf schwach alkalischem 3proz. Fleischwasseragar mit 1 Proz. Tropon Massenkulturen der Ruhrbazillen angelegt. Nach 20-stündigem Wachstum kratzte Conradi die Kulturrasen ab und brachte die feuchte Masse in zahlreiche enge sterile Röhrchen. Jedem Röhrchen wurden $\frac{2}{3}$ des Volumens der Bazillennasse 0,85proz. Kochsalzlösung hinzugefügt. Die Röhrchen wurden darauf 24, höchstens 48 Stunden im Brutschrank bei 37° gehalten. Die überstehende gelblich gefärbte, klare Flüssigkeit wurde jetzt von den einzelnen Röhrchen mit der Pipette abgesogen und zusammengemischt. Nach Verdünnung der ganzen Flüssigkeitsmenge auf das Fünffache mit Kochsalzlösung wurde dieselbe durch Berkefeldkerzen filtriert. Die so sterilisierten Filtrate wurden im Vakuum auf $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{50}$ ihres Volumens bei 35° eingeeengt und stellten dann das Bakteriengift dar. Dasselbe tötete stets in Mengen von 0,1 ccm, intravenös beigebracht, Kaninchen von 2,5 bis 3 kg.

¹⁾ Siehe Anmerkung unter Choleraserum (S. 177).

Neisser und Shiga spülten eine Agarkultur mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung ab, töteten diese Aufschwemmung durch einstündiges Erwärmen auf 60°, ließen sie zwei Tage im Thermostaten bei 37° stehen und filtrierten durch Reichelkerzen. Die filtrierten Emulsionen töteten Kaninchen bei intravenöser Impfung in Mengen von $\frac{1}{5}$ bis $\frac{1}{2}$ ccm innerhalb 48 Stunden. Ein Einengen der Aufschwemmung war nicht nötig.

Auch Vaillard und Dopter gewannen giftige Extrakte aus Bakterienaufschwemmungen, die sie durch Erwärmen auf 58° abgetötet hatten. Sie ließen die Emulsion allerdings 20 bis 40 Tage im Brutschranke stehen. Nach dieser Zeit lieferten die Emulsionen durch einfaches Absetzen eine klare Flüssigkeit durch Dekantieren, die steril war und in Dosen von 0,5 bis 1,0 Kaninchen durch intravenöse Einspritzung in 24 bis 48 Stunden tötete.

Schon nach kurzer Zeit konnten jedoch drei Autoren fast zu gleicher Zeit zeigen, daß das spezifische Gift der Shiga-Krusebazillen keineswegs streng an die Bakterienzelle gebunden sei. Rosenthal, Todd und Kraus war es gelungen, wie bei den Diphtherie- und Tetanusbazillen, in den Kulturfiltraten lösliche Gifte nachzuweisen. Diese Autoren erhielten allerdings nur schwache Giftwirkung ihrer von den Bakterienleibern getrennten Bouillonfiltrate. Nach 11-tägigem Wachstum benötigte Rosenthal von seinen Chamberlandfiltraten 5 ccm, nach dreiwöchigem Wachstum nur noch 1,0 bis 0,2 ccm, um die Versuchstiere zu töten. Auch Todd erzielte nur aus sechswöchigen Kulturen Gifte mit der letalen Dosis von 0,1 ccm. Kraus und Doerr erhielten jedoch schon Kulturfiltrate, deren dosis letalis 0,05 ccm pro Kilogramm Kaninchen betrug. Sie betonen aber, daß sie jüngere als dreiwöchige Kulturen zur Toxinbereitung überhaupt nicht mehr verwenden. Rosenthal hatte Martinsche Bouillon (s. Diphtherietoxin) verwendet und glaubte, daß ihm abweichend von früheren Forschern eine Toxin-erzeugung entweder infolge besonderer toxigener Eigenschaften seiner Kulturen oder durch den besonderen Nährboden geglückt sei.

Todd führte die Mißerfolge früherer Experimentatoren auf die zu geringe Alkaleszenz des Nährmediums zurück. Er selbst züchtete auf einer Bouillon, der er über den Lackmusneutralpunkt hinaus noch 7 ccm Normalnatronlauge hinzugesetzt hatte. Genauer hat Doerr diese Verhältnisse untersucht und gefunden, daß saure und lackmusneutrale Nährsubstrate keine oder nur geringe Mengen

Gift produzierten. Er erzielte das Optimum der Alkaleszenz, wenn er neutraler Bouillon 0,3 Proz. kristallisierte Soda hinzufügte. Um den Phenolphthaleinneutralpunkt zu erreichen, wären dann noch 8 bis 10 ccm Normalnatronlauge pro Liter nötig. Beim Sodazusatz und beim nachherigen Autoklavieren bilden sich Niederschläge, die aber nicht entfernt werden sollen. Konstantere Resultate bekam Doerr bei Züchtung in schwach lackmusalkalischer Bouillon, der er vor der Sterilisation etwas fein gepulverte Kreide (20 g pro Liter) zusetzte. Die Anwendung besonderer Pepton-sorten hält Doerr für überflüssig; Wittepepton liefert gute Resultate. Die Toxinproduktion wird erhöht, wenn der Luftsauerstoff möglichst freien Zutritt hat, daher füllt man die Kulturkolben nicht zu hoch mit der Nährflüssigkeit. Am zweckentsprechendsten für die Filtration sind Reichelkerzen. Doch empfiehlt Doerr für die Praxis wie beim Filtrieren der Diphtheriekulturen zu verfahren, da auch noch von den Reichelkerzen viel Toxin zurückgehalten wird. Die Kultur wird mit 0,5 Proz. Phenol oder 0,4 Proz. Trikresol versetzt, 24 Stunden stehen gelassen und dann durch Papierfilter bis zur völligen Klärung gegossen.

Bei genauer Beobachtung der mitgeteilten Vorsichtsmaßregeln erhält man schon von fünftägigen Kulturen sehr toxische Filtrate mit einer letalen Dosis von 0,01 ccm (Doerr). Sie sind also jedenfalls viel giftiger als die durch Autolyse und Extraktion gewonnenen der früheren Autoren. Die Toxizität der Kulturen ist eine höhere nach einem Wachstum von zwei bis drei Wochen. Doerr gibt als Indikator für die erfolgte Toxinbildung das Auftreten einer dicken grauweißen, später in Bröckeln zu Boden sinkenden Kahmhaut an. Kulturen ohne Kahmhautbildung sind wenig oder gar nicht toxisch.

Ebenso wie bei den Diphtheriebazillen gehen auch bei den Ruhrbazillen mit der Toxinbildung Reaktionsänderungen der Kulturflüssigkeit vor sich. Mit dem Anwachsen der Giftigkeit geht eine rasche Steigerung der Alkaleszenz einher. Hochtöxische Lösungen haben den Phenolphthaleinneutralpunkt manchmal überschritten oder sind nur wenig von ihm entfernt. Nach Doerr sollen zwar auch in sauren und neutralen Nährsubstraten Toxine gebildet werden, die jedoch durch Säurewirkung in ungiftige Derivate übergeführt werden. Dieser Autor fand nämlich, daß Säuren bereits in schwachen Konzentrationen mit Dysenterie- und

Diphtheriegift atoxische, durch Überneutralisieren wieder regenerierbare Modifikationen liefern.

Neben diesen Bouillonfiltratgiften besteht noch eine einfache Methode der Giftgewinnung, auf welche bereits Kraus hindeutete, in der Aufschwemmung von Agarkulturen in Kochsalzlösung und bakterienfreier Filtration der Flüssigkeit durch Reichelkerzen. Ein längeres Autolysieren oder ein vorheriges Abtöten der Bazillen ist unnötig. Zwanzigstündige Kulturen auf Petrischalen werden mit 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Nach einer einstündigen Berührung bei Zimmertemperatur erhält man leicht gelbliche klare Filtrate mit einer tödlichen Dosis von 0,3 bis 0,5 ccm. Kraus und Doerr stellen diese Waschwassergifte dar durch Schütteln der Bakterienrasen in physiologischer Kochsalzlösung während 24 bis 28 Stunden. Kollé und seine Mitarbeiter extrahieren nur 15 Minuten und filtrieren den Extrakt durch Reichelkerzen. Die Waschwassergifte sind identisch mit den Bouillongiften. Die auf die Weise gewonnenen Filtrate reagieren auf Lackmus auch dann stark alkalisch, wenn zur Kultur der gewöhnliche neutrale oder schwach alkalische Agar benutzt wird.

Auf eiweißfreien Nährmedien erhält man weder ein gelöstes Toxin noch sind die Bazillen selbst giftig. Es scheint also das Vorhandensein von Eiweiß für die Bildung des Giftes unbedingt vonnöten zu sein.

Von Bouillonkulturen, die unter anaëroben Bedingungen gehalten werden, bekommt man atoxische oder wenigstens schwach wirksame Filtrate (Rosenthal, Doerr).

Das Dysenterietoxin kann durch Fällung konzentriert werden. Durch Sättigen der Giftlösungen mit Ammonsulfat erhält man bräunliche Ausscheidungen auf der Oberfläche der Flüssigkeiten. Das gefällte Toxin wird auf Tonplatten von der überschüssigen Salzlösung befreit und in destilliertem Wasser gelöst. Nach mehrtägiger Dialyse gegen strömendes Wasser wird die Giftlösung im Vakuum bei 37° getrocknet und der trockene Rückstand gepulvert. Es resultiert ein bräunliches leichtes Pulver. 1 bis 2 mg davon stellen die tödliche Dosis für ein Kilo-Kaninchen dar (Todd, Doerr).

Eine andere Konzentrationsmethode ist die Fällung mit der fünf- bis sechsfachen Menge absoluten Alkohols. Der abfiltrierte Niederschlag wird getrocknet und pulverisiert. Dieses Trocken-

toxin ist heller, von grauweißer Farbe und von ähnlicher Wirksamkeit, wie das durch Aussalzen gewonnene (Doerr, Rosenthal).

Die Konservierung des Ruhrgiftes bietet keine besonderen Schwierigkeiten. Die keimfreien Giftlösungen (Bouillonkulturfiltrate oder Agarkochsalzextrakte) können monatelang unter Toluol oder mit Zusatz eines Antiseptikums (0,5 Proz. Carbol-säure) aufbewahrt werden, ohne daß eine deutliche Abschwächung eintritt. Erst nach $\frac{3}{4}$ bis 1 Jahr wird die Giftigkeit etwa um die Hälfte herabgesetzt. Die Resistenz gegenüber der Belichtung ist eine bedeutende. Eine etwa achtstündige Einwirkung direkten Sonnenlichtes schadet dem Gifte nicht (Kraus, Doerr, Todd).

Eigenschaften.

Nachdem bereits von zahlreichen Autoren die besondere Widerstandsfähigkeit des Ruhrtoxins gegen höhere Wärmegrade beobachtet worden war, hat namentlich Doerr die Wirkung höherer Temperaturen auf die Dysenteriegiftlösungen untersucht. Eine Temperatur von 90 bis 100° vernichtet in einer Minute das Gift vollständig. Eine Temperatur von 80° hat erst nach drei Minuten denselben Effekt. Erwärmungen auf 70° während $\frac{1}{4}$ Stunde verändern das Gift nicht, nach $\frac{1}{2}$, noch deutlicher nach einer ganzen Stunde wird es abgeschwächt. Wärmegrade von 60° bedingen erst nach einer bis zwei Stunden eine Abschwächung.

Eigentümlich ist das Verhalten des Giftes gegen Säuren. Nach Rosenthal wird das Toxin durch schwache Säuren nicht beeinflusst, dagegen soll es durch starke Lösungen (4proz.) von Salzsäure vernichtet werden. Dagegen machte Doerr die Beobachtung, daß Mineralsäuren (1 bis 2proz. Salzsäure, 1proz. Schwefelsäure, 1proz. Salpetersäure), nicht aber Essigsäure (4proz.) das Toxin überhaupt nicht zerstören, sondern in eine ungiftige Modifikation umwandeln. Durch Neutralisierung der Säure kann das Gift reaktiviert werden. Dieser Befund Doerr's über die Reversibilität der Modifikation des Giftes durch Säuren konnte neuerdings von Kirschbaum¹⁾ bei Versuchen, das Gift zu trennen, aufgeklärt werden. Er fand, daß das Bouillongift durch $4\frac{1}{2}$ Eisessigkolloidumfilter bei 6 Atm. Druck völlig zurückgehalten wird. Es ist löslich in verdünnten Alkalien und unlöslich in verdünnten

¹⁾ Wiener klin. Wochenschrift 1914, Nr. 12.

Säuren. Fränkel¹⁾ nennt den durch Säuren bedingten Zustand des Giftes „Atoxin“ im Gegensatz zum „Toxoid“ (siehe unter Theoretisches), welches irreversibel ist, während die Anwesenheit des Metallions (Alkaliions) das „Atoxin“ wieder zum Toxin macht. Fränkel will mit der Ultrafiltration alle Gifte zu trennen suchen.

Das Dysenterietoxin zeigt ferner eine hohe Resistenz gegen die tryptische Verdauung. Selbst nach siebenstündiger Einwirkung eines sehr wirksamen Trypsinpräparates war nach Doerr eine schwache Gifflösung nicht alteriert. Erst nach Tagen macht sich eine Abschwächung bemerkbar (Flexner und Sweet). Dieselben Autoren fanden auch die Enterokinase ohne Einfluß. Dasselbe Verhalten fand Doerr gegenüber der Galle.

Die Giftbemessung wird am besten im Kaninchenversuch vorgenommen. Das Kaninchen ist das empfänglichste Tier. Zur genauen Dosierung verwendet man zweckmäßig die intravenöse Einspritzung an gleich schweren Tieren (1 kg Körpergewicht). Je nach der Höhe der einverleibten Giftmenge wird das Inkubationsstadium und die Krankheitsdauer verändert. Bei intravenöser Impfung hoher Dosen erfolgt der Tod der Kaninchen bereits in sechs bis sieben Stunden. Die Einspritzung von einfach tödlichen Mengen bedingt ein eigentümliches Krankheitsbild. Nach einer Latenzperiode von zehn bis zwölf Stunden treten meist Paresen der Hinterbeine, seltener der vorderen Extremitäten auf, die bald in Paralysen übergehen. Außerdem besteht in etwa einem Drittel der Fälle einfache oder blutige Diarrhöe. Der Exitus der Tiere tritt unter Zunahme der Lähmung (Harnträufeln, Sphinkterlähmung) und sinkender Temperatur unter die Norm nach 24 bis 28 Stunden ein, oft auch erst am dritten bis vierten Tage.

Wirksam ist auch die subkutane und intraperitoneale Impfung des Giftes, doch benötigt man größerer Giftmengen. Auch ist die Inkubation verlängert und beträgt gewöhnlich zwei bis drei Tage.

Bei Einverleibung des Giftes per os oder direkt in eine Darmschlinge ist das Dysenteriegift ohne jegliche Wirkung (Kraus und Doerr, Flexner und Sweet, Doerr).

Ziemlich empfindlich sind auch Affen (*Macacus rhesus*) auf die intravenöse Giftinjektion. Nach Einspritzung von 1,0 ccm der gewöhnlichen Gifflösungen gehen diese Tiere stets nach einem bis

¹⁾ Wiener klin. Wochenschrift 1914, Nr. 12.

zwei Tagen zugrunde. Auch Katzen und Hunde können durch das Ruhrgift, letztere allerdings erst durch große Dosen (5 bis 10 ccm intravenös) getötet werden. Die Symptome, welche das Gift bei diesen Tieren sowie den Affen hervorruft, bestehen in blutigen oder schleimigblutigen Durchfällen, Lähmungserscheinungen fehlen.

Nach Kraus und Doerr sind Hühner und Tauben und vor allem Meerschweinchen (im Gegensatz zu anderen Autoren) völlig unempfindlich.

Literatur: Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906. Conradi, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Doerr, Zentralbl. f. Bakt. 1903. Derselbe, Wiener klin. Wochenschrift 1906 und 1907. Derselbe, Das Dysenterietoxin, Jena 1907. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908 u. 1911. Dopter, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905 u. 1909. Flexner und Sweet, Journ. of experim. med. 1906. Heller, Zentralbl. f. Bakt. Ref. 42. Kolle und Hetsch, Experim. Bakteriologie, Berlin 1906. Klein, Zentralbl. f. Bakt. 44. Kolle, Heller und de Mestral, Arbeiten aus d. Inst. zur Erf. der Infektionskrankh., Bern 1908. Kraus, Monatschr. f. Gesundheitspflege 1904. Kraus und Doerr, Wiener klin. Wochenschrift 1905. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. 1906. Kruse, Deutsche med. Wochenschr. 1900, 1901 u. 1907. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 42. Lentz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1903. Lüdke, Zentralbl. f. Bakt. 1905 u. 1906. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1906. Madsen, Ztschr. f. Hyg. 1894. Morgenroth, Festschr. z. Einw. d. path. Inst. Berlin 1906. Morgenroth und Pane, Biochemische Ztschr. 1906. Mayerhofer und Pribram, Ztschr. f. Immunitätsf. 1; dieselben, Ztschr. f. experim. Therapie 1909. Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Ruffer und Willmore, Brit. med. Journ. 1908. Schottelius, Med. Klinik 1911. Selter, Ztschr. f. Immunitätsf. 5. Todd, Journ. of Hyg. 1904. Vaillard und Dopter, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903.

b) Das Dysenterieantitoxin (Antiendotoxin).

Zur Gewinnung des Serums für die Praxis eignen sich von großen Tieren Pferd und Esel, weniger Ziegen.

Das Ruhrserum wird dargestellt durch Immunisierung der serumliefernden Tiere mit Toxin, lebenden Bouillonkulturen, Agarkulturen und Agarbazillenextrakten. Die Einverleibungsart des Materials ist die subkutane und intravenöse. Gabritschewsky immunisierte die Pferde in der Weise, daß er ihnen abwechselnd das Rosenthalsche Toxin und lebende Bouillonkultur subkutan injizierte. Er behandelte die Tiere in Intervallen von drei bis sechs Tagen. Ein Pferd vertrug die Kulturinjektionen schlechter

als die mit Toxin. Er begann mit kleinen Mengen Toxin, um sodann allmählich mit der Dosis zu steigen. Nach einer Anzahl Injektionen mit Toxin fängt die Behandlung mit lebender Bouillonkultur an, die in gleicher Weise vor sich geht, um dann wieder durch eine Reihe Toxineinspritzungen abgelöst zu werden.

Beispiel einer Immunisierung nach Gabritschewsky:

16. Febr. bis 27. März: 14 subkutane Toxininjektionen in Gaben von 0,5 ccm, steigend bis 5,0 ccm.
30. März bis 31. April: 5 subkutane Einspritzungen lebender Bouillonkultur in Dosen von 0,5 ccm, steigend bis 5,0 ccm.
26. April bis 22. Mai: 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 ccm Toxin, danach 5,5 bis 10,0 ccm lebende Bouillonkultur.
29. Mai: Aderlaß.
2. Juni: " "
6. " " "
28. Juni bis 1. August: 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 30,0 ccm Toxin, hierauf 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 ccm lebende Bouillonkultur.
23. August: Aderlaß.
11. Sept. bis 1. Nov.: Dieselben Dosen wie in der Vorperiode.

Später erzielte Gabritschewsky mit seiner Behandlungsmethode schon in drei bis vier Monaten therapeutisch wirksame Antidysenteriesera.

Todd immunisierte seine Tiere (Pferde und Ziegen) ausschließlich mit Toxinen. Eine Ziege lieferte ein deutlich antitoxisches Serum nach Behandlung mit Toxin in Mengen von 0,1 bis 200,0 ccm. Das am 33. Tage nach der letzten Injektion entnommene Serum war besser als das von einer Venaesektion am 13. Tage.

Nachdem Todd sich überzeugt hatte, daß die Hochtreibung der Immunität bei Pferden durch rasch aufeinanderfolgende Injektionen (er spritzte jeden dritten Tag) des Toxins unzweckmäßig sei, injizierte er später mit gutem Resultate in Zwischenräumen von mindestens einer Woche. Auch ging er mit der Anfangsdosis herunter auf 0,1 ccm derselben Giftlösung statt 0,5 ccm bei der schnelleren Behandlungsart. Er konnte so unter langsamer Steigerung der Dosis bis 400 ccm eines zehnfach stärkeren Giftes einverleiben. Die dosis letalis der zuletzt verwandten Giftlösung betrug 0,1 ccm für Kaninchen.

Ein drittes Pferd wurde vergleichsweise mit Agarkulturen ebenfalls subkutan behandelt. Zunächst erhielt es 20-stündige Schrägagarkulturen, die durch halbstündiges Erhitzen auf 70°

abgetötet waren, nachdem sie vorher mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt waren. Mit $\frac{1}{10}$ Kultur beginnend, stieg er allmählich auf 32 Kulturen, um dann zu lebenden Kulturen überzugehen. Die Einverleibung der lebenden Bazillenemulsionen geschah intravenös. Es wurden dem Pferde bis 10 lebende Kulturen als höchste Dosis gegeben.

Kraus und Doerr konnten von Ziegen, die mit lebender Kultur (24 stündige Agar- oder achttägige Bouillonkulturen) subkutan immunisiert wurden, kein besonders wirksames Serum erzeugen. Ein besseres Serum gewannen sie von Pferden; diese erhielten zum Teil achttägige Bouillonkultur oder Agarextrakte, teilweise reines Toxin subkutan. Kraus und Doerr geben der Behandlung mit reinem Toxin den Vorzug vor der mit lebenden Bouillonkulturen oder Agarbazillenkulturen. Zur Erzielung der Grundimmunität empfehlen sie, am Tage vor der Toxineinspritzung 50,0 bis 100,0 ccm antitoxisches Ruhrserum subkutan zu geben. Man kann dann mit der Injektion von 5,0 ccm eines mäßig starken Toxins (dosis letalis für Kaninchen 0,5 ccm) oder mit ebensolchen Mengen Bouillonkultur beginnen, ohne die Tiere besonders zu schädigen. Kraus und Doerr steigern die Injektionsmenge nie so hoch wie Todd, sondern bleiben nach Erreichung einer gewissen Immunität bei Dosen von 30 bis 80 ccm stehen. Sie vermeiden auf diese Weise unangenehme Reaktionen und erhalten ein ebensogutes Serum wie mit hohen Dosen. Die Pausen zwischen den einzelnen Injektionen betragen in der Regel eine Woche. Pferde, die in dieser Weise behandelt werden, können lange Zeit ein gutes antitoxisches Dysenterieserum liefern, doch muß der Antitoxingehalt nach jedem Aderlaß durch Fortsetzung der Immunisierung auf der Höhe gehalten werden. Die Weiterbehandlung kann drei bis fünf Tage nach der Blutentnahme wieder einsetzen. Am Tage vor der Toxinzufuhr injizieren Kraus und Doerr auch solchen Pferden 50,0 bis 100,0 Dysenterieserum subkutan.

Der Gang einer schonenden Immunisierung würde sich also ungefähr folgendermaßen gestalten: Am Tage vor der Injektion des Giftes spritzt man den Tieren 50 bis 100 ccm Antidysenterieserum subkutan. Die erste Giftdosis kann etwa 5,0 eines mäßig starken Toxins betragen. Nach Ablauf der Reaktion auf die Giftzufuhr gibt man wieder 50 bis 100 ccm Ruhrserum und steigert die Toxinmenge auf 10 ccm am Tage nach der Serumeinverleibung.

Diese Injektionsweise wiederholt man vier- bis fünfmal und läßt dann die Serumgaben fort. Im Verlauf der Immunisierung ist es zweckmäßig, unter gleichzeitiger allmählicher Steigerung der Dosis ein stärkeres Gift zu benutzen als bei Beginn der Behandlung. Es ist zur Schonung der Tiere unerlässlich, mit der neuen Toxininjektion so lange zu warten, bis das Tier sich wieder völlig von der vorhergehenden Gifteinverleibung erholt hat. Der Zwischenraum zwischen den einzelnen Dosen soll mindestens eine Woche betragen. Es ist dies deshalb durchaus nötig, weil sich alle Autoren darin einig sind, daß die Pferde gegen das Dysenterietoxin und noch mehr gegen Bouillonkulturen sehr empfindlich sind. Auch geht man aus diesem Grunde nicht über eine gewisse Giftmenge (30 bis 80 cem) hinaus, zumal durch Erhöhung der Dosis auf mehrere hundert Kubikzentimeter ein besseres Resultat nicht erzielt wird (Kraus und Doerr, Gabritschewsky). Wie bei der Gewinnung des Diphtherieserums fällt auch bei der Darstellung des Ruhrserums die individuelle Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, stark ins Gewicht. Man wird also nicht von allen Tieren ein gleich gutes Serum gewinnen können.

Bei der oben angegebenen schonenden Immunisierung sind die Reaktionen nicht besonders heftig. Außer Temperatursteigerung, Freßlust und Gewichtsabnahme tritt häufig an der Injektionsstelle ein mehr oder minder großes Infiltrat auf. Die intravenöse Behandlungsmethode bedingt stärkere Reaktionen, hohe Fiebererscheinungen, Freßlust, Gewichtsabnahme, große Schwäche und heftige Diarrhöen. Zu schnelle Aufeinanderfolge der Einspritzungen ruft außer den zuletzt genannten Symptomen Lähmungen der Nachhand hervor und führt zum Tode der Versuchstiere.

Der beste Zeitpunkt der Blutentnahme liegt in der Zeit zwischen zwei und vier Wochen.

Zur Wertbemessung des Ruhrserums eignen sich besonders Kaninchen und weiße Mäuse als Versuchstiere. Zur Titrierung des Antikörpergehalts werden lebende Kulturen und auf verschiedenste Weise hergestellte Dysenterietoxine benutzt. Dopter und Vaillard versuchten den Gehalt an wirksamen Immunkörpern dadurch zu bestimmen, daß sie 2000 g schweren Kaninchen Serum und lebende Kultur subkutan einverleibten. Moses wertet den Antitoxingehalt seiner Sera an Kaninchen gegenüber der vierfachen tödlichen Toxindosis (0,2 cem) aus. Er hatte Seren, die

noch in Mengen von 0,001 ccm die Giftmenge neutralisierten. Rein bazilläres Serum hatte nur geringe Schutzwirkung, ein Serum, das durch Immunisierung von Toxin und Bazillen gewonnen war, noch eine Wirkung in einer Dosis von 0,005 ccm. Schottelius bedient sich der Mischmethode und injiziert die in vitro hergestellten Serum-Toxingemische Kaninchen intravenös.

Shiga benutzt zur Wertprüfung seines multivalenten Serums weiße Mäuse und lebende Kultur. (Das multivalente Serum von Shiga wird durch kombinierte Immunisierung mit fünf Typen des Dysenteriebazillus dargestellt.) Fünf tödliche Dosen Ruhrbazillen werden mit abgestuften Mengen Serum gemischt und darauf Mäusen intraperitoneal einverleibt. Die letale Dosis beträgt pro Maus von 12 bis 14 g Gewicht etwa 0,08 mg virulenter Dysenteriekultur. Die Virulenz wird in der Weise erhalten, daß die frisch isolierte Stammkultur in den Eisschrank gestellt wird. Zum Gebrauch werden Agarröhrchen davon abgeimpft und 24 Stunden bebrütet. Mit geeichter Platinöse wird eine bestimmte Menge herausgenommen und in physiologischer Kochsalzlösung so verteilt, daß 1 ccm Kochsalzlösung 2 mg Kultur entspricht. Folgende Mengen Ruhrserum werden in Reagenzgläschen gefüllt: 0,5, 0,25, 0,1, 0,025, 0,01 und 0,005 ccm. Alle Dosen werden mit Kochsalzlösung auf 1 ccm ergänzt und nun wird je 1 ccm Bazillenaufschwemmung dazu gegeben. Von diesen Mischungen erhalten je zwei weiße Mäuse 0,4 ccm intraperitoneal. Nach 24 Stunden ist der Versuch beendet.

Kraus und Doerr bevorzugen als Versuchstiere Kaninchen und versuchten eine Bewertung eines Serums von drei Gesichtspunkten aus. Sie stellten fest:

1. das Neutralisationsvermögen in vitro, 15 Minuten Stehenlassen des Gemisches vor der Injektion;
2. die neutralisierende Fähigkeit im Tierkörper durch getrennte Einverleibung von Gift und Serum, gleichzeitig in rechte und linke Ohrvene;
3. den Heilwert, die Seruminjektion erfolgt nach der Giftzufuhr in verschiedenen Zeitintervallen.

Alle Injektionen erfolgten stets intravenös, da die Kaninchen so gleichmäßig reagieren. Auf Grund ihrer zahlreichen Versuche, die sie mit Seren anstellten, welche aus den verschiedenen Immunisierungsphasen stammten, fordern sie, daß jedes Serum, das

zu therapeutischen Zwecken Verwendung finden soll, auf seinen kurativen Wert geprüft werden muß. Sie fanden nämlich, daß das absolute Bindungsvermögen in vitro bei einem Dysenterieantitoxin völlig unabhängig sein kann von der Avidität des Immunkörpers, d. h. von seinem Neutralisationswert im Organismus. Während die absolute Menge der Antikörper oft schon beim ersten Aderlaß eine beträchtliche war, wuchs der kurative Wert des Serums erst bei fortschreitender Immunisierung. Ein Serum von erheblicher Heilwirkung konnte meist nach drei- bis viermonatiger unausgesetzter Behandlung erzeugt werden. Das einfache Bindungsvermögen in vitro darf also nicht, wie Rosenthal vorschlägt, die Grundlage der Wertbemessung für das Dysenterieserum sein. Im Wiener staatlichen serotherapeutischen Institut werden nur solche Ruhrsera als brauchbar angesehen, die in einer Dosis von 0,1 ccm Kaninchen von 1000 g gegen die gleichzeitige getrennte intravenöse Zufuhr der einfach tödlichen Dosis zu schützen vermögen.

Kolle, Heller und de Mestral erhielten mit der getrennten intravenösen Einspritzung von Serum und Toxin bei Kaninchen sehr unregelmäßige Resultate. Weit gleichmäßiger wurden die Ergebnisse, wenn sie ihre Seren mit der Ehrlichschen Mischmethode an weißen Mäusen titrierten. Sie fanden auch einen Heilwert des Serums, wenn dasselbe bis zu sechs Stunden nach der Giftinjektion in das Peritoneum gegeben wurde. Dieser kurative Wert war abhängig von der Menge der Antitoxine, wie sie im Giftserummischversuch festgestellt werden kann. Kolle, Heller und de Mestral empfehlen daher, für die praktische Bewertung des Dysenterieantitoxins nicht Kaninchen, sondern Mäuse zu verwenden. Die vierfache letale Dosis Gift (Bouillon-, Waschwasser-, Aggressintoxin) stellt die Prüfungsdosis dar. Die Giftmenge wird mit fallenden Mengen Serum im Reagenzglas gemischt und nach 10 Minuten (Zimmertemperatur) intraperitoneal injiziert:

2	Mäuse;	je	0,5	ccm	Toxin	+	je	0,05	ccm	Serum:	leben
2	"	"	"	"	"	+	"	0,01	"	"	"
2	"	"	"	"	"	+	"	0,005	"	"	"
2	"	"	"	"	"	+	"	0,003	"	"	"
2	"	"	"	"	"	+	"	0,001	"	"	"
2	"	"	"	"	"	+	"	0,0005	"	"	{ eine † 5, die andere lebt.

Kontrollen mit Toxin + Normalserum bzw. Toxin allein † 1 bis † 3 ¹⁾).

Außer den Antitoxinen sind im Dysenterieserum Agglutinine, Bakteriotropine, Oponine und komplementbindende Körper vorhanden. Mittels letzterer messen Kolle, Heller und de Mestral ihre supponierten antiinfektiösen Substanzen. Bakteriolytische Antikörper sind bis jetzt nur mit Sicherheit in vitro nachgewiesen worden (Shiga, Kruse, Rittershaus, Kemp und Metz).

Eigenschaften.

Das Dysenterieantitoxin ist wenig widerstandsfähig gegen höhere Temperaturen. Einstündige Erwärmung auf 70° macht es völlig unwirksam (Doerr). Nach den Beobachtungen von Kraus und Doerr verliert das Ruhrserum durch längere Aufbewahrung seine Wirksamkeit. Nach einem Jahre hatte das Serum eines Pferdes sein Neutralisationsvermögen in vitro eingebüßt. Die Dauer der unveränderten Haltbarkeit des Dysenterieantitoxins beträgt etwa sechs bis sieben Monate.

Literatur: Baecher und Laub, Ztschr. f. Immunitätsforsch. **4**. Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906. Calmette, ebenda 1895. Coyne und Auché, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **50**, **64**, **65**. Dieselben, Bull. de l'acad. de méd. 1907. Doerr, Zentralbl. f. Bakt. 1905. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1908, 1909, 1911. Dopter, Compt. rend. de la Soc. de Biol. **64**, **65**. Derselbe, Ann. de l'Inst. Pasteur 1909. Dopter und Repaci, Soc. Biol. 1910. Flexner und Sweet, Journ. of exper. med. 1906. Gabritschewsky, Zentralbl. f. Bakt. 1904. Irimescu, Revista sitintelor med. 1906. Karlinski, Wiener klin. Wochenschr. 1906. Kraus und Doerr, ebenda 1905, 1906, 1908. Dieselben, Deutsche med. Wochenschr. 1908. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. 1906. Kraus und Baecher, Journ. of State Med. **20** (1912). Kolle, Heller und de Mestral, Deutsche med. Wochenschr. 1908. Kruse, ebenda 1903, 1907. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. **42**. Lentz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1903. Lüdke, Zentralbl. f. Bakt. 1905, 1906. Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Pfeiffer und Ungermann, Zentralbl. f. Bakt. 1909. Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr. 1903, 1904. Schottelius, Med. Klinik 1911. Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1901, 1903. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. **23**, **41**. Todd, Brit. med. Journ. 1903. Derselbe, Journ. of Hyg. 1904. Vaillard und Dopter, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903, 1906. Wassermann, Ztschr. f. Hyg. 1896.

¹⁾ † 3 bedeutet: tot nach drei Tagen.

Schlangengiftserum.

a) Das Schlangengift.

Zoologisch unterscheidet man zwei große Familien von Giftschlangen, die Kolubriden und Viperiden. Zu ersteren gehört vor allen die Kobra in Indien und Indochina, zu letzteren unsere einheimische Viper, die fast über die ganze Alte Welt verbreitet ist, und die Klapperschlange in Nord- und Südamerika.

Die Gewinnung des Giftes kann aus den Drüsen der frisch getöteten Schlangen und vom lebenden Tier geschehen. Von den toten Schlangen wird nach Calmette das Gift in der Weise hergestellt, daß die herauspräparierte Drüse ausgepreßt wird. Dazu wird das Reptil mit dem Rücken auf einem Brett befestigt, der Unterkiefer mit einer Schere weggeschnitten und der Kopf in der Mittellinie mit Nadeln festgehalten. Nach Freilegung der Giftknoten werden die Ausführungsgänge der beiden Giftdrüsen freipräpariert und unterbunden. Darauf werden die Giftdrüsen aufgelöst und zwischen Drüse und Ligatur der Ausführungsgang durchgeschnitten, worauf die Drüse mit einer Polypenpinzette oder mit einer gefensternten Pinzette zusammengepreßt und der heraustretende Saft in einem Uhrglas aufgefangen wird.

Einfacher gestaltet sich das Verfahren, wenn man zwischen Ober- und Unterkiefer der Schlange ein Uhrglas einschiebt und mit dem Daumen und Zeigefinger der rechten Hand die Drüsen auf beiden Seiten des Oberkiefers derart komprimiert, daß das Gift durch die Giftzähne herausfließt. Jede Drüse liefert etwa 30 Tropfen und der Gehalt des Giftapparates, ein Sekret, wird von Calmette auf 3 g geschätzt.

Früher sammelte Calmette die Giftdrüsen, zerhackte sie fein oder zerrieb sie im Kristallmörser, mischte mit Glycerin und passierte durch ein Metalldrahtnetz. In anderer Weise gelingt die Giftgewinnung aus den Drüsen durch 18-stündiges Digerieren mit destilliertem Wasser im Eisschrank und nachheriges Trocknen der Flüssigkeit über Schwefelsäure oder nach Filtration durch Chamberlandkerzen oder nach Vermischen und Trocknen mit phosphorsaurem Kalk. Stark giftige Lösungen erhält man auch nach 18-stündiger Extraktion mit 10 proz. Kochsalzlösung, nachherigem Aussalzen mit gesättigter Lösung von Natrium sulfuricum und Dialyse.

Zur Erlangung des giftigen Drüsensekrets kann man nach Calmette in folgender Weise verfahren, daß man die Schlange mit einer langen Zange mit glatten Griffplatten, nach Art der geburtshilflichen Zangen, am Kopfe packt und aus dem Käfig herausholt. Hierauf wird die Schlange mit der linken Hand am Halse möglichst nahe am Kopfe festgehalten, mit der rechten Hand wird der Körper in die Höhe gehalten, damit er sich nicht gegen den Boden oder einen Gegenstand stemmen kann. Nun reizt man die Schlange zum Beißen, indem ein Assistent ein Uhrglas zwischen die Kiefer der Schlange schiebt. Durch den Biß ergießt sich das Gift auf die Uhrschale. Beim Zurückbringen der Schlange in den Käfig wird bei halbgeschlossener Tür zuerst der Schwanz, dann der Körper und zum Schlusse mit plötzlichem Ruck der Kopf hineingeschoben, während mit der freien Hand die Klappe geschlossen wird.

Um zu verhindern, daß beim Bisse das Gift mit dem Sekret der anderen Munddrüsen verunreinigt wird, ließ Martin die Schlangen in ein mit dünner Kautschukplatte bedecktes Uhrglas beißen. Statt des Uhrglases kann man auch einen Glastrichter verwenden, der mit einer Gummimembran überzogen ist. Dabei ist es jedoch möglich, daß die Schlange beim heftigen Beißen die Giftzähne abbricht. Ein Abbrechen der Zähne wird ausgeschlossen, wenn man die Schlange in einen Wattebausch oder in ein Schwämmchen beißen läßt. Durch nachheriges Auswaschen mit Wasser läßt sich dann das Gift gewinnen.

Das aufgefangene Gift wird zur Konservierung bei niederer Temperatur getrocknet, am besten in einem Vakuumexsikkator über Chlorcalcium oder über Schwefelsäure. Im Sommer oder in warmen Ländern kann das Gift in der Sonne oder im Luftzuge getrocknet werden (Calmette). Zu diesem Zwecke wird das Uhrglas mit dem giftigen Sekret an einen vor Staub geschützten sonnigen Ort gebracht. Der rasch eingetrocknete Trockenrückstand wird dann mit einem scharfen Spatel vom Uhrglas abgekratzt und in ein Fläschchen mit eingeschliffenem Glasstopfen gebracht. Das Gift ist im getrockneten Zustande als Scheibchen oder Lamellen vor Luft geschützt unbegrenzt haltbar. Wenn das Gift noch feucht ist, so zersetzt es sich rasch unter Entwicklung von Ammoniak und flüchtigen unangenehm riechenden Fäulnisprodukten. Gleichzeitig verliert es seine toxische Wirkung.

Faust hat in folgender Tabelle die Giftmengen zusammengestellt, die nach den Angaben von den verschiedenen Autoren von den einzelnen Schlangen gewonnen werden können.

Autor	Schlangenart	Menge des frisch entleerten flüssigen Giftes in mg	Trockenrückstand in mg
Mc. G. Smith	<i>Pseudectris porphyriacus</i> . . .	100—160	46—94
"	<i>Hoplocephalus curtus</i> . . .	65—150	17—55
Calmette	<i>Bothrops lanceolatus</i> (durch Ausdrücken beider Drüsen)	320	127
"	<i>Cerastes aegyptiacus</i>	85—123	19—27
"	<i>Crotalus durissus</i>	370	105
"	<i>Naja tripudians</i> , 2 m lang . .	135 im Mittel	30—45
"	<i>Naja tripudians</i> , welche seit 2 Monaten nicht gebissen hatte	220	—
"	Größe von diesem Autor in beiden nach dem Tode herauspräparierten Drüsen einer <i>Naja tripudians</i> gefundene Menge Giftsekret .	1136	480
Feoktistow	<i>Vipera ammodytes</i>	65	20
"	Kreuzotter	30	10
"	<i>Crotalus durissus</i>	300	90—100

Um die für die Herstellung des Heilserums nötigen größeren Giftmengen zu gewinnen, muß man die Giftschlangen möglichst lange am Leben erhalten. Diese müssen daher etwa alle 14 Tage mit einem größeren Stück Fleisch gefüttert werden, damit sie freiwillig keine Nahrung zu sich nehmen. Zweckmäßig erfolgt die Giftentnahme ungefähr alle 14 Tage. Sie darf jedoch nicht gleichzeitig mit der Fütterung stattfinden, weil das entnommene Gift der Verdauungssaft des Tieres ist, ohne welches die Nahrung nicht verdaut werden kann. Um ein gut wirksames giftiges Sekret zu erzielen, darf jedenfalls nur einmal wöchentlich zur Giftentnahme geschritten werden.

Das frische Sekret einer Giftdrüse stellt eine je nach der Schlangenart mehr oder minder gelblich oder grünlich gefärbte zähe Flüssigkeit dar, welche neutral oder schwach sauer reagiert und ein spez. Gew. von 1039 bis 1050 hat. Die saure Reaktion rührt von einer flüchtigen nicht näher bekannten Säure her,

welche beim Austrocknen vertrieben wird, so daß Lösungen vom getrockneten Schlangengift neutral reagieren. Der Geschmack, besonders des Kobragiftes, ist ein spezifisch bitterer. Das Gift löst sich gut im Wasser zu einer trüben stark schäumenden Flüssigkeit. Die Beimengungen des Schlangengiftes bestehen aus einem Gemisch von Eiweißkörpern (Globuline, Albumine, Albumosen, Peptone), Schleim, Epithelzellen, Fett und Salzen. Die Elementaranalyse nach Armstrong ergibt:

Kohlenstoff	43,04
Wasserstoff	7,00
Stickstoff	12,45
Schwefel	2,05
Asche	geringe Mengen

Calmette hat eine Reinigung des Schlangengiftes in folgender Weise vorgenommen. 1 g Trockentoxin wird in 100 ccm sterilem Wasser gelöst, durch steriles Papier filtriert, in Glaskölbchen gefüllt, welche versiegelt wurden, und 30 Minuten lang auf 75° im Wasserbade erhitzt. Nach 24 Stunden werden die Kolben wiederum 15 Minuten auf 80° erwärmt und durch Papierfiltration die gewonnenen Eiweißkörper entfernt. Das klare Filtrat dialysiert man 24 Stunden gegen destilliertes Wasser und trocknet es im Vakuum über Schwefelsäure ein. Die Lösung des Trockenrückstandes (42 mg) gibt Biuretreaktion, mit Millons Reagens einen leichten Niederschlag, aber keine Xanthoproteinreaktion. Hitzekoagulables Eiweiß enthält die Lösung nicht mehr. Die so gereinigte Giftlösung enthält nahezu quantitativ das Gift, unterscheidet sich aber insofern vom Ausgangsmaterial, als es schon bei 80° in seiner Wirksamkeit geschädigt wird.

In neuerer Zeit gelang Faust eine Reindarstellung des Neurotoxins der Kobra. Auch Faust verwendet die Hitzekoagulation, indem er die wässrige Lösung des Giftes mit Essigsäure schwach ansäuert und auf dem Wasserbade 15 Minuten auf 90 bis 95° erhitzt. Gleichzeitig wird Kochsalz bis zur Sättigung zugesetzt. Dabei scheidet sich das geronnene Eiweiß, welches die Hauptmenge der im inaktiven Gifte enthaltenen Proteinkörper ausmacht, in groben Flocken aus. Der Niederschlag, der wirkungslos ist, wird abfiltriert. Im Filtrat ist neben den Albumosen und Peptonen die gesamte wirksame Substanz enthalten. Dasselbe wird bis zur

völligen Chlorfreiheit dialysiert und entweder im Vakuum über Schwefelsäure oder durch vorsichtiges Eindampfen konzentriert. Durch Zugabe von 10proz. Lösung von Metaphosphorsäure bis zur schwach sauren Reaktion können die biuretartig reagierenden Stoffe ohne Schädigung der Giftwirkung ausgeschieden werden. Mittels Alkohol wird nun aus dem Filtrat die wirksame stickstofffreie Substanz gefällt. Der saponinähnliche Körper, den Faust auf diese Weise gewonnen hat und Ophiotoxin nannte, ist jedoch im nativen Gifte an Eiweiß oder eiweißartige Substanzen salz- oder esterartig gebunden. Durch die Art der Bindung ist er vor den in freiem oder gebundenem Zustande leicht eintretenden und sein Unwirksamwerden herbeiführenden Veränderungen im Molekül geschützt (Faust).

Zuerst zählte man das Schlangengift einfach zu den giftigen Eiweißkörpern (Lucien Bonaparte). Weir Mitchell und Reichert hielten das Gift der Viper oder Klapperschlange für Globuline, nach Wolfenden sind die verschiedensten Eiweißfraktionen Globulin, Albumin und Albumosen Träger der aktiven Substanz; Martin und Smith sprechen die Giftwirkung Proto- und Heteroalbumosen zu. Auch Kanthack hält die aktive Substanz des Kobragiftes für eine Protalbumose.

Eigenschaften.

Frisches Gift oder Giftlösung ist sehr empfindlich gegenüber dem Licht und dem Luftzutritt. Trockentoxin kann jedoch ohne Bedenken dem Tageslicht ausgesetzt werden. Durch Berkefeldfilter keimfrei gemachte Lösungen halten sich in zugeschmolzenen Röhren bei völligem Lichtabschluß im Eisschrank mehrere Monate lang. Ein vorzügliches Konservierungsmittel ist nach Calmette der Zusatz von reinem Glycerin zu gleichen Mengen einer konzentrierten Giftlösung. Der Einfluß der Temperatur auf die verschiedenen Giftarten ist sehr verschieden. Das Gift der Kolubridenarten kann kurze Zeit gekocht werden ohne Verlust seiner Giftwirkung. Durch längeres Kochen oder Erhitzen über 100° wird es allmählich abgeschwächt. Wärmegrade von 120° machen es in kürzester Zeit unwirksam. Dagegen wird das Gift der Viperiden bei Erwärmung auf etwa 70° stark abgeschwächt, zwischen 80 bis 85° völlig zerstört. Ein weiterer Unterschied in dem physikalischen Verhalten der beiden Giftarten besteht darin,

daß Kolubridengift Pflanzenmembranen und auch tierische Membranen langsam passiert, Viperngift ist dagegen überhaupt nicht dialysierbar. Durch Filtration durch Porzellankerzen verliert das Viperidengift fast die Hälfte seiner wirksamen Substanz, das Kolubridengift wird dagegen kaum abgeschwächt. Das Gift wird durch die verschiedensten Fällungsmittel mitgerissen, so mit den verschiedenen Neutralsalzen und Alkohol. Giftige Niederschläge werden ferner durch Metallsalze, so z. B. durch 5 proz. Kupfersulfatlösung u. a., hervorgerufen. Durch Sättigen mit Kochsalz soll das Gift nach Faust jedoch nicht ausgefällt werden, wahrscheinlich ist dies auch nicht der Fall durch Einleiten von Kohlendioxyd.

Elektrizität in Form des konstanten Stromes vernichtet das Gift, während Wechselströme von hoher Frequenz, wenn Temperatursteigerung vermieden wird, ihm nach Marmier nicht schaden.

Säuren und Alkalien bei gewöhnlicher Temperatur und mäßiger Konzentration schädigen das Gift bei nicht zu langer Einwirkungsdauer nicht. Faust hat sogar gefunden, daß schwache Säuren (Metaphosphorsäure) reine Giftlösungen vor weitgehender Zersetzung und Abnahme ihrer Toxizität schützen. Das Gift ist ferner widerstandsfähig gegen schwache Carbonsäure, 1 prom. Sublimatlösung, Jod, Jodkalium und ebenso gegen Platinchlorid. Dagegen wird das Gift zerstört von Bromwasser, 1 proz. Lösungen von Jodtrichlorid und Goldchlorid. Besonders verschiedene Oxydationsmittel wirken stark zerstörend auf das Schlangengift, z. B. Kaliumpermanganat in 1 proz. Lösung (Lacerda), 1 proz. Chromsäure (Kaufmann), Chlorkalk (Lenz) in Lösungen von 1:12 (Calmette). Brieger und Krause konnten jedoch durch Einspritzung der Lösungen von Kaliumpermanganat oder Chlorkalk Tiere gegen die Wirkung verschiedener Schlangengifte nicht schützen.

Interessant ist noch die Tatsache, daß die sonst so widerstandsfähigen Schlangengifte *in vitro* von einigen organischen Substanzen geschädigt werden. Vor allem ist hier die von Fraser gefundene Eigenschaft der Galle mancher giftiger Schlangen zu nennen, die schon in geringer Menge die Giftwirkung aufhebt. Ähnlich wirken auch Rindergalle und glykocholsaures Natron.

Bezüglich der Einwirkung proteolytischer Fermente auf das Schlangengift gehen die Angaben der verschiedenen Autoren aus-

einander. Trypsin und ein Pepsinsalzsäuregemisch scheinen die Wirksamkeit des Giftes zu vernichten (Martin, Calmette, Ishizaka, Morgenroth, Carpi, Flexner und Noguchi).

Empfänglich für die Schlangengifte sind ziemlich alle anderen Tierarten, nur die Giftschlangen verhalten sich ihrem eigenen Gifte gegenüber refraktär. Unter Zugrundelegen von getrocknetem Toxin, das in immer gleichen Mengen Flüssigkeit gelöst zur Injektion gelangt, kann die dosis letalis minima für die verschiedenen Tierarten pro Kilogramm Körpergewicht genau berechnet werden. Am unempfindlichsten unter den Säugetieren ist das Schwein, weiter ist das Pferd resistenter als der Esel, Affen empfindlicher als der Hund. In folgenden Tabellen soll die von Calmette angegebene verschiedene Empfindlichkeit der verschiedenen Tierarten für das Kobragift sowie die tödliche Minimaldosis verschiedener Schlangengifte für Kaninchen und Meerschweinchen angegeben werden.

Die mittlere letale Dosis für Kobragift.

Maus	0,00005 g
Ratte	0,0001 g
Meerschweinchen	0,0002 g
Kaninchen (pro 1000 g Körpergewicht) . . .	0,0005 g
Hund	0,0008 g

Vom Viperngift (Kreuzotter) benötigt man ungefähr die sechsfache Menge.

Die tödliche Minimaldosis verschiedener Schlangengifte für Kaninchen und Meerschweinchen.

Schlangenart	Letale Dosis in 3 bis 4 Stunden wirksam für Kaninchen von 1,600 bis 2,000 kg	Letale Dosis in 2 bis 3 Stunden wirksam für Meerschweinchen von 450 bis 500 g
<i>Naja tripudians</i>	0,3—0,6 mg	0,05 mg
<i>Naja traje</i>	0,3—0,7 "	0,07 "
<i>Cerastes</i>	1,5—2,0 "	0,1 "
<i>Crotalus</i>	3,5 mg	0,3 "
<i>Trigonocephalus</i>	2,5 "	0,2 "
<i>Hoplocephalus variegatus</i>	2,5 "	—
<i>Acanthopis antarctica</i>	1,0 "	0,8 "

Innerlich verabreicht vertragen jedoch ausgewachsene Säugtiere große Mengen Gift, ohne Schaden zu nehmen (Wehrmann, Carrière). Junge, noch säugende Individuen sind nach den Untersuchungen von Calmette auch auf dem Wege des Intestinaltrakts für das Schlangengift empfänglich.

Entsprechend seinen giftigen Komponenten wirkt das Schlangengift in verschiedener Weise auf den Organismus. Das Neurotoxin wirkt auf die Nervenzellen, das Hämorrhagin auf die Gefäßendothelien und das Hämolysin auf die roten Blutkörperchen; das proteolytische Ferment greift die Muskelfasern und das Fibrin an und die Wirkung des Fibrinferments wird durch eine Art Thrombose behindert.

b) Das Schlangengiftantitoxin.

Die Immunisierung von Pferden mit Schlangengift ist eine sehr langwierige. Calmette, der im Institut Pasteur zu Lille zwecks Verwendung in der Praxis Kobragiftserum herstellt, beginnt die Behandlung der Pferde mit abgeschwächtem Gifte. Er setzt zu dem Gifte gleiche Mengen einer 1 proz. Chlorgold- oder Calciumhypochloricumlösung zu. Im Anfange der Behandlung erhalten die Tiere ganz kleine Mengen dieses modifizierten Giftes. Unter genauer Beobachtung der Gewichtskurve wird dann allmählich mit der Dosis gestiegen, bis man nach vier Injektionen mit dem abgeschwächten Toxin zu reinem Gifte übergeht. Die Einspritzungen werden in der Regel in Abständen von 3 bis 4 Tagen vorgenommen. Es darf jedoch erst dann zu einer neuen Injektion geschritten werden, wenn die Pferde ihr ursprüngliches Gewicht wiedergewonnen haben. Sobald Abmagerung eintritt, wird die Immunisierung so lange ausgesetzt, bis das normale Gewicht wieder erreicht ist. Sind die vier Injektionen mit dem abgeschwächten Gifte gut vertragen worden, so injiziert Calmette die Hälfte der dosis letalis (die tödliche Dosis für ein Pferd beträgt etwa 0,01 g trockenes Kobragift). Nach 3 bis 4 Tagen gibt er $\frac{3}{4}$ derselben tödlichen Menge subkutan und nach weiteren 3 bis 4 Tagen die ganze tödliche Dosis. Von da ab kann schneller mit den Giftdosen gestiegen werden, um die Antitoxine im Blute anzureichern. Es gelingt in dieser Weise, Pferde so stark zu immunisieren, daß sie im Verlaufe der Behandlung im Mittel die 200-fache tödliche Dosis als Einzelgabe subkutan gut vertragen. Die Behandlungs-

dauer beträgt gewöhnlich 16 Monate bis zur Erreichung eines genügend hochwertigen Serums.

Die Pferde vertragen nicht gleichmäßig gut die Injektion des Giftes. Bei vielen entstehen im Anschluß an jede Injektion große septische Abszesse, die entleert und drainiert werden müssen, andere gehen während der Immunisierung an Endokarditis oder akuter Nephritis ein.

Ist die Injektion von 2 g trockenem Kobragift (etwa 200-fache tödliche Dosis) bei einem Pferde ziemlich reaktionslos verlaufen, so ist der Zeitpunkt für die Blutentnahme gekommen, die nach Calmette am besten dreimal in Abständen von fünf Tagen nach folgendem Plane vorgenommen wird:

1. Zwölf Tage nach der letzten Injektion erster Aderlaß von etwa 8 Liter Blut,
2. fünf Tage nachher Entnahme von 6 Liter und
3. fünf weitere Tage später dritter Aderlaß von wieder 6 Litern Blut.

Es werden also im ganzen innerhalb zehn Tagen 20 Liter Blut von einem Pferde im Volleffekt seiner Immunität gewonnen.

Um den Antitoxingehalt des Blutes auf derselben Höhe zu erhalten, bekommt das Pferd gegen Ende des ersten Monats nach der Blutentnahme wieder eine subkutane Einspritzung von 2 g Trockengift. Etwa sechs Wochen darauf wird dieselbe Dosis wiederholt, so daß nach einer dreimonatlichen Ruhe des Serumtieres aufs neue ein Aderlaß gemacht werden kann. Während dieser Ruhezeit muß das Tier besonders gut gefüttert werden.

Um zu einem polyvalenten Serum zu gelangen, könnte man nach Calmette in der Weise vorgehen, daß man die Pferde zunächst mit Kobragift immunisiert und dasselbe Tier in gleicher Weise dann mit verschiedenen Giften amerikanischer oder australischer Schlangen behandelt.

Die einfachste Wertbemessung des Schlangengiftantitoxins geschieht am Kaninchen (Calmette). Das Versuchstier erhält 2 ccm Serum intravenös und zwei Stunden später 1 mg Gift intravenös. Diese Giftdosis tötet Kontrolltiere bei intravenöser Applikation in weniger als 30 Minuten, subkutan beigebracht in zwei bis drei Stunden. Ein Serum ist vollwertig, wenn eine Mischung von 2,5 ccm Serum mit 1 mg Kobragift beim Kaninchen keine Ver-

giftungserscheinungen macht, oder wenn die subkutane Injektion von 2 ccm Serum ein Kaninchen von etwa 2 kg vor der Wirkung einer zwei Stunden später applizierten subkutanen Einspritzung von 1 mg Toxin schützt. Eine Antitoxineinheit (A.-E.) ist diejenige Menge, welche 1 g Kaninchen gegen den Tod schützt. Schützt also z. B. 1 ccm Serum ein Kaninchen von 1000 g, so ist das Serum 1000-fach. — Auch an weißen Mäusen kann das Serum ausgetitriert werden, indem man den Mäusen $\frac{1}{10}$ mg Gift (in 1 prom. Lösung) in vitro mit steigenden Mengen Serum gemischt injiziert, um die Dosis festzustellen, die eine Maus nicht mehr tötet. Die Serummenge darf nicht mehr als 0,03 g betragen, sonst ist das Serum nicht therapeutisch verwendbar. Werden Meerschweine zur Titration benutzt, so darf die Serummenge zum Neutralisieren von 5 mg Gift 1,2 ccm nicht übersteigen.

Es ist von Wichtigkeit, daß zu den Prüfungen nur frisch bereitete Giftlösungen benutzt werden. Calmette wendet bei der Herstellung der Giftlösungen folgende Technik an: 0,1 g Trockengift, exakt gewogen, wird in 10 ccm 0,8 proz. Kochsalzlösung gelöst und nach völliger Lösung $\frac{3}{4}$ Stunden im Wasserbade auf 72° erwärmt. Die atoxischen Albumine fallen aus und werden mittels steriler Filter abfiltriert. Das sterile Filtrat wird in Glasampullen gebracht, zugeschmolzen und kühl und dunkel aufbewahrt.

Fraser wendet nur die Mischungsmethode zur Wertigkeitsmessung seines von Pferden gewonnenen Serums an. Die Mischungen müssen zur besseren Bindung des Toxins mit dem Antitoxin vor der Einspritzung stehen bleiben. Als Reaktionstier verwendet er Kaninchen. Als Testgift Dosen dienen die 1-, 1 $\frac{1}{2}$ -, 2-, 3-, 4-, 5-, 8- und 10-fach sicher tödlichen Dosen, die mit abgestuften Serum mengen gemischt werden. Es läßt sich aus dem Ausfall der Versuche leicht ersehen, welche Serumdosis nötig ist, um ein Kaninchen von 1000 g gegen die 1- bis 10-fache dosis letalis zu schützen.

Myers eicht das Serum im Mäuseversuch. Als Testgiftdose wählt man die 10-fach tödliche Menge. Eine Immunitätseinheit stellt die Menge vor, welche genügt, um die Testgiftmenge für eine Maus von 15 g abzusättigen.

Das Schlangengiftserum bewahrt ungefähr zwei Jahre lang seinen Antitoxingehalt in jedem Klima unverändert.

Literatur: Armstrong, Snake Commission Report. 1874. Bailey, Med. Record. 1900. Calmette, Handb. d. Technik usw. von Kraus

u. Levaditi, 1908 u. 1909. Derselbe, Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann 1913. Carrière, Ann. de l'Inst. Pasteur 1894. Fraser, Brit. med. Journ. 1895 u. 1897. Flexner und Noguchi, Const. of snake venom and snake seren. Univ. Pensylv. 1902. Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1902, 1903 u. 1904. Vaillant, Thèse de Bordeaux 1902. Wehrmann, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897 u. 1898.

Tetanusserum.

a) Das Tetanustoxin.

Die beste Darstellung des Tetanusgiftes geschieht durch Züchtung der Starrkrampfbazillen in Bouillon unter streng anaëroben Bedingungen.

Als Nährboden wählt man am besten eine frisch bereitete neutrale oder schwach alkalische Rindsbouillon (10 bis 15 ccm Normallauge pro Liter), die 1 Proz. Pepton Witte und 0,5 Proz. Kochsalz enthält (Kitasato). In älterer Bouillon erfolgt das Wachstum langsamer und die Giftigkeit ist eine geringere. Das Fleischwasser wird in der Weise hergestellt, daß man das zerkleinerte Fleisch mit der zweifachen Gewichtsmenge Wasser eine Stunde kocht und filtriert. Das Fleisch wird noch gut ausgepreßt und der Saft dem Filtrat zugesetzt. Zusätze von Glycerin und Traubenzucker vermeidet man am besten, da sie zwar das Wachstum der Tetanusbazillen befördern, aber wohl infolge der eintretenden Säureproduktion das Toxin schädigen. Doch haben v. Eisler und Pribram in 2proz. Traubenzuckerbouillon recht gute Gifte erhalten. Ein Zusatz von Maltose wirkt ebenso wie der von Glucose. Außer einem Zusatz von ameisensaurem Natrium und indigschwefelsaurem Natrium wird von Kitasato noch ein Zusatz von 5 ccm Lackmustinktur auf 100 ccm Bouillon empfohlen. Mit gelatinehaltigen Nährböden will Tizzoni gute Resultate erzielt haben. Desgleichen Roux und Yersin mit einer Bouillon, die Milchsäure im Verhältnis 1:1000 enthielt.

Nach Brieger ist ein höherer Gehalt des Nährmediums an Chloriden, bis zu 2 Proz., günstig für die Giftbildung, doch dürfen die Kulturen nur wenige Tage bei 37° gehalten werden, da bei höherem Kochsalzgehalt als 0,5 Proz. schon die Bruttemperatur schädigend auf das Toxin einwirkt (Knorr).

Brieger und Cohn fanden, daß die Toxizität der Tetanusbouillon erhöht werden kann durch Zufügen alter, stark ein-

gedampfter, mit Alkohol gefällter und im Vakuum scharf getrockneter Typhuskultur oder dadurch, daß man fauliges Fleisch mit salzsäurehaltigem Wasser auslaugt, mit Alkohol fällt und den getrockneten Niederschlag zur Bouillon zugibt. Außerdem kann man eine mindestens 14 Tage alte Typhusbouillonkultur mit gutem Resultate beimpfen, wenn man diese vor Anlegung der Tetanuskultur, am besten mit Milchsäure, wegen der gebildeten Basen neutralisiert.

Auf eiweißhaltigem Nährboden werden Basen gebildet, die die Giftbildung ungünstig beeinflussen. Zur Neutralisation von 1 Liter Tetanusbouillon nach siebentägigem Wachstum benötigt man 17 bis 38 ccm Normalsäure. Durch Zusatz von 20 g Gips pro Liter Bouillon erzielt man höchst giftige Kulturen, weil das sich bildende schädliche Ammoniumcarbonat in das unschädliche Ammonsulfat übergeführt wird.

Zusätze von Mehl, Dextrin und Lac sulfuris setzen die Giftigkeit der Kultur herab. Außer H_2S bildet der Starrkrampferreger noch flüchtige organische Schwefelverbindungen, besonders Methylmercaptan, welche den schädigenden Einfluß ausüben.

Eine starke Steigerung der Giftbildung erhielten Vaillard und Vincent nach folgender Methode. Sie impften das Filtrat einer 20-tägigen Tetanuskultur in Rinderbouillon, von dem $\frac{1}{50}$ ccm ein Meerschweinchen tötete, mit frischem Tetanus. Nach 18 Tagen tötete das Filtrat dieser neuen Kultur Meerschweinchen noch in Dosen von $\frac{1}{500}$ ccm. Der Nährboden war aber aufgebraucht. Nur durch Hinzufügen von frischer Bouillon, 20 ccm auf 350 ccm Filtrat, erhielten sie noch genügendes Wachstum und sehr stark wirksames Filtrat. Es genügte $\frac{1}{1000}$ ccm dieses Filtrates zur Tötung eines Meerschweinchens.

Dieselben Autoren erzielten in frischem Blut oder Serum ein schlechtes Wachstum, aber gute Giftbildung. Es besteht überhaupt kein direkter Zusammenhang zwischen Üppigkeit des Wachstums und Stärke der Toxinbildung.

Um das Toxin reiner zu gewinnen, hat man auch versucht, die Tetanusbazillen auf eiweißfreien Nährsubstraten zu züchten. Uschinsky (Zusammensetzung seines Nährbodens siehe unter Diphtherietoxin) hat auf seinem besonderen Nährboden bei Zusatz von 1 bis 2 Proz. Traubenzucker und Übersichtung mit Paraffinum liquid. ein gutes Wachstum erzielt. Derartige drei bis vier Wochen

alte Kulturen waren ebenso giftig wie gleichaltrige Bouillonkulturen. Dagegen ist Brieger der Meinung, daß die Tetanusbazillen auf eiweißfreien Nährmedien schlecht gedeihen, vielmehr zu ihrem Wachstum Eiweißkörper oder zum mindesten hoch komplizierte Abkömmlinge derselben nötig sind.

Die unter völligem Luftabschluß unter Wasserstoffatmosphäre bei 36° gehaltenen Kulturen in Rinderbouillon zeigen nach Vaillard und Vincent schon nach 24 Stunden eine deutliche Trübung, die bis zum 15. Tage immer mehr zunimmt und weiter zur Bildung eines Bodensatzes führt. Bei Öffnung eines Kolbens macht sich ein unangenehmer charakteristischer Geruch nach Fettsäuren bemerkbar. Die Kultur läßt beim Schütteln Gasblasen aufsteigen. Nach zehn Tagen sind nur noch sporentragende Bazillen in der Kultur.

Wenn die Rinderbouillon frisch ist, wächst der Tetanusbazillus ziemlich rasch. Das Maximum der Giftbildung liegt dann zwischen dem 10. und 15. Tage bei Züchtung bei Körperwärme. Von diesem Höhepunkte ab tritt ein kontinuierliches Absinken der Wirksamkeit ein. Werden die Kulturen bei einer Temperatur von 20 bis 25° gehalten, so werden sie erst zwischen der zweiten und dritten Woche giftig. Unter 14° findet kein Wachstum mehr statt.

In älterer Bouillon ist das Wachstum langsamer und demgemäß eine gute Toxinproduktion erst nach etwa drei Wochen vorhanden. Das Gift hält sich aber in diesen Kulturen mehrere Monate ziemlich unverändert.

Die Herkunft eines Tetanusstammes scheint bezüglich der Giftbildung weniger von Bedeutung zu sein als die Züchtungsbedingungen. Die einzelnen Stämme weisen jedenfalls nicht auffällige Unterschiede in der Toxinproduktion auf, wie es bei den Diphtheriebazillen der Fall ist. Bei geeigneter Züchtung erhält man mit den verschiedenen Stämmen wirksame Gifte.

Die üblichste Gewinnungsmethode von Tetanustoxin ist die Züchtung in Bouillon unter anaëroben Bedingungen. Dies wird erreicht durch eine Reihe von Verfahren, welche die Luft bzw. den Sauerstoff der Luft von der Nährlösung fernhalten. Die Tetanusbazillen können aber auch gedeihen bei Luftzutritt, doch sind die so gewonnenen Gifte minderwertig, was wohl seinen Grund in der giftzerstörenden Wirkung des Sauerstoffs hat. Debrand hat jedoch eine Art der Züchtung gefunden, bei der es gelang, ohne

Anaerobiose gute Toxine zu erhalten. Er erreichte dies bei Züchtung des Starrkrampferregers in Mischkultur mit anderen Bakterien, namentlich mit *Bacillus subtilis* und *Bacillus mesentericus*.

Mehrtägige, am besten sechs Tage alte Bouillonkulturen von *Bacillus subtilis* und Tetanusbazillen werden zur Abtötung der vegetativen Formen zwei Minuten gekocht und durch Schütteln die Sporen gut verteilt. Diese Bouillon wird in zugeschmolzenen Röhrchen vor Licht geschützt bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt. Zur Toxingewinnung beimpft man die Kolben in der Weise, daß pro Liter Bouillon 1 ccm der eben beschriebenen Sporenröhrchen zugesetzt wird. Am besten benutzt man Gefäße mit weitem Halse, um der Luft ungehinderten Zutritt zu verschaffen. Zunächst wächst der *Bacillus subtilis*, und nach 24 Stunden beginnt die Entwicklung der Tetanusbazillen. In den folgenden Tagen wird die Bouillon gelblich und dicker als bei einer gewöhnlichen anaeroben Tetanuskultur. Die Kulturen gedeihen am besten bei 36°. Nach Metschnikoff schwächt der lebende *Bacillus subtilis* das Tetanusgift ab, man muß daher die Kulturen nach Erreichung des Höhepunktes der Toxinproduktion, das ist nach fünf bis sechs Tagen, aus dem Brutschrank herausnehmen. Debrand hat nun beobachtet, daß diese Schädigung des Toxins nur eintritt bei Verwendung von frischer Bouillon. Benutzt man ältere Bouillon, 2½ Monate alte, so wird das Maximum der Giftigkeit ebenfalls am sechsten Tage erreicht, aber die Toxizität nimmt nicht schnell ab wie bei frischer Bouillon, sondern hält sich längere Zeit auf der gleichen Höhe.

Nach Versuchen von Tarozzi sowie Wrzosek wachsen die Tetanusbazillen auch bei Luftzutritt in Bouillon, wenn in diese Organe gesunder Tiere gebracht werden.

Das von den Tetanusbazillen gebildete Gift ist bei Züchtung der Bazillen in der beschriebenen Weise in der Bouillon in gelöster Form enthalten. Soll nun nur das Gift als solches verwendet werden, so genügt es nicht, die Bouillonkultur durch Papier zu filtrieren und mit einem Antiseptikum zu versetzen, da die Sporen der Tetanusbazillen durch den üblichen Gehalt an Antisepticis nicht abgetötet werden, also in den Tierkörper gebracht, wachsen und nicht kontrollierbare Mengen Toxin produzieren. Die Sporen müssen deshalb durch lang andauerndes scharfes Zentrifugieren

oder noch besser durch Filtration durch keimdichte Filter entfernt werden.

Eine Reindarstellung des Tetanustoxins ist mit den bisherigen Methoden noch nicht gelungen. Über die Natur des Giftes besitzen wir daher noch keine genaue Kenntnis. Die Einreihung des Tetanusgiftes wie auch des Diphtheriegiftes unter die Fermente und Alkaloide konnte nicht aufrecht erhalten werden (Vaillard und Vincent, Fermi und Pernossi, Brieger, Tizzoni und Cattani).

Ebenso wie zur Reingewinnung des Diphtheriegiftes fällten Brieger und Fraenkel das Gift aus der Tetanusbouillonkultur durch Sättigen mit Ammonsulfat und durch Zusatz von absolutem Alkohol. Das Salz wurde aus dem wasserlöslichen Ammonsulfatniederschlag durch Dialyse entfernt. Zur Fällung mit Alkohol wurde die Bouillon auf $\frac{1}{3}$ ihres Volumens bei 30° im Vakuum zuerst eingengt und darauf in die zehnfache Menge absoluten Alkohols gebracht, dem einige Tropfen Essigsäure zugefügt waren. Der Niederschlag wurde durch Filtration gewonnen. Sie erhielten so eiweißähnliche Körper (Toxalbumine) und glaubten damals, daß diese aus den Eiweißkörpern des Nährbodens durch die Bakterien gebildet würden.

In gleicher Weise versuchten Vaillard und Vincent das Tetanusgift zu isolieren, indem sie durch Eiweißfällungsmittel das Toxin mitrissen. Es gelang ihnen dies nur unvollständig mit Kalk oder Aluminiumphosphat. Selbst nach sechs Ausfällungen blieb die Flüssigkeit noch giftig.

Brieger und Cohn konnten mit Ammonsulfat das gesamte Gift ausfällen. Das Toxin enthielt außer Salzen auch die mitgefällten Eiweißkörper der Bouillon. Diese wurden entfernt durch vorsichtige Behandlung des Niederschlages mit basischem Bleiacetat unter Zusatz kleinster Mengen von Ammoniak. Dieses Verfahren ergab keine Giftverluste, aber auch öfters nicht den gewünschten Effekt, da bei einem Plus oder Minus von Bleiacetat Eiweiß in Lösung bleibt. Das Eiweiß durch Erhitzen, Alkohol oder durch Sublimat unlöslich zu machen, war ohne Erfolg. Die Peptone, Amidosäuren und Salze wurden durch ein- bis zweitägiges Dialysieren gegen strömendes Wasser entfernt. Wesentliche Giftmengen gingen dabei nicht verloren. Nach der Dialyse wurde die toxinhaltige Flüssigkeit im Vakuum bei 20 bis 22° eingedampft,

wobei sich auch die riechenden Substanzen verflüchtigten. Das getrocknete Toxin stellt schwach gelbliche, durchsichtige Häutchen dar, die leicht wasserlöslich und geruchlos sind, nach Gummi arabicum schmecken und die Polarisationsebene nach links drehen. Ausgiebig dialysiert enthält das Gift nur wenig Asche, gibt keine Millonsche und keine Xanthoproteinreaktion und beim Kochen mit Eisenchlorid keine Rotfärbung, also keine Reaktion mehr auf Amidosäuren. Ferner gibt es mit Kupfersulfat und Lauge schwache Violettfärbung, nicht aber die eigentliche Rosafärbung der Biuretreaktion. Phosphor enthält das Toxin nicht mehr und nur unwägbare Schwefelmengen. Es ist nicht mehr fällbar durch Natriumchlorid, Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat, noch durch Calciumphosphat, kohlensaure Magnesia oder Aluminiumhydroxyd. Die Eigenschaften des gereinigten Toxins entsprechen also nicht mehr dem Charakter des gewöhnlichen Eiweißes. Das Gift ist sehr unbeständig, selbst unter Abschluß von Luft, Licht und Feuchtigkeit zersetzt es sich allmählich. Die tödliche Dosis beträgt für eine Maus bei subkutaner Einverleibung 0,000 000 05 g.

Tizzoni wandte ein ähnliches Verfahren an. Die keimfrei gemachte Tetanusbouillon wurde zweimal mit Ammonsulfat gefällt, der Niederschlag in Wasser oder 1 proz. Kochsalzlösung gelöst und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach Eindampfen im Vakuum bei 20 bis 22° und nachherigem völligen Trocknen über Schwefelsäure bekam er gelbbraune, glänzende Plättchen.

Brieger zeigte noch, daß eine Ausfällung des Tetanusgiftes möglich ist durch sukzessive Behandlung der Filtrate mit Chlorcalcium und Natriumphosphat. Im Laufe seiner zahlreichen Untersuchungen machte Brieger die Beobachtung, daß aus hoch toxischen Bouillonfiltraten das Aussalzen mit Ammonsulfat nicht mehr gelingt. Brieger erklärt diese Erscheinung damit, daß mit zunehmender Giftigkeit die Peptone bzw. Albumosen immer mehr schwinden und so die Angriffspunkte des Ammonsulfats, welches mit diesen Eiweißkörpern das Gift mechanisch mitreißt, an Zahl abnehmen. In derartigen hoch giftigen Kulturen verwandte Brieger mit Vorteil neutrales Bleiacetat, 5 g auf 100 ccm Filtrat, zur Ausfällung des Toxins, die Kultur wird mit dem Bleisalz gut durchgeschüttelt und der Niederschlag mit Wasser gewaschen. Das Gift wird aus dem Niederschlag durch Schütteln mit Natriumsulfat befreit. Brieger gibt an, daß eine völlige Reinigung des Giftes

bis zum Schwinden der Biuretreaktion ohne gleichzeitige Einbuße der Wirksamkeit bisher nicht möglich war. Doch schein ihm die Biuretreaktion nicht dem Gifte als solchem anzuhafte, sondern den schwer zu entfernenden Verunreinigungen desselben.

Ein weiteres Mittel zur quantitativen Ausfällung des Toxins fanden Brieger und Boer im Zinkchlorid. Der Niederschlag ist in destilliertem Wasser ganz unlöslich, infolgedessen gut waschbar. Er ist löslich in kochsalzhaltigem und schwach alkalischem Wasser. Leitet man Kohlensäure in das durch Alkali gelöste Zinktoxin, so bleibt das Gift stets beim Metall. Die gereinigte Zinktoxinverbindung enthält keine Spur von Eiweiß oder Pepton. Sie gibt keine Eiweißreaktion, weder die Xanthoprotein-, Millonsche, noch Biuret- oder Adamkiewiczzsche Reaktion, und ist optisch inaktiv. Aus 1 Liter Tetanusbouillon gewinnt man 3 g Zinktoxin, in denen etwa der zehnte Teil organische Substanz enthalten ist. Die Zinktoxinverbindung kann nur durch phosphorsaures Natron getrennt werden, doch haften dem Toxin hartnäckig anorganische Substanzen an.

Bei Trocknung eines Bouillonkulturfiltrates im Vakuum bei Zimmertemperatur erhält man nach Vaillard und Vincent einen amorphem, braunen Rückstand, der den typischen Kulturgeruch hat und sehr giftig ist. Mit 90 proz. Alkohol läßt sich nur ein geringer Teil dieses Rückstandes lösen. Durch Verdampfen des Alkohols entsteht ein weißgrauer Rückstand, der teilweise an der Luft kristallisiert. Der alkohollösliche Anteil ist ungiftig, der wasserlösliche stark toxisch. Mittels Alkohol wird er aus der wässrigen Lösung in grauen Flocken gefällt.

Wegen der großen Unbeständigkeit ist es durchaus nötig, das Tetanustoxin trocken aufzubewahren. Courmont und Doyon bringen die filtrierte Bouillon in dünner Schicht ausgebreitet in einen Vakuumapparat und dampfen dieselbe bei 30° ein. Nach dem Eindampfen zur Trockne wird das Toxin pulverisiert in luftleeren Behältern vor Licht und Wärme geschützt aufbewahrt. Nach jeder Entnahme muß wieder evakuiert werden.

Eine bequeme und gute Methode zur Gewinnung von Trockengift ist das Aussalzen mit Ammonsulfat, wie es zuerst von Brieger und Cohn mit guter Toxinausbeute angewendet wurde. Auch verliert das Gift mit dieser Fällungsmethode nichts von seiner Wirksamkeit. Die entkeimte Bouillon wird bis zur vollständigen

Sättigung mit festem kristallisiertem Ammonsulfat versetzt. Es wird so viel Ammonsulfat hinzugefügt, daß nach kräftigem Umrühren noch ein Teil ungelösten Ammonsulfats auf dem Boden zurückbleibt. Da das gesamte Gift nur gewonnen wird bei völliger Sättigung des Bouillonfiltrates mit dem Fällungsmittel, ist es nötig, zur besseren Lösung die Flüssigkeit mit einem Überschuß des Salzes noch einige Stunden in den Brutschrank zu stellen. Nach dem Ausfällen sammeln sich die Eiweißkörper mit dem Gift als dunkelbräunliche Massen auf der Oberfläche der Bouillon, von wo sie mit einem Spatel abgehoben werden können. Die Flüssigkeit und das überschüssige Salz werden durch Pressen auf Tontellern entfernt. Der auf dem Tonteller — nicht zu lange darauf lassen, wegen des Antrocknens sonst zu schwierig herabzunehmen — abgepreßte Niederschlag wird zur gänzlichen Trocknung auf Glasplatten ausgestrichen in einen Exsikkator über konzentrierte Schwefelsäure gebracht. Das trockene Toxin wird in einer Reibschale pulverisiert. Das Pulver ist in Wasser und Kochsalzlösung gut löslich. Man ist so stets in der Lage, durch Abwiegen bestimmter Mengen gleich starke Toxinlösungen herzustellen. Dieses Trockengift kann vor Licht geschützt ohne sonstige Vorsichtsmaßregeln lange Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, ohne an Giftigkeit zu verlieren.

Ein unbegrenzt haltbares Tetanustoxin läßt sich nach dem Vorgehen von Marx darstellen. Marx fällt die Tetanuskulturen mit Ammonsulfat aus, löst den Niederschlag auf, zentrifugiert und fällt den Abguß von neuem aus. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit sporenfrei ist. Das Gift wird jetzt in dem zehnfachen Gewichtsverhältnis Wasser gelöst, und von dieser Lösung werden mit genau geeichten Pipetten bestimmte Quantitäten in Ehrliche Vakuumpipetten gefüllt. Die Röhren werden im Exsikkator über Nacht getrocknet und am anderen Tage in einem Apparate mit Phosphorsäureanhydrid vollständig luftleer gemacht. In dieser Weise erhält man konstante Giftmengen, ohne jedesmal abwiegen zu müssen.

Chemisch-physikalische Eigenschaften.

Unter denselben Bedingungen aufbewahrt wie das Diphtheriegift, d. h. in flüssigem Zustande im Kulturfiltrat mit Übersichtung von Toluol oder Paraffin. liquid., verliert das Tetanusgift rasch

seine toxischen Eigenschaften. Andere konservierende Zusätze wie Malachitgrün, Natriumphosphat oder das von Knorr empfohlene Versetzen mit Natriumchlorid bis zu 10 Proz. haben sich nicht besonders bewährt. Um eine Abschwächung des Giftes zu vermeiden, muß man es trocken aufbewahren. Die Trocknung geschieht nach einem der oben beschriebenen Verfahren. Für den Gebrauch stellt man aus dem Trockengift 10 proz. Stammlösungen her mit einem Zusatz von 10 Proz. Kochsalz oder 50 Proz. Glycerin. Derartige Lösungen behalten, im Eisschrank aufbewahrt, wochenlang ihren Giftwert und bleiben steril. Ein Zusatz von Antisepticis (Carbolsäure) darf das in Kochsalzlösung konservierte eingeeengte Gift nicht erhalten. Auch konzentrierte Stammlösungen (10 bis 20 proz.) ohne Zusatz von Kochsalz und Glycerin bewahren durch Wochen hindurch, wenn sie mit Paraffinöl überschichtet und im Dunkeln gehalten werden, ihren indirekten Giftwert, d. h. den Antitoxin neutralisierenden Wert. Bei dieser Art des Aufbewahrens empfiehlt sich ein Zusatz eines Antiseptikums, 0,05 Proz. Sublimat oder Malachitgrün. Von den Stammlösungen müssen die erforderlichen weiteren Verdünnungen stets frisch in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden.

Das Gift im Tetanusbouillonfiltrat verliert gewöhnlich schon beim Aufbewahren im Eisschrank im Laufe von drei Wochen unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs das Drei- bis Vierfache an direktem Giftwert (Behring). Bei Überschichten mit Toluol oder Paraffinum liquid. ist die Abnahme weniger deutlich. Außer beim natürlichen Stehenlassen und durch den schädigenden Einfluß von Luft bzw. Sauerstoff wird das Tetanustoxin durch verschiedene Chemikalien abgeschwächt. Den abschwächenden Einfluß des Jods erkannten Roux und Martin, sowie Behring und seine Mitarbeiter. Erstere verwandten Lugol'sche Lösung. Behring und Knorr fanden bei Einwirkung von 0,05 proz. Jodtrichloridlösung auf eine Giftlösung in 10 Proz. Kochsalz innerhalb 24 Stunden eine Abschwächung um das 400-fache, nach 5 Monaten um das 4000-fache. Eine entsprechend stärkere Abschwächung bedingt nach Behring eine stärkere Lösung von Jodtrichlorid. So wird durch eine 0,15 proz. Jodtrichloridlösung die wässrige Giftlösung nach 36 Stunden um das 500-fache, durch eine 0,2 proz. Lösung in derselben Zeit um mehr als das 4000-fache abgeschwächt.

Eine rasche Entgiftung ruft nach den Versuchen von Ehrlich Schwefelkohlenstoff hervor. Es entstehen durch Einwirkung von Schwefelkohlenstoff auf das Tetanusgift Toxoide, da dieses veränderte Gift befähigt ist, leicht Antikörper zu bilden.

Bereits Kitasato hat die Wirkung verschiedener Chemikalien auf das Tetanustoxin studiert. Von schädlichem Einfluß war der Zusatz von Jodtrichlorid und Kreosot, nicht aber Jodoform. Eine 0,55 proz. Salzsäurelösung vernichtet das Gift in einer Stunde, eine 0,365 proz. in 24 Stunden. Auch gegen andere Säuren, besonders Mineralsäuren ist das Gift sehr empfindlich, sowie gegen Alkalien. Tizzoni und Cattani fanden Alkalien und Neutralsalze ohne Einfluß. Kohlensäure hat weder einen fällenden noch zerstörenden Einfluß, Essigsäure wirkt erst in größeren Mengen schädigend. Einmal durch Säuren unwirksam gewordene Gifte können durch Neutralisation nicht wieder aktiviert werden (Fermi und Pernossi).

Durch Alkohol wird das Gift gefällt und geschädigt. Äther, Chloroform, Äthylacetat, propionsaures, ameisensaures Äthyl haben keinen Einfluß, ebensowenig Verdünnungen mit Wasser oder Bouillon und normales Serum verschiedener Tiere (Kitasato).

Ohne Einfluß sind ferner nach Versuchen von Fermi und Pernossi verschiedene Fermente, so Ptyalin, Diastase, Emulsin, Pepsin; die zerstörende Eigenschaft des Magensaftes beruht auf dessen Salzsäuregehalt. Von zweifelhafter Wirkung ist das Trypsin. Das Gift ist auch widerstandsfähig gegen verschiedene Mikroorganismen. Das Unwirksamwerden des Toxins im lebenden Darm von Meerschweinchen und Katzen, nicht von Hunden oder Hühnern, wird nach Fermi und Pernossi durch das Epithel bewirkt.

Wässriger Auszug von frischer Kalbsthymus bewirkt nach Brieger, Kitasato und Wassermann nach 24 Stunden im Eisschrank eine Abschwächung des Tetanustoxins. Einen schädigenden Einfluß auf das Toxin haben Oxydasen, aus tierischen Organen (Leber, Milz, Niere) hergestellte, und eine pflanzliche, die Lakkase (Sieber).

Eine zerstörende Kraft besitzen noch andere Substanzen, die oxydierend wirken, das Calciumperoxyd und das Wasserstoffsuperoxyd (Sieber, Löwenstein). Das Gift wird gänzlich zerstört, es verliert auch die antitoxinbindende und immunisierende Eigenschaft.

Eine eigentümliche Veränderung des Tetanusgiftes ermittelte Wolff-Eisner. Ein nach Bergell hydrolysiertes Toxin — Einwirkung von wasserfreier Salzsäure bei der Temperatur der flüssigen Luft — soll eine erhebliche Einbuße in seiner tödlichen, nicht aber in der krampferzeugenden Wirkung erleiden.

Das mit 10 Proz. Kochsalz gelöste Gift ist gegen chemische Mittel viel empfindlicher als bei geringerem Kochsalzgehalt, wie z. B. normale Bouillon bereitet wird.

Eine sehr schnelle Zerstörung des Giftes tritt unter dem Einfluß der Erhitzung ein. Die Angaben der verschiedenen Autoren über die Höhe der Zerstörungstemperatur schwanken jedoch nicht unbeträchtlich. Das trockene Gift ist wesentlich widerstandsfähiger gegen höhere Wärmegrade als das flüssige Toxin. Die Zersetzung des Tetanusgiftes setzt nicht erst bei einer bestimmten Temperatur ein, sie wird nur durch die Einwirkung von Hitze oder anderer schädigender Agenzien beschleunigt.

Eine Erwärmung des flüssigen Giftes während 5 Minuten auf 65°, 30 Minuten auf 60° und 90 Minuten auf 55° vernichtet das Gift nach Kitasato. Tatsächlich handelt es sich aber nur um eine Abschwächung, denn nach Vaillard und Rouget tritt eine völlige Zerstörung des Tetanusgiftes erst nach dreistündigem Erhitzen auf 80° ein. Nach Knorr verträgt das flüssige Gift öfters selbst Erwärmung auf 100°, ohne ganz zerstört zu werden. Tizzoni und Cattani fanden als Zerstörungstemperatur 60 bis 80°. Fermi und Pernossi geben als Vernichtungstemperatur für das flüssige Gift 85° an. Das vollkommen trockene Gift vertrug selbst Erhitzung auf 120° ohne Schaden. Auch nach Morax und Marie kann das Trockentoxin 15 bis 20 Minuten auf 120° erhitzt werden, ohne daß es viel von seiner Wirksamkeit einbüßt. 15-minütiges Erwärmen auf 150° schwächt das trockene Gift stark ab, dreistündiges auf 140° zerstört es vollkommen.

Das diffuse Tageslicht wirkt nur langsam schädigend auf das Gift. Direktes Sonnenlicht zerstörte es nach den Versuchen Kitasatos nach 15 bis 18 Stunden, nach denen von Fermi und Pernossi bereits nach 8 bis 10 Stunden. Trocken oder in Chloroform, Benzol, Amylalkohol gelöst, widersteht das Gift 100 Stunden lang der direkten Belichtung.

Jodlbauer und Tapeiner, Huber, Flexner und Noguchi untersuchten den Einfluß photodynamischen Stoffes. Besonders

wirksam erwiesen sich hierbei die Eosine bei 1 bis 5 proz. Zusatz, wenn die Lösungen dem Lichte ausgesetzt waren. In größeren Mengen zugesetzt wirkt das Eosin auch im Dunkeln schädigend auf das Tetanustoxin. Nach Angaben von v. Eisler und Pribram erfährt das Gift außerdem eine Abschwächung durch Zusatz von Erythrosin und Methylenblau (Schwoner), wenn die Lösungen drei Tage lang belichtet wurden. Das Erythrosin und Eosin wirken kräftiger als das Methylenblau.

Elektrische Ströme von 0,5 Amp. Stärke vernichten das Gift nach etwa zweistündiger Einwirkung (Fermi und Pernossi).

Von weiteren physikalischen Eigenschaften wissen wir, daß das Gift gar nicht oder nur sehr schwer dialysiert. Daß es ferner von einer Anzahl Fällungsmittel mitgerissen wird, ist schon früher bei den Reinigungs- und Konzentrationsversuchen erwähnt. Bei der Filtration durch keimdichte Filter wird gleichfalls Toxin zurückgehalten. Ob das Tetanusgift selbst kolloidaler Natur ist, wie Hayaski annimmt, oder nur mit den Eiweißkörpern zurückgehalten wird, ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden.

Die abgeschwächten Gifte weisen gegenüber den frischen Giften gewisse Unterschiede auf. So fanden Behring und Ransom die Differenz zwischen tödlicher und krankmachender Dosis verändert. Sie ist größer bei Toluolgiften, kleiner bei Jodtrichloridgiften als beim frischen Gift. Daß sie zur Neutralisation gleicher Anzahl letaler Dosen mehr Antitoxin benötigen als ungeschwächtes Toxin, spricht nach Ehrlichs Lehre für das Vorhandensein von Toxoiden. Ferner ist das Inkubationsstadium bei den Jodtrichloridgiften erheblich verlängert. Weiter ist der Giftwert gegenüber verschiedenen Tieren verändert. Es entspricht die einfache letale Dosis für eine weiße Maus dem 150. Teile der dosis letalis für ein Kaninchen auf 1 g Lebendgewicht berechnet. Bei einem Toluolgift fand Behring statt dieses Verhältnisses Maus:Kaninchen 1:150 ein solches 1:15, bei einem anderen den Wert für Kaninchen sogar noch niedriger.

Die Giftmessung des Tetanustoxins wird nach Behring an der Maus vorgenommen. Diejenige Giftmenge, welche eine Maus in etwa $4\frac{1}{2}$ Tagen tötet, bezeichnet v. Behring als einfach tödliche Dosis = L_+ (Limes-Grenzwert). Den Limeskrankgrenzwert (L_0) stellt nach Behring jene Giftmenge dar, welche nur eine leichte Erkrankung, eine Hautfaltenbildung auf der injizierten

Seite, hervorruft. Die Differenz zwischen dem L_+ - und dem L_0 -Wert ist der Differenzwert (D -Wert) eines Giftes. Bei frischen, genuinen Giften schwankt derselbe zwischen drei und fünf, d. h. der dritte bzw. fünfte Teil der tödlichen Dosis wirkt noch eben krankmachend. Auf verschiedene Weise abgeschwächte Gifte ergeben, wie schon erwähnt, andere D -Werte, z. B. ist bei den Toluolgiften der Differenzwert höher, bis $D = 10$, bei durch Belichtung abgeschwächten Giften ist er niedriger bis $D = 2$. v. Behring injiziert immer 0,25 ccm der betreffenden Verdünnung einer weißen Maus auf der Bauchseite dem Hinterschenkel zu. Die Erkrankung beginnt mit einer Beugung des Rumpfes mit der Konkavität nach der geimpften Seite, durch Krampf der Bauchmuskulatur hervorgerufen. Die Muskelkontraktur erstreckt sich dann auf das Bein, darauf kommt es zu allgemeinem Muskeltetanus, bis der Tod eintritt.

Außer weißen Mäusen kann man auch Meerschweine zur Wertbestimmung eines Giftes verwenden. Gewöhnlich benutzt man jedoch die ersteren. Zur Vornahme der Prüfung werden die Trockengifte stets frisch in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

v. Behring unterscheidet zwei Giftwerte, einen direkten Giftwert $= \dagger Ms$, d. h. wieviel Gramm lebendes Mäusegewicht 1 g Trockentoxin tötet, z. B. 0,000 01 g Toxin tötet eine Maus von 15 g, so tötet ein Gramm des Giftes 100 000 Mäuse à 15 g $= 1 500 000$ g Mäuse. Der indirekte Giftwert gibt an, wieviel vom Trockengift nötig ist, um $\frac{1}{1000}$ A.-E. (Antitoxineinheit) zu neutralisieren $= \dagger ms$. Behring nennt eine Antitoxineinheit diejenige Menge, die gerade 40 000 000 $\dagger Ms$ neutralisiert. Bei frischen Giften ist das Verhältnis von $\dagger Ms : \dagger ms = 1 : 1$. Diese bezeichnet Behring als Gleichgifte. Bei nicht ganz frischen, modifizierten Giften ist der indirekte Giftwert größer als der direkte (Erklärung für diese Erscheinung siehe unter Diphtheriegift).

Die Empfänglichkeit ist bei den verschiedenen Tierarten verschieden. Am empfänglichsten ist das Pferd. Setzt man die Dosis Gift, welche 1 g Pferd zu töten vermag $= 1$, so ist nach Knorr die dosis letalis für 1 g Meerschweinchen $= 2$, für 1 g Ziege $= 4$, für 1 g Maus $= 13$, 1 g Kaninchen $= 2000$, 1 g Huhn $= 200 000$. Die Empfindlichkeitsbreite — nach Knorr der Zwischenraum zwischen eben krankmachender und tödlicher Dosis — ist bei

empfindlichen Tieren sehr klein, bei weniger empfindlichen Tieren (Huhn) sehr groß. Das Pferd wird schon von der doppelten Menge des Giftes getötet, welches noch keine Veränderungen erzeugt.

Nach der Empfindlichkeitsskala von Behring ergibt sich folgende Gleichung: 1 † Ms = 12 † Pferd = 6 † Meerschwein = $\frac{1}{2}$ † Ziege = $\frac{1}{50}$ † Hund = $\frac{1}{600}$ † Katze = $\frac{1}{1000}$ † Gans = $\frac{1}{4000}$ † Taube = $\frac{1}{30000}$ † Huhn. Von den Säugern ist nach Strubell der Igel außerordentlich widerstandsfähig gegen das Tetanusgift.

Das Tetanusgift hat mit den anderen bakteriellen Giften gemeinsam, daß eine gewisse Zeit verstreicht, bis es seine Wirkung im Organismus entfaltet. Diese Latenzperiode, die Inkubationszeit, läßt sich weder durch große Dosen noch durch irgend eine Applikationsweise ganz beseitigen. Nach Versuchen von Courmont und Doyon vermindert selbst die 30000-fache letale Dosis die Inkubation nur um 2 Stunden, die 90000-fache um 3 Stunden, so daß diese für Meerschweine 12 bis 13 Stunden beträgt. Eine weitere Verkürzung konnte auf keine Weise erzielt werden. Je größer die Giftdosis ist, desto rascher sterben die Tiere nach dem ersten Auftreten der Symptome. Bei der einfachen oder wenig höheren Dosis beträgt die Inkubation bei weißen Mäusen etwa 24 Stunden, bei kleineren Gaben ist sie länger, aber kaum länger als 3 bis 4 Tage. Behring und Ransom reduzierten die Inkubationszeit für Mäuse durch Injektion von 1000 letalen Dosen auf 8 Stunden. Beim Meerschwein beträgt die Latenzperiode 24 bis 48 Stunden, beim Kaninchen 3 bis 4 Tage, noch mehr beim Pferde, 8 bis 9 Tage beim Huhn.

Die gewöhnliche Art der Einverleibung des Tetanusgiftes ist die subkutane oder intramuskuläre. Zur Erreichung des gleichen Effektes muß man bei intravenöser Injektion etwa acht- bis zehnmal mehr injizieren als bei subkutaner. Wir haben hier also das entgegengesetzte Verhalten wie beim Diphtherietoxin, wo die Injektion in die Blutbahn bei geringeren Mengen wirksam ist als die in die Subkutis. Die Wirksamkeit eines Giftes wird ganz erheblich verstärkt, wenn dasselbe intraneural, d. h. direkt in die Bahn eines peripheren Nerven eingeführt wird, bis zu 50 fach gegenüber der subkutanen Einspritzung.

Die Hauptsymptome, welche die Tiere auf Einverleibung des Tetanustoxins darbieten, bestehen in tonischer Starre der

Muskulatur und in erhöhter Reflexerregbarkeit, welche sich in klonischen Krämpfen äußert. Abweichend vom Tetanus des Menschen und der größeren Haustiere gestaltet sich das Symptomenbild nach subkutaner oder intramuskulärer Impfung bei den meisten unserer kleinen Versuchstiere (Maus, Meerschwein, Kaninchen). Nach ein- bis dreitägiger Inkubation tritt hier die tonische Starre zunächst in den der Impfstelle benachbarten Muskeln auf. Werden bloß Bruchteile der letalen Dosis injiziert, so bleibt die Kontraktion der Muskeln auf eine Extremität oder eine Muskelgruppe beschränkt (lokaler Tetanus). Waren die Giftgaben größer, so schreiten die Kontrakturen weiter fort und ergreifen zunächst die entsprechenden Teile der anderen Körperhälfte. Dann erst schreitet der Tetanus auf den Vorderkörper fort, auf die vorderen Extremitäten und die Rückenmuskulatur. Der Starrkrampf verläuft bei Impfung eines der Hinterbeine beispielsweise so, daß beim Beginn der Krankheit das Bein leicht abduziert und gestreckt wird. Unter Zunahme der Erscheinungen kann in Stunden schon eine vollständige Starre eintreten. Die Zehen sind dann gespreizt und die Fußsohle ist nach oben gekehrt. Der Schwanz der Maus ist meist zu gleicher Zeit starr und nach der kranken Seite hin verzogen. Während sich am geimpften Bein die Krankheit zu ihrer vollen Höhe entwickelt, beginnt derselbe Prozeß an der korrespondierenden Extremität und schreitet dann in der beschriebenen Weise weiter. Bei schwächeren Impfungen werden Reflexstöße überhaupt nicht, bei stärkeren in der Regel erst kurz vor dem Tode gesehen. Diese lokal beginnende Form des Tetanus bezeichnet man als Tetanus ascendens im Gegensatz zum Tetanus descendens des Menschen und der größeren Haustiere, welcher unabhängig vom Ort der Impfung an bestimmten Muskelgruppen einsetzt. Beim Menschen werden zuerst die Kaumuskeln (Trismus), beim Pferde und Esel zuerst die Muskeln des Schweifes und der Ohren befallen.

Umgekehrt wie bei der intravenösen Infektion zeigt sich bei der intracerebralen eine Verstärkung der Wirkung und Abkürzung der Inkubation. Bei intravenöser Applikation, bei welcher die Dosis größer sein muß und die Inkubationszeit verlängert ist, treten nach Ablauf der Latenzperiode die Symptome ziemlich unvermittelt auf und erstrecken sich auf die ganze Muskulatur zu gleicher Zeit. Der Verlauf der Krankheit ist viel stürmischer infolgedessen. Auch

ist die Reflexerregbarkeit deutlich erhöht, es lassen sich leicht durch äußeren Reiz Reflexstöße auslösen. Dönitz beobachtete nach Injektion untertödlicher Dosen vor allem bei Kaninchen ein Krankheitsbild, das er als Tetanus sine tetano beschrieb. Es fehlen hierbei alle charakteristischen Krankheitserscheinungen, das Ganze imponiert als eine mit starker Abmagerung einhergehende Kachexie.

Ferner treten die tetanischen Erscheinungen an allen Muskeln gleichzeitig auf bei intraperitonealer und subarachnoidaler Impfung. Die Dosierung ist dieselbe wie bei subkutaner Einspritzung, doch ist häufig der Symptomkomplex bei Impfung in die Bauchhöhle wenig charakteristisch und sollte daher diese Impfmethode zur Wertbestimmung keine Verwendung finden.

Roux und Borrel spritzten das Gift in das Gehirn. Sie erzielten damit eine Erhöhung der Giftwirkung, Abkürzung der Inkubation, aber auch eine wesentliche Veränderung des Krankheitsbildes, den sogenannten cerebralen Tetanus. An Stelle der permanenten Kontraktionen treten hier Exzitation, epileptiforme Krämpfe, Polyurie und motorische Störungen.

Ein anderes eigentümliches Krankheitsbild, Tetanus dolorosus, beobachteten Meyer und Ransom, wenn sie bei Katzen und Hunden Bruchteile der bei subkutaner Einspritzung tödlichen Dosis in die hinteren Wurzeln der Lendennerven injizierten. Etwa 18 Stunden später wurden die Tiere von sehr heftigen Schmerzen ergriffen, die einige Sekunden anhielten, sich wiederholten und durch spontane Reize auslösbar waren. Muskelkontraktionen fehlen völlig. Der Tod der Tiere erfolgt an Erschöpfung.

Nach Zupnik entsteht auch bei kleineren Versuchstieren Tetanus descendens, wenn das Gift an solche Stellen gebracht wird, wo keine Muskeln sind, wie am Sprunggelenk.

Binot sah nach Impfung des Giftes direkt in die Bauch- und Brustorgane (Uterus, Hoden, Nieren, Lunge) einen charakteristischen splanchnischen Tetanus sich entwickeln, welcher sich durch Fehlen von Muskelkontrakturen von dem gewöhnlichen Krankheitstypus unterscheidet.

Völlig unschädlich ist die Einführung des Tetanusgiftes in den Intestinaltraktus (Vaillard und Vincent, Ransom).

Literatur: Behring, Ztschr. f. Hyg. **12**. Derselbe, Fortschr. d. Med. 1899. Behring und Knorr, Ztschr. f. Hyg. **13** (1893). Behring und Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Brieger, ebenda 1887.

Derselbe, Ztschr. f. Hyg. **19**. Brieger und Boer, ebenda **21**. Brieger und Cohn, ebenda **15**. Brieger, Kitasato und Wassermann, ebenda **12**. Brieger und Fränkel, Berl. klin. Wochenschr. 1890. Courmont und Doyon, C. rend. de la soc. de biol. 1893. Dieselben, Le Tétanos, Paris 1899. Debrand, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900 und 1902. Dönitz, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Ehrlich, Klin. Jahrb. 1897. v. Eisler und Pribram, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **1** (1908). Fermi und Pernossi, Zentralbl. f. Bakt. **15**. Flexner und Noguchi, Studies from the Rockefeller Institute 1905. Hayaski, Über die chemische Natur des Tetanustoxins. Zitiert nach v. Lingelsheim, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Huber, Archiv. f. Hyg. 1905. Jodlbauer und Tapeiner, Münch. med. Wochenschr. 1904. Kitasato, Ztschr. f. Hyg. **7** und **10**. Knorr, Fortschritte d. Med. 1897. Derselbe, Münch. med. Wochenschr. 1898, Nr. **11** u. **12**. v. Lingelsheim, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Löwenstein, Wiener klin. Wochenschr. 1903. Marie und Morax, Ann. de l'Inst. Pasteur 1902 u. 1903. Marx, Festschr. f. Koch, Jena 1903. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. **40**. Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898. Meyer und Ransom, Arch. f. exper. Pharm. u. Pathol. **49**. Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Derselbe, Ztschr. f. physiol. Chemie 1900. Roux und Borrel, Ann. de l'Inst. Pasteur 1898. Roux und Martin, ebenda 1894. Siebert, Ztschr. f. physiol. Chemie 1901. Tarozzi, Zentralbl. f. Bakt. **38**. Tizzoni, Riforma med. 1899. Tizzoni und Cattani, Zentralbl. f. Bakt. **11**. Dieselben, Arch. f. exper. Pharm. u. Pathol. 1890. Uschinsky, Zentralbl. f. Bakt. 1893. Vaillard, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892. Vaillard und Rouget, ebenda. Vaillard und Vincent, ebenda 1891. Wassermann, Berl. klin. Wochenschr. 1898. Wolff-Eisner, Münch. med. Wochenschr. 1906. Wrzosek, Zentralbl. f. Bakt. 1906. Zupnik, ebenda **24** und Deutsche med. Wochenschr. 1900 u. 1905.

b) Das Tetanusantitoxin.

Für praktische Zwecke der Tetanusantitoxingewinnung wählt man in der Regel das Pferd, seltener die viel weniger empfindliche Ziege und das Schaf. Am besten eignen sich gesunde Pferde im Alter von fünf bis sechs Jahren.

Die vorteilhafteste Injektionsweise des zur Immunisierung nötigen Toxins ist die subkutane. Zur Erzeugung einer Grundimmunität bedient man sich ähnlicher Verfahren wie bei der Herstellung des Diphtherieantitoxins. Um die Tiere möglichst gefahrlos zunächst giftfest zu machen, beginnt man mit der Einspritzung von abgeschwächten Giften, oder man injiziert zuerst das Antitoxin (möglichst mit Serum derselben Tierart) und erst

dann das Toxin. Man kann auch statt dessen ein fast neutralisiertes Toxin-Antitoxingemisch einspritzen.

Außer der weniger geeigneten Abschwächung der Kulturfiltrate durch Erwärmung auf 55 bis 65° nach Vaillard hat man verschiedene chemische Mittel zu diesem Zweck verwendet. Brieger schwächt das Toxin dadurch ab, daß er Schwefelwasserstoff in mit Gift gefüllte Röhren einleitet, diese zuschmilzt und vier Tage lang im Brutschrank bei 37° stehen läßt. Der Schwefelwasserstoff wird dann durch reinen Wasserstoff verjagt. Roux und Martin schwächten das Tetanusgift durch Zugabe von Lugolscher Lösung ab. Die besten Resultate gewann v. Behring, indem er zur Abschwächung Jodtrichlorid benutzte.

Babes und Pawlowsky, sowie Knorr verwenden das Antitoxin dazu. Sie injizieren Toxin-Antitoxingemische mit unausgeglichenem Giftrest.

Die Immunisierung wird mit eben krankmachenden Dosen begonnen. Für die Dosierung der folgenden Injektionen ist die jedesmalige Reaktion maßgebend. Es muß namentlich im Anfang darauf geachtet werden, daß die empfindlicheren Tiere ungefähr im Laufe von zwei Monaten über die schnell tödende Dosis hinweggebracht werden. Auch im weiteren Verlaufe der Immunisierung muß in möglichst schonender Weise vorgegangen werden. Man vermeidet stark krankmachende Dosen, um die antitoxinspendenden Tiere möglichst lange zur Antikörpergewinnung brauchbar zu erhalten. Außer der Höhe der Dosis spielt noch die Zeit eine Rolle, in welchen Abständen die Einspritzungen vorgenommen werden; es darf nicht zu häufig injiziert werden. Die Behandlung darf nicht vor völligem Ablauf der Reaktion fortgesetzt werden. Solange Krankheitssymptome allgemeiner Natur wie Temperaturerhöhung, verminderte Freßlust mit folgender Abmagerung, Unbehilflichkeit der Bewegungen, Kontraktionen der Rückenmuskeln bestehen, sind die Tiere empfindlicher als im frischen Zustand. Mit der Erholung der Tiere beginnt die Antitoxinproduktion und jetzt vertragen sie größere Dosen, als nötig sind, um Kontrolltiere zu töten. Man müßte nun annehmen, daß zur Zeit, zu welcher der Körper über die größte Antitoxinmenge verfügt, der günstigste Moment für die folgende Injektion wäre und der Organismus jetzt die größten Toxinmengen vertragen würde. Dies ist nun sehr häufig nicht der Fall, die Tiere sind oft zur Zeit des höchsten Anti-

körpergehaltes des Blutes sehr empfindlich gegen Injektion großer Mengen. Man injiziert deshalb vor dem Höhepunkt der Antikörperproduktion kleinere Dosen, meist in Zwischenräumen von etwa fünf Tagen.

Für die Höhe der folgenden Injektionen gibt die Temperatur die besten Anhaltspunkte. Temperaturen von 40° zeigen an, daß die Dosis zu hoch gegriffen war, man muß bei der nächsten Injektion dieselbe Menge wiedergeben, eventuell noch darunter bleiben.

v. Eisler und Pribram gehen bei der Immunisierung von Pferden in folgender Weise vor. Ihr Schema lehnt sich eng an die grundlegenden Arbeiten von v. Behring für die Immunisierung von Tieren gegen Tetanus an. Zur Immunisierung eines Pferdes werden etwa 200 ccm eines Toxins benötigt, welches so giftig ist, daß $\frac{1}{5000}$ bis $\frac{1}{2500}$ ccm davon eine Maus innerhalb drei Tagen unter den typischen Erscheinungen des Tetanus tötet. Der größte Teil des Giftes wird mit abfallenden Mengen Jodtrichlorid versetzt, und zwar werden unter Zugrundelegen der 200 ccm als Mindestmenge daraus vier Portionen hergestellt:

	Jodtrichlorid
1. 80 ccm erhalten einen Zusatz von . . .	0,25 Proz.
2. 60 " " " " " " . . .	0,175 "
3. 40 " " " " " " . . .	0,125 "
4. 20 " bleiben ohne jeden Zusatz.	

Das Pferd bekommt zunächst 10 ccm des Teiles vom Gift, welches den höchsten Jodtrichloridzusatz aufweist und also am meisten abgeschwächt ist, subkutan injiziert, nach acht Tagen die doppelte Menge der ersten Dosis und nach weiteren acht Tagen die restlichen 50 ccm. Die Portion Nr. 2 wird dann in achttägigen Intervallen auf zwei Injektionen zu 30 ccm, die Portion Nr. 3 ebenfalls in achttägigen Zwischenräumen auf zwei Einspritzungen zu 20 ccm verteilt. Jetzt wird zur Orientierung für die weitere Behandlung ein Probeaderlaß zur Prüfung des Serumtiters vorgenommen. Ist der Antitoxingehalt bei der Prüfung an Mäusen unter 1:100, so darf man von dem reinen Toxin höchstens 0,25 ccm injizieren. Ist er größer, so kann nach Ablauf von acht Tagen gleich die zweifache Menge gegeben werden. Von da ab wird in fünftägigen Zwischenräumen die Dosis jedesmal verdoppelt.

Dieses Schema ist selbstredend nicht bei allen Pferden ohne weiteres anwendbar. Durch Kontrollierung der Temperatur und des Gewichtes sowie unter Berücksichtigung des Allgemeinbefindens muß der Zeitpunkt für die neuen Injektionen eruiert werden. Von der Höhe der Reaktion hängt die Größe der folgenden Injektionsmenge ab. So wird man häufig genötigt sein, die letzte Dosis zu wiederholen, eventuell sogar auf die vorhergehende niedrigere zurückzugreifen. Wenn man auch in dieser Weise mit der Immunisierung sehr hoch gehen kann, so tut man doch gut daran, die Immunisierung nicht unter Anwendung großer Dosen in die Höhe zu treiben, weil die hoch immunisierten Tiere überempfindlich werden (v. Behring). Man bleibt daher besser bei der öfteren Injektion kleinerer Quantitäten. Folgender Versuch v. Behrings lehrt uns, daß man selbst bei strengster Einhaltung aller Vorschriften namentlich bei hoch immunen Tieren von unangenehmen Zwischenfällen nie ganz verschont bleibt. Eine Ziege, die bereits die 125 000-fache tödliche Dosis anstandslos vertragen hatte, ging beim Steigen auf das Doppelte der Dosis plötzlich unter rascher Zunahme der Erscheinungen des Tetanus zugrunde. Am Morgen des Todestages enthielt die Milch noch 50 000 Antitoxineinheiten, das Blut, sofort nach dem Tode entnommen, noch 60 000.

Ein Beispiel möge den Verlauf der Behandlung eines Pferdes demonstrieren und zeigen, wie bei vorsichtiger Immunisierung unter Beachtung der angegebenen Regeln die Temperatur den deutlichsten Hinweis für die weitere Dosierung des Toxins liefert (nach einer Kurve von von Eisler und Pribram). (Siehe die Tabelle auf folgender Seite.)

Die Ziegen sind weniger empfindlich, weshalb man rascher zu höheren Dosen übergehen kann. Die Immunisierung mit abgeschwächtem Gift dauert etwa fünf Wochen, darauf geht man zu reinem Toxin über. Die Zwischenräume der Injektionen betragen beim abgeschwächten Gift zwei bis drei Tage, beim unveränderten Toxin wird jeden fünften Tag injiziert, indem man die Dosis jedesmal verdoppelt.

Bei Schafen kann die Vorbehandlung gleich begonnen werden mit 10 ccm eines Toxins, welches mit 0,175 Proz. JCl_3 versetzt ist. Nach zwei Injektionen in fünftägigen Intervallen folgen drei Dosen (5, 10, 20 ccm) des stärkeren Giftes und darauf sofort die Injektion

Datum	Injektionsmenge des Toxins	Temperatur Grad
23. März	5 ccm + 0,25 Proz. JCl ₃	37,9
29. "	10 " + 0,25 " "	38,1
6. April	15 " + 0,25 " "	38,4
13. "	15 " + 0,25 " "	38,5
21. "	20 " + 0,25 " "	38,3
27. "	30 " + 0,25 " "	38,0
5. Mai	30 " + 0,175 " "	38,4
11. "	35 " + 0,175 " "	38,6
19. "	20 " + 0,125 " "	38,4
26. "	20 " + 0,125 " "	38,2
8. Juni	0,25 ccm reines Toxin	38,5
23. "	0,5 " " "	38,3
1. Juli	1,0 " " "	38,7
16. "	1,0 " " "	38,3
21. "	2,0 " " "	38,3
28. "	3,0 " " "	38,4
3. August	5,0 " " "	38,4
8. "	10,0 " " "	38,6
13. "	20,0 " " "	38,3
18. "	35,0 " " "	38,3
23. "	50,0 " " "	38,7
30. "	70,0 " " "	38,3
5. September	100,0 " " "	38,0
10. "	150,0 " " "	38,2
16. "	180,0 " " "	39,2
24. "	200,0 " " "	40,7
30. "	140,0 " " "	—

von 1 ccm reinen Toxins usw. (Bei Schafen ist außer auf Temperatur und Körpergewicht auf Darmkoliken zu achten.)

Wie bei der Diphtherieserumgewinnung ist man in neuerer Zeit dazu übergegangen, statt mit durch Chemikalien abgeschwächten Giften die Grundimmunität zu erzeugen, Toxin-Antitoxingemische mit unausgeglichenem Giftrest zu verwenden. An Stelle eines solchen Gemisches kann man die Behandlung nach demselben Prinzip durchführen, indem man den Pferden zuerst das Serum injiziert und nach 18 bis 24 Stunden die Toxinmenge einverleibt. Nach einigen Injektionen, die alle zwei bis drei Tage gemacht werden können, wird dann kein Serum mehr gegeben und man beginnt mit Toxin allein den Serumtiter in die Höhe zu treiben.

Die Reaktionen, welche auf die Einverleibung des Giftes folgen, sind im vorhergehenden mitgeschildert. Sie müssen immer völlig abgeklungen sein, bevor die Behandlung weiter fortgesetzt wird.

Zeitpunkt der Blutentnahme.

Ehrlich und Brieger haben durch zahlreiche Messungen des Antitoxingehaltes der Milch einer immunisierten Ziege zeigen können, daß der Antikörpergehalt sehr schwankend ist. Sie fanden nach einer neuen Injektion, daß zunächst der Antitoxingehalt von 4000 Antitoxineinheiten auf 1000 herabsank, dann eine Zeitlang gleich blieb, um am fünften Tage zu steigen und am 17. Tage sein Maximum von 9000 Antitoxineinheiten zu erreichen. Darauf trat ein langsamer Abfall des Wertes ein, der am 29. Tage sein Ende erreichte und 4000 Antitoxineinheiten betrug. Dieser Wert blieb nun wochenlang unverändert. Demnach ist die günstigste Zeit zur Entnahme von Blut zwecks Gewinnung des Tetanusserums der 17. oder 18. Tag nach der letzten Injektion.

Wertbemessung des Serums.

Auch für das Tetanusserum besteht eine amtliche Prüfungsvorschrift, die sich eng an die v. Behringsche Methode anschließt. Nach v. Behring ist ein Normalgift ein Toxin, das durch eine Antitoxineinheit neutralisiert wird, wie sie in 1 ccm „einfach normalen Serums“ enthalten ist. 1 A.-E. = Antitoxineinheit ist in jener Menge eines Serums enthalten, welche eine Maus von 10 g gegen die 4000 000-fache letale Dosis frischen Toxins bei subkutaner Injektion schützt. v. Behring rechnet stets mit $\frac{1}{1000}$ A.-E. Zum Austitrieren eines Tetanusserums geht man in der Praxis folgendermaßen vor: Es werden von dem zu prüfenden Serum verschiedene Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung angelegt, z. B. 1:100, 1:90 usw. In ein Erlenmeyerkölbchen mißt man nun 38 ccm destillierten Wassers und gibt 1 ccm einer Serumverdünnung und 1 ccm des Prüfungsgiftes (z. B. $\frac{1}{10}$ Behringschen Normalgiftes) hinzu. Durch Umschütteln wird die Mischung gleichmäßig verteilt und 30 Minuten vor Licht geschützt stehen gelassen. Eine Maus von mittlerem Gewicht erhält 0,4 ccm der Mischung subkutan. Bleibt die Maus der Serumverdünnung 1:100 ganz gesund, so besitzt das Serum in 1 ccm mindestens 10 A.-E., da 1 ccm der Verdünnung 1:100 1 ccm des $\frac{1}{10}$ -Normalgiftes völlig neutralisiert hat. Wird die Maus leicht tetanisch, so enthält das Serum natürlich weniger als 10 A.-E. Stirbt die Maus nach einigen Tagen und treten bei anderen tetanische Erscheinungen auf bis auf die, welcher man von der

mit der Antitoxinverdünnung 1:70 hergestellten Giftserummischung injiziert hat, so ist noch eine Serumverdünnung 1:60 und 1:75 zu prüfen. Auf diese Weise wird der genaue Antitoxingehalt des Serums bestimmt, d. h. die Ermittlung der Mischung, bei der die Maus nach Injektion von 0,4 ccm ganz gesund bleibt, beendet. Wir kennen nun den L_0 -Wert des Serums und können danach den Antitoxingehalt berechnen. Diejenige Serumdosis, welche in 0,4 ccm Flüssigkeit mit 0,01 ccm des gewählten Testgiftes ($1/10$ -Normalgiftes) L_0 gibt, ist genau $1/1000$ A.-E.

Die Wertbemessung beruht also auf denselben Prinzipien wie die des Diphtherieheilserums, es wurde auch hier die Mischmethode eingeführt, jedoch mit der von Ehrlich angegebenen Abänderung, daß das Gemisch $3/4$ Stunden lang bei 37° aufbewahrt wird, um bei der geringeren Avidität des Tetanustoxins zu seinem Antitoxin ihre Vereinigung *in vitro* zu beschleunigen. Eine weitere Erschwerung der praktischen Durchführbarkeit der Methode war bedingt durch die außerordentliche Labilität des Tetanusgiftes. Diese leichte Veränderlichkeit hat schon v. Behring veranlaßt, ein durch Aussalzen gewonnenes festes Gift zu verwenden. Jetzt wird mit gutem Erfolg die Ehrlichsche Serumkonservierungsmethode auch für das Testgift angewandt. Das Testgift muß völlig sporenfrei sein, was durch wiederholtes Aussalzen, Wiederauflösen und Zentrifugieren der Giftlösung gelingt. Das Gift wird nun nach Art des Diphtherie-Standardserums behandelt und in zugeschmolzenen evakuierten Röhrchen aufbewahrt und bleibt so außerordentlich beständig. Die Menge des in jedes Röhrchen einzufüllenden Giftes richtet sich nach den gefundenen Giftwerten des Toxins. Im Frankfurter Institut sind die Werte so berechnet, daß 25 ccm Wasser gebraucht werden zur Herstellung der Normaltestgiftlösung aus den mit 0,5 einer Giftlösung 1:2 beschickten Röhrchen. Auch das Tetanus-Standardserum wird in Einzelprüfungsdosen evakuiert vorrätig gehalten, jetzt z. B. 0,006 g eines 43,33 fachen Serums = 0,26 A.-E.

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

Nachdem je ein Gift- und Serumröhrchen vorsichtig durch Abfeilen geöffnet ist, wird mit einer graduierten Pipette eine bestimmte Menge (z. B. 5 ccm) Wasser in jedes Röhrchen gefüllt und die Röhrchen dann mit abgebrannten Korken sicher verschlossen.

Wenn sich dann das Gift und das Serum nach mehrmaligem Schütteln vollkommen gelöst haben, wird der Inhalt der Röhrchen mit dem Rest der zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsmengen sorgfältig nachgespült; nunmehr wird das zu prüfende Serum dem von der Fabrik angegebenen Titer entsprechend so verdünnt, daß in 1 ccm der Verdünnung genau $\frac{1}{100}$ A.-E. enthalten sein müßte. Nachdem dies geschehen ist, erfolgt die Ansetzung der Giftserumgemische *in vitro*. Hierzu sind zwei Reihen (zu acht Fläschchen) erforderlich. In die Fläschchen der ersten Reihe kommt je 1 ccm Standardserumlösung, in die zweite Reihe je 1 ccm der von dem zu prüfenden Serum hergestellten Lösung. Zu jeder Reihe gibt man fallende Dosen Gift, und zwar beim Frankfurter Testgift Dosen von 0,8 bis 1,5 ccm. Diese Dosen sind so gewählt, daß voraussichtlich alle Werte von L_0 bis L_{\dagger} getroffen sind. Dann werden die Gemische mit Wasser auf 4,0 ccm aufgefüllt. Die gut verkorkten Fläschchen bleiben nunmehr eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur, geschützt gegen das Tageslicht durch Deckung mit Blechhülsen, stehen. Nach dieser Zeit erfolgt die Impfung der Tiere, und zwar benutzt man im Frankfurter Institut ausschließlich weiße Mäuse. Entsprechend den angesetzten Gemischen werden zwei Reihen zu acht Mäusen infiziert, und es erhält jede Maus 0,4 ccm eines der angesetzten Gemische subkutan unter die Haut des rechten Hinterfußes, also $\frac{1}{1000}$ A.-E. \dagger fallende Dosen Gift. Da die Gift Dosen, wie gesagt, so gewählt sind, daß bei der Standardreihe alle Werte von L_0 bis L_{\dagger} vorhanden sind, so können wir bei regelrechtem Verlauf der Versuchsreihen alle Phasen, Intaktbleiben, Krankheit und akuten Tod (wenigstens in der Standardreihe) verfolgen.

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

Die Wertbemessung des Tetanusserums ist demnach viel komplizierter als die des Diphtherieantitoxins. Entspricht daher die von seiten der Fabrik bei der Einsendung des Heilserums gemachte Titerangabe nicht den Untersuchungsergebnissen des Institutes, so wird das Serum nicht wie bei der Diphtherieserumprüfung direkt

zurückgewiesen, sondern zu dem gefundenen Titer zugelassen, vorausgesetzt, daß es den Mindestgehalt von 5 bzw. 50 A.-E. in 1 ccm flüssigem bzw. in 1 g Trockenserum hat. Die flüssigen Sera werden zwei Jahre, die trockenen zwei und vier Jahre nach der ersten Prüfung einer amtlichen Nachuntersuchung unterzogen. Nach drei Jahren werden die flüssigen Tetanussera ebenso wie die flüssigen Diphtherieheilsereen durch Ministerialerlaß aus dem Handel gezogen.

In Frankreich wird das Tetanusantitoxin nach der Methode von Roux an Meerschweinchen geprüft. Otto und Boehncke geben das Verfahren nach einer Mitteilung von Dr. Martin folgendermaßen an: Das durch Fällung mit Ammonsulfat erzielte Tetanustoxin wird getrocknet unter Luftabschluß aufbewahrt. Mit diesem Trockentoxin wird zunächst die *dosis minima mortalis* für Meerschweinchen von 250 bis 300 g bestimmt. Als Prüfungsdosis wird die 100-fach tödliche Dosis dieses Toxins verwendet. Was die Technik des Prüfungsversuches betrifft, so werden von dem zu prüfenden Serum zunächst drei Verdünnungen angelegt: $\frac{1}{10000}$, $\frac{1}{100000}$ und $\frac{1}{1000000}$. Vom Toxin wird eine bestimmte Menge in einer bestimmten Quantität Wasser unter mehrfachem Schütteln gelöst und danach steril filtriert. Zu jeder der drei Serumverdünnungen wird alsdann eine der 100-fach tödlichen Dosis entsprechende Menge der Toxinlösung hinzugefügt und das Gemisch nach halbstündiger Bindung einem Meerschweinchen intramuskulär injiziert. Das Antitoxin wird je nach dem Ausfall der Wertprüfung für den Gebrauch lediglich in der Veterinärpraxis oder bei höherem Wertgehalt für die Humanmedizin zugelassen. Für ersteren Zweck genügt es, wenn $\frac{1}{10000}$ bis $\frac{1}{100000}$ ccm 100 tödliche Dosen so vollständig absättigt, daß kein lokaler Tetanus entsteht. Für die Anwendung in der Medizin werden nur Sera zugelassen, die denselben Effekt noch in der Verdünnung von $\frac{1}{1000000}$ ausüben.

Das Tetanusserum ist ebenso wie das Diphtherieserum in die Pharmakopöe aufgenommen.

Deutsches Arzneibuch, V. Ausgabe.

Serum antitetanicum. — Tetanusheils Serum.

Blutserum von Pferden, die gegen das Tetanusgift immunisiert sind. Tetanusheils Serum darf nur in den Handel gebracht werden, nachdem es durch das Königlich Preußische Institut für experimen-

telle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Antitoxineinheiten (A.-E.), auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol oder Kresol) geprüft und zum Verkaufe zugelassen worden ist.

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

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

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

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

Festes Tetanusheilsersum ist getrocknetes Tetanusheilsersum, das keinerlei antiseptische oder sonstige differente Zusätze erhalten hat und in Vakuumröhrchen aufbewahrt wird. Es stellt gelbliche, mehr oder minder durchscheinende Plättchen oder ein gelblichweißes Pulver dar und muß sich innerhalb einer halben Stunde in 10 Tln. Wasser zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Tetanusheilsersum entsprechenden Flüssigkeit lösen. Die Lösung ist durch Zusatz von 10 Tln. sterilisiertem Wasser in einem sterilisierten Fläschchen vor der Abgabe jedesmal frisch zu bereiten; sie muß bis auf kleine Eiweißflockchen klar sein.

Vierfaches Tetanusheilsersum muß in 1 ccm mindestens 4 A.-E., in 1 g mindestens 40 A.-E. enthalten.

Sechsfaches Tetanusheilsersum muß in 1 ccm mindestens 6 A.-E., in 1 g mindestens 60 A.-E. enthalten.

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

Tetanusheilsersum kommt in sechs Füllungen in den Handel: Füllung I enthält 20 A.-E., entsprechend 5 ccm eines vierfachen flüssigen oder 0,5 g eines vierzigfachen festen Tetanusheilsersums;

Füllung II enthält 100 A.-E., entsprechend 25 ccm eines vierfachen flüssigen oder 2,5 g eines vierzigfachen festen Tetanusheilsersums;

Füllung III enthält 200 A.-E., entsprechend 50 ccm eines vierfachen flüssigen oder 5 g eines vierzigfachen festen Tetanusheilsersums;

Füllung IV enthält 400 A.-E., entsprechend 100 ccm eines vierfachen flüssigen oder 10 g eines vierzigfachen festen Tetanusheilsersums;

Füllung ID enthält 20 A.-E., entsprechend $3\frac{1}{3}$ ccm eines sechsfachen flüssigen oder $\frac{1}{3}$ g eines sechzigfachen festen Tetanusheilsersums oder verhältnismäßig geringeren Mengen eines mehr als sechsfachen flüssigen oder eines mehr als sechzigfachen festen Tetanusheilsersums;

Füllung IID enthält 100 A.-E., entsprechend $16\frac{2}{3}$ ccm eines sechsfachen flüssigen oder $1\frac{2}{3}$ g eines sechzigfachen festen Tetanusheilsersums oder verhältnismäßig geringeren Mengen eines mehr als sechsfachen flüssigen oder eines mehr als sechzigfachen festen Tetanusheilsersums.

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

Kühl, aber frostfrei und vor Licht geschützt aufzubewahren.

Eigenschaften.

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Tetanusantitoxins sind im wesentlichen die gleichen wie wir sie beim Diphtherieantitoxin kennen gelernt haben. Das Tetanusantitoxin ist an die Globulinfraktion des Serums gebunden, ist löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther. Dasselbe wird geschädigt durch Säure und Alkali, durch bei Säure verlaufende Pepsinverdauung, dagegen ist es wenig empfindlich gegen Trypsinverdauung (Pröscher). Im Vakuum kühl und dunkel aufbewahrt, behält das Serum jahrelang seine Wirksamkeit. v. Fedorow und Ikonikoff fanden in dieser

Weise aufbewahrtes Serum noch nach 15 Jahren in seiner spezifischen Wirksamkeit unverändert. Während Kälte das Tetanusantitoxin nicht beschädigt, wird es bei höheren Wärmegraden in flüssigem Zustande rasch zerstört (68° C), getrocknet verträgt es höhere Temperaturen (Camus). Durch Dialysiermembranen gehen nur ganz geringe Mengen durch (Brieger und Ehrlich, Wassermann). Enge Bakterienfilter halten das meiste Antitoxin zurück. (Siehe auch chemisch-physikalische Eigenschaften des Diphtherieantitoxins und allgemeine Eigenschaften der Antikörper.)

Zur Konzentrierung des Tetanusantitoxins sind im allgemeinen dieselben Methoden verwendet worden wie bei der Einengung des Diphtherieantitoxins (siehe dieses).

Die für praktische Zwecke brauchbarste Methode ist die von Brieger und Boer ausgearbeitete. Es ist eine kombinierte Natriumchlorid- und Chlorkalium- (oder Jodkalium-) Fällung, wobei das Antitoxin aus Serum und Milch quantitativ gewonnen wird. Die Ausbeute an Antitoxin ist proportional dem Antikörpergehalt des Serums.

10 ccm Serum (oder Milch) werden mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt und darin 4 g KCl (oder JK) gelöst. Die Flüssigkeit wird nunmehr mit 4 bis 5 g fein zerriebenen Natriumchlorids tüchtig durchgeschüttelt und bei 30 bis 37° stehen gelassen. Das Antitoxin fällt mit einem Teile des Eiweißes als unlöslicher Niederschlag aus und kann ohne Verlust mit Wasser ausgewaschen werden. An schwach alkalisches Wasser geben diese Niederschläge die Antikörper quantitativ ab. Die Ausbeute an wirksamer Substanz ist um so größer, je länger die Salze auf die Flüssigkeit eingewirkt haben. Es ist daher zweckmäßig, mit dem Auswaschen der Fällung so lange zu warten, bis die Reaktion ihren Höhepunkt erreicht hat (nach 18 bis 20 Stunden bei 37°). Darauf wird der Niederschlag über Ton abgesaugt, im Vakuum getrocknet, worauf die Salze durch Dialyse entfernt werden. Man erhält so aus 10 ccm Serum 0,4 g Trockensubstanz, welche neben reichlichen Eiweißmengen das Antitoxin quantitativ enthält. Zur weiteren Reinigung wird das Pulver in 10 ccm Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen fein gepulverten Magnesiumsulfats versetzt. Die Mischung bleibt 2 bis 3 Stunden im Brutschrank stehen und der Niederschlag wird bei 37° abfiltriert. Man wäscht denselben möglichst rasch mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung, da das

Antitoxin durch längeres Verweilen im Brutschrank an Wirksamkeit verliert. Nach neuerlicher Dialyse bleibt als Trockenrückstand ein Pulver von 0,2 g übrig. Aus 1 Liter Ausgangsmaterial erhält man nach dieser Methode etwa 1 g Pulver, welches in Wasser sehr leicht löslich ist. Um möglichst wenig Antitoxin zu verlieren, empfiehlt Ehrlich statt der Dialyse, den mit Magnesiumsulfat ausgewaschenen und gut getrockneten Niederschlag mit Chloroform zu schlemmen, Brieger und Boer schlagen vor, den Niederschlag zunächst mit einem Gemisch aus 3 Tln. Tetrachlorkohlenstoff und 1 Tl. Chloroform durchzuschütteln, wodurch die Klärung der Emulsion beschleunigt wird, was übrigens auch durch Zugießen von Chloroform erreicht wird. Die wirksamen Bestandteile sammeln sich an der Oberfläche und können abgeschöpft und mittels Filtration durch ein trockenes Filter zurückgehalten werden. Die Vorteile bei der Verwendung des Chloroforms statt der Dialyse zur Reinigung bestehen darin, daß man gleichzeitig steriles Material erzielt und daß der mit Chloroform behandelte Niederschlag, wenn derselbe vorher einigermaßen trocken war, nicht im Vakuum getrocknet werden braucht, da er sehr rasch von selbst trocknet. War Milch das Ausgangsmaterial, so wird durch die Behandlung mit Chloroform eine Entfettung erzielt.

Andere Methoden gewinnen das Antitoxin durch Paarung mit Metallsalzen. Das Antitoxin wird durch Paarung mit einem Metallsalz in eine stabile widerstandsfähige Doppelverbindung übergeführt, von der das Eiweiß leicht abgespült werden kann. Die Paarung muß, ohne das Antitoxin zu schädigen, wieder in ihre Komponenten zerlegt werden können. Brauchbar sind von Metallsalzen Zinksulfat, Zinkchlorid, Quecksilberchlorid und neutrales Bleiacetat. Die besten Resultate geben die Verfahren mit einem Zinksalze: 10 ccm Serum verdünnt man mit der fünffachen Menge Wasser und versetzt sie mit 20 ccm einer 1 proz. Zinksulfatlösung. Der Niederschlag wird nach kurzem Stehenlassen abfiltriert. Nachträgliche Trübungen im Filtrat enthalten keine Antitoxine. Die Fällung wird vorsichtig mit möglichst wenig Wasser, weil in viel Wasser löslich, ausgewaschen. Darauf löst man sie in schwach alkalischem Wasser und leitet CO_2 ein. Der Niederschlag mit dem Zinkpaarling wird im Exsikkator getrocknet und in Wasser gelöst, wobei nur die Zinkalbuminate in Lösung gehen. Das Zinkantitoxin kann abfiltriert und in schwach alkalischem Wasser oder

Kochsalzlösung aufgenommen werden. Der größte Teil des Zinks kann durch weiteres Einleiten von CO_2 entfernt und so der Antikörper aus seiner Zinkverbindung befreit werden.

Bei Benutzung von ZnCl_2 ist der Verlauf ungefähr derselbe, nur daß das Zinkchlorid-Antitoxin beim Einleiten von CO_2 in Lösung bleibt.

Auch das Sublimat fällt mit dem Eiweiß das Antitoxin quantitativ aus. Vor der Fällung mit HgCl_2 werden zu dem Tetanusserum geringe Mengen Kochsalz zugegeben, wodurch der Paarling in Lösung gehalten wird. Nach Filtration wird das Filtrat 24 Stunden dialysiert, im Vakuum zur Trockne verdampft und wieder gelöst. Das Endprodukt ist eine schwer lösliche amorphe Masse, welche noch sublimathaltig ist.

Eine weitere Methode ist die Paarung mit neutralem Bleiacetat. Bleiacetat, mit einer Spur Ammoniak in stark verdünnter Lösung zum Serum zugegeben, fällt die meisten Eiweißsubstanzen aus, während das Antitoxin in Lösung bleibt. Das Filtrat wird mit Ammonsulfat geschüttelt und nach Dialyse getrocknet. Aus 10 ccm Serum erhält man 0,06 g eines leicht löslichen Pulvers mit dem gesamten Antitoxin des Ausgangsmaterials. Bei Anwendung dieser Methode fällt erschwerend ins Gewicht, daß sich die Bleiverbindungen beim geringsten Überschuß der Reagenzien, vor allem des Ammoniaks, lösen.

Sames ließ sich in neuerer Zeit ein Verfahren patentieren, welches an eine Konzentrationsmethode des Diphtherieantitoxins anknüpft. Nach dieser¹⁾ wird aus Diphtherieserum mittels Aluminiumsalzen nur das Eiweiß, nicht dagegen nennenswerte Mengen von Antitoxin selbst, gefällt. Der dabei entstehende voluminöse gallertartige Niederschlag kann nur durch andauerndes Auswaschen erschöpft werden. Soll eine möglichst quantitative Ausbeute erzielt werden, so erhält man danach das Antitoxin in starker Verdünnung. Die Antitoxinlösungen werden durch Dialyse von den überschüssigen Aluminiumsalzen befreit.

Das neue Verfahren von Sames ermöglicht auf einfache Weise ohne weiteres, wenn auch nicht eiweißfreie, so doch eiweißarme, sterile und klare Antitoxinlösungen in technischem Umfange und in hoher Ausbeute zu gewinnen, obwohl dabei Mittel verwendet

¹⁾ Ztschr. f. Hyg. **31** (1899).

werden, von denen man eine Schädigung der Antitoxine hätte erwarten können. Um den erstrebten Zweck möglichst vollkommen zu erreichen, werden nach dem neuen Verfahren frische, un-konservierte oder doch von den Konservierungsmitteln, z. B. durch wiederholtes Ausschütteln mit Chloroform, wieder befreite und nicht geschwächte Ausgangsseren verwendet, die sich infolge Freiseins von Konservierungsmitteln erhitzen lassen, denn das Erwärmen der Seren bildet einen wesentlichen Teil der Erfindung, weil dadurch bei der Fällung nicht gallertartige Massen, sondern rasch zu Boden gehende, dickflockige, etwa vorhandene Keime niederreißende Niederschläge und daneben klare, durch die Wärme leicht steril zu haltende Antitoxinlösungen gebildet werden, die leicht z. B. durch Zentrifugieren voneinander praktisch quantitativ getrennt werden können.

Wesentlich ist außerdem bei dem Verfahren die Mitverwendung alkalisch wirkender Stoffe, indem bereits die Ausgangsseren zwecks Erzielung im wesentlichen antitoxinfreier Niederschläge auf geeignete Weise alkalisiert werden und auch nach der Fällung zu den Reaktionsgemischen erforderlichenfalls behufs Entfernung überschüssiger Metallsalze wiederum alkalisch wirkende Stoffe zugesetzt werden. Das neue Verfahren ist außerordentlich einfach, es verläuft ohne Dialyse unter den gebräuchlichen für steriles Arbeiten in Betracht kommenden Kautelen. Die danach erhältlichen klaren, eiweißarmen Flüssigkeiten können durch einfaches Eindampfen im Vakuum leicht konzentriert und in Trockenseren übergeführt werden.

Beispiel. 100 ccm achtfaches frischgewonnenes Tetanusserum aus Pferdeblut werden mit 150 ccm sterilem, destilliertem Wasser und 1 ccm 10 proz. Natriumcarbonatlösung, der etwa 1 Proz. Ammoniumcarbonat zugesetzt ist, versetzt und in einem in eine Zentrifuge passenden Glaszylinder 15 Minuten hindurch auf 50 bis 60° erwärmt. Dann werden tropfenweise 10 ccm essigsaure Tonerdelösung (Liqu. Alumin. acet. Merck) der alkalischen Flüssigkeit unter Umrühren zugesetzt, wobei ein dickflockiger, gut zu Boden gehender aus Aluminiumhydroxyd und Pferdeeiweiß bestehender Niederschlag ausfällt, den man vor dem Abgießen der nun antitoxinhaltigen sauren Flüssigkeit absitzen läßt, später aber abzentrifugiert und vernachlässigt. Die Flüssigkeit wird nunmehr mit dem bereits genannten Alkalisierungsmittel schwach alkalisch

gemacht und im Vakuum bei einer Temperatur von 40 bis 50° eingedampft. Auf 80 ccm konzentriert zeigte sich das aus dem achtfachen Tetanusserum hergestellte Präparat nach der chemischen Bestimmung von rund 50 Proz. des Pferdeeiweißes befreit. Es war nach Versuchen an weißen Mäusen von $7\frac{1}{2}$ -facher Stärke und von klarem, blankem Aussehen sowie vollkommen steril. Infolge des so stark geminderten Eiweißgehaltes ist ein weiteres Eindampfen im Vakuum behufs Erhöhung des Antitoxingehaltes erleichtert, auch die Darstellung von Trockenserum wird einfacher.

Konservierte Sera, die nicht mehr die ursprüngliche Zahl an Antitoxineinheiten besitzen, können nach dem neuen Verfahren wieder regeneriert und auch verstärkt werden.

Die Menge des Eiweißfällungsmittels ist den Seren und der Tierart, der sie entnommen sind, jeweils anzupassen, was durch Vorversuche leicht festgestellt werden kann.

Patentanspruch. Verfahren zur Herstellung eiweißarmer Heilseren, dadurch gekennzeichnet, daß frische oder von zugesetzten Konservierungsmitteln wieder befreite, mit Pferdeblut gewonnene Heilseren, nach Zusatz von Alkali unter Erwärmen vorsichtig mit nur solchen Mengen von unlöslichen Hydroxyd- und Eiweißniederschläge liefernden Metallsalzen, z. B. Aluminiumsalzen, versetzt werden, daß die entstehenden Niederschläge im wesentlichen antitoxinfrei bleiben, worauf in den Lösungen etwa dann überschüssige Aluminiumsalze durch Zusetzen von geeigneten Alkalien, z. B. von Alkali und Ammoniumcarbonat, zwecks Abscheidung unlöslicher Aluminiumverbindungen zersetzt werden.

Literatur: Babes, Bull. de l'acad. méd. 1895. Behring, Ztschr. f. Hyg. 1892; Deutsche med. Wochenschr. 1900; ebenda 1903; Deutsche Klinik von Leyden und Klemperer 1901; Beiträge zur experim. Therapie 1, 3, 7; Fortschritte der Medizin 1899. Behring und Knorr, Ztschr. f. Hyg. 1893. Behring und Ransom, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Brieger, Ztschr. f. Hyg. 1895. Brieger und Boer, ebenda 1896. Brieger und Cohn, ebenda 1898. Brieger und Ehrlich, ebenda. Brieger, Kitasato und Wassermann, ebenda 12. v. Eisler und Pribram, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 2, (1909). Ehrlich siehe Brieger. Kitasato, Ztschr. f. Hyg. 1892. Knorr, Fortschritte der Medizin 1897. Derselbe, Münch. med. Wochenschr. 1898. v. Lingelsheim, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Marx, Festschrift für Koch, 1903. Otto und Boehneke, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Pröschner, Münch. med. Wochenschr. 1902. Patentanspruch (K 30) Nr. 13757 (1902). Ransom,

Berl. klin. Wochenschr. 1901. Derselbe, Ztschr. f. physiol. Chemie 1900. Roux und Martin, Ann. de l'Institut Pasteur 1894. Sames, Patentanspruch, Nr. 268 223, Kl. 30h, 1913. Vaillard, ebenda 1892. v. Wassermann, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913.

Typhusserum¹⁾.

a) Das Typhustoxin (Endotoxin).

Die Gifte der Typhusbazillen lassen sich auf zwei Arten gewinnen. Die ältere Methode besteht darin, die endogenen Gifte, d. h. die in der Leibessubstanz der Bakterien befindlichen giftigen Stoffe darzustellen. Hahn zerstörte die Typhusbazillen mittels Druck unter Anwendung der Buchnerschen Presse. Die Bakterienmasse (aus Agarkulturen gewonnen) wird mit Quarzsand und Kieselgur zerrieben und bis zu Teigkonsistenz mit Wasser, 20 proz. Glycerinlösung oder physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die teigige Masse wird in Preßtuch gepackt und in der hydraulischen Presse bis zu 500 Atm. ausgepreßt. Der Preßsaft, Typhoplasmin, wird durch Filtration geklärt und mit Chloroformzusatz aufbewahrt. Diese Substanz rief bei Meerschweinchen nach Impfung in die Bauchhöhle lediglich Temperatursteigerung hervor.

Macfadyen gewann die in der Bakterienzelle befindlichen Gifte dadurch, daß er die Typhusbazillen bei der Temperatur der flüssigen Luft zerrieb. Das Produkt wird in 1 Promille Kalilauge aufgenommen und zwei Stunden zentrifugiert. Er stellte sich dadurch einen 10 proz. Extrakt von Typhuszellsaft her, der während einer halben Stunde mit Chloroformdampf behandelt wurde. Der jetzt sterile Zellsaft erwies sich für Ziegen und Kaninchen bei intravenöser Einspritzung akut toxisch. Wegen der großen Veränderlichkeit dieses Endotoxins mußte Macfadyen stets frische Präparate verwenden.

Besredka stellte seine Typhuszellgifte in der Weise her, daß er 16- bis 18-stündige Agarkultur in 0,75 proz. Kochsalzlösung aufschwemmte, eine Stunde auf 60° erhitze und dann im Vakuum zur Trockne verdampfte (Endotoxin Solid). Die getrockneten Bakterien werden im Verhältnis von 1 g Trockensubstanz auf 0,3 bis 0,45 g Kochsalz im Achatmörser eine Stunde lang fein zerrieben. Dann wird allmählich 1 bis 2 ccm destilliertes Wasser

¹⁾ Siehe Anmerkung unter Choleraserum (S. 117).

hinzugefügt, die Emulsion in ein Röhrchen gegossen, wo eine weitere Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgt. Diese Aufschwemmung wird während zwei Stunden im Wasserbad auf 60 bis 62° erwärmt und bleibt weitere 10 bis 12 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Dabei sinken die Bakterien zu Boden, die darüberstehende durchscheinende und opaleszierende Flüssigkeit enthält die Endotoxine in Lösung. Bei Eisschrank- und Zimmertemperatur wird die Lösung trübe, bei höherer Temperatur (namentlich im Autoklaven bei 127°) wird sie wieder transparent.

Außerdem gewann Besredka das Zellgift der Typhusbazillen durch Mischung der im Vakuum getrockneten Bakterien mit physiologischer Kochsalzlösung und normalem Pferdeserum (0,15 g Bazillen: 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung + 8 ccm Pferdeserum). Die Typhusbazillen agglutinieren und werden nach 1½ bis 2 Stunden abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit (Endotoxin liquid) erwies sich als stark toxisch. Der Toxingehalt war allerdings von verschiedener Größe.

Die von Besredka gewonnenen Endotoxine waren für das Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen, die Ratte und Maus bei intravenöser bzw. intraperitonealer Einverleibung giftig. Z. B. tötete 1 ccm der Flüssigkeit (1 g Trockensubstanz + 0,3 g Kochsalz + 30 ccm H₂O) intraperitoneal 250 g schwere Meerschweinchen.

Von zahlreichen anderen Autoren wurden Versuche gemacht, das Gift aus den Typhusbazillen durch Autolyse zu gewinnen. So konnte Conradi aus 20-stündigen Agarkulturaufschwemmungen mit physiologischer Kochsalzlösung nach einem Aufenthalt von 24 bis 48 Stunden im Brutschrank für Meerschweinchen toxische Stoffe gewinnen. Die obere Schicht der Emulsion, welche das Gift enthielt, wurde mit der Pipette abgesogen, mit der fünffachen Menge 0,85proz. NaCl-Lösung verdünnt und durch Berkefeldkerzen filtriert. Das Filtrat wurde auf 1/10 bis 1/50 seines Volumens eingedampft. 0,2 ccm davon stellten für Meerschweinchen von 300 g die innerhalb 24 Stunden tötende Dosis dar. Als Nährboden benutzte Conradi 3proz. Fleischwasseragar mit Zusatz von 1 Proz. Tropon.

Ebenso gelang es Hahn durch Autolyse aus Typhusbazillen Gifte darzustellen. Er spülte Massenkulturen nach 24-stündigem Wachstum mit einem Darmpreßsaft, aus normalen menschlichen

Dünndarmstücken gewonnen, ab. Die Aufschwemmung wurde bei 36 bis 37° verschieden lange digeriert. Nach beendeter Digestion hebte Hahn die überstehende Flüssigkeit ab und sterilisierte sie durch Berkefeldfiltration. Auf diese Weise gewann er Filtrate, welche in Dosen von 0,6 ccm 200 g schwere Meerschweinchen in 12 bis 20 Stunden töteten. Die gleichen Gifte erhielt er durch Autolyse der Bakterien mit Kochsalzlösung.

Chantemesse gelang es zuerst in Bouillonkulturfiltraten die Typhusgifte nachzuweisen. Anfangs machte er zu seiner Bouillon einen Zusatz eines Mazerates von frischer Leber, Knochenmark und geringer Menge defibrinierten Menschenblutes. Nach fünf- bis sechstägigem Wachstum in dieser Bouillon erwiesen sich die Filtrate giftig. Später verwandte er zur Kultur eine Lösung von Pepton, welches er durch Pepsinverdauung aus Milz darstellte. Die Bouillonfiltrate hatten giftige Eigenschaften für Frosch, Maus Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege, Hund und Pferd.

Ebenso konnte Moreschi in fünf- bis sechstägigen Kulturfiltraten einer besonderen Bouillon Gifte nachweisen. Die Bouillon war in folgender Weise dargestellt: 1 kg Pferdefleisch und 1 kg Ochsenmilz wurden 24 Stunden mit 1 Liter Wasser bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann gekocht und filtriert. Darauf setzt man 2 Proz. Pepton Witte, 1 Proz. Plasmon, 0,5 Proz. Na-Cl und 8 Proz. Ochsenblut zu, kocht 20 Minuten im Dampftopf, alkalisiert mit Natronlauge im Verhältnis von 0,15 Proz., kocht nochmals im Autoklaven und filtriert.

Kraus und v. Stenitzer verwandten zur Kultur der Typhusbazillen Rindfleischbouillon, welche in verschiedener Weise alkalisiert war. Sie machen darauf aufmerksam, daß nicht alle Typhusstämmen toxisch sind. Nach ihren bisherigen Untersuchungen eignet sich zur Kultur am besten Diphtheriebouillon. Der günstigste Zeitpunkt für die Giftgewinnung liegt nach Angabe der genannten Autoren um den neunten Tag herum. Wegen zu großer Giftverluste wurde die Filtration durch Reichelkerzen aufgegeben und die carbolisierten Bouillonkulturen bis zur vollkommenen Klarheit nur durch Papier filtriert.

Von wirksamen Filtraten genügten 0,5 ccm, um ein Kaninchen von 800 g bei intravenöser Applikation innerhalb 24 Stunden zu töten. Kraus und v. Stenitzer empfehlen nur die intravenöse

Impfung des Typhustoxins, da es bei Einspritzung in die Bauchhöhle von unsicherer Wirkung ist.

In neuerer Zeit konnte Aronson unter Verwendung von Oberflächenkulturen stark wirksame Gifte aus den Bouillonkulturen gewinnen. Er konnte auch die Gifte mit Ammonsulfat fällen und so ein trockenes Typhustoxin darstellen. Aronson macht auf die besondere Empfänglichkeit der Pferde für das Toxin aufmerksam. Die besondere Empfindlichkeit des Pferdes wird auch von Chantemesse und Besredka angegeben.

Das Typhustoxin erweist sich ferner als toxisch für Ziegen, Kaninchen, Hund und Frosch. Über die Empfänglichkeit der Meer-schweinchen und Mäuse gehen die Meinungen auseinander.

Besondere charakteristische Merkmale zeigen die Tiere nicht. Die intravenös gespritzten Kaninchen gehen gewöhnlich in drei bis vier Stunden zugrunde. Der Tod kann jedoch auch nach 24 Stunden und später eintreten. Am konstantesten sind folgende Symptome zu beobachten. Das Auftreten von heftigen Diarrhöen und eine kurz vor dem Tode auftretende Lähmung der Hinterbeine. Bei akut wirkenden Giftmengen findet man regelmäßig bereits nach einer Stunde einen Abfall der Temperatur unter die Norm. Weniger schnell wirkende Dosen bedingen zunächst eine Temperatursteigerung, der ein Abfall bis unter 30° folgt.

Chantemesse, der die Eigenschaften seines Toxins genauer untersucht hat, fand, daß es Blutdruck senkend, Zirkulation und Respiration beschleunigend beim Hunde wirkt. Auf Grund seiner Versuche am Frosch führt er die Muskel lähmende Wirkung des Giftes auf eine Veränderung der nervösen Zentren zurück.

Die Typhustoxine sind nach übereinstimmender Angabe der Forscher sehr labil. Auch bei der Aufbewahrung während weniger Tage im flüssigen Zustand wird es erheblich abgeschwächt. Bei längerer Aufbewahrung, gleichgültig unter welchen Vorsichtsmaßregeln, wird das Gift bald völlig unwirksam.

Eine bemerkenswerte Widerstandsfähigkeit zeigt das Gift gegenüber höheren Temperaturen. Nach Besredka wird es erst völlig zerstört, wenn es 15 Stunden auf 57° erhitzt wird, es verträgt auch eine Temperatur von 127° im Dampftopf während einer halben Stunde. Auch Aronson fand, daß das Typhusgift auf 100° erhitzt werden konnte, ohne erheblich an Wirksamkeit einzubüßen.

Durch Ansäuern mit Weinsäure konnte Chantemesse das Toxin unwirksam machen. Durch Neutralisation mit Soda konnte es wieder regeneriert werden.

Entgegen der Meinung der genannten Autoren, daß die Typhusbazillen in den Bouillonkulturen ein lösliches Gift produzieren, sind andere Autoren, namentlich Pfeiffer, der Ansicht, daß es sich bei den giftigen Substanzen der Typhusbakterien um strenge Endotoxine, d. h. der Bakterienzelle als solcher anhaftende Gifte handelt.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Bassenge und Mayer, Zentralbl. f. Bakt. 1904. Bergell und Meyer, Med. Klinik 1906. Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905 u. 1906. Brieger, Deutsche med. Wochenschr. 1902. Brieger und Mayer, ebenda 1904. Brieger und Wassermann, Charité Ann. 1892. Chantemesse, Soc. de Biolog. 1897. Derselbe, Internationaler Kongreß f. Hyg. u. Demographie, Berlin 1907. Kraus und v. Stenitzer, Ztschr. f. Immunitätsforsch. **3**. Levy und Blumenthal, Med. Klinik 1906. Lentz, Kolle v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Macfadyen und Sydney, Zentralbl. f. Bakt. **30** (1901). Macfadyen, ebenda 1906. Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Pfeiffer, ebenda 1894. Pfeiffer und Kolle, Ztschr. f. Hyg. 1896. Schütze, Deutsche med. Wochenschr. 1902. v. Stenitzer, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **1** (1908).

b) Das Typhusantitoxin (Antiendotoxin).

Zur Herstellung des Typhusserums kommen praktisch nur große Tiere (Pferde, Ziegen und Schafe) in Betracht. Alle Versuchstiere sind sehr empfindlich für wiederholte Zufuhr der Typhusgifte und daher schwer zu immunisieren. Jüngere Tiere erweisen sich weniger widerstandsfähig als ältere. Bei der Auswahl der serumliefernden Tiere ist auf gesunde Gliedmaßen zu achten, da chronisch erkrankte Sehnenscheiden und Gelenke besonders schnell affiziert werden.

Die Einverleibung der Giftstoffe geschieht subkutan (Macfadyen) oder intravenös (Aronson, Besredka, Rodet-Lagriffoul). Chantemesse injiziert abwechselnd subkutan und intravenös.

Von den einzelnen Autoren werden auch verschiedene Präparate zur Immunisierung empfohlen. Chantemesse benutzt dazu siebentägige Milzbouillonkultur, welche nach Erwärmung auf 55° zentrifugiert wurde. Macfadyen schließt die Typhusbazillen auf und verwendet den Zellsaft, der aus den bei der Temperatur

der flüssigen Luft zerriebenen Bazillen mit 1 Promille Kalilauge aufgenommen wird. Rodet und Lagriffoul, sowie Besredka verwenden Agarkulturaufschwemmungen. Kraus und v. Stenitzer behandeln ihre Serumtiere mit Bouillonkulturfiltraten und Agarbazillenextrakten. Der Bazillenextrakt wird aus 24-stündigen Kulturen bereitet: Eine Agarflaschenkultur wird mit 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung ab gespült und 0,25 ccm Normal-K₂CO₃-Lösung zugesetzt. Die Emulsion bleibt carbolisiert 24 Stunden stehen und wird dann scharf zentrifugiert, eventuell durch Papier filtriert. Kraus und v. Stenitzer geben von diesem Extrakt als Anfangsdosis 0,1 bis 0,2 ccm in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung intravenös. Meyer-Bergell gewinnen ihr Serum, indem sie zunächst native, dann durch Behandlung der Bakterien mit flüssiger Salzsäure bei niederer Temperatur gewonnene Endotoxine, später Bouillonfiltrate einspritzen. Aronson verwendet Bouillonkulturfiltrate. Er erzielt ein besonders gutes Gift durch Züchtung der Typhusbazillen als Oberflächenkultur. Die Immunisierung beginnt Aronson mit Bouillonfiltrat, das durch Jodtrichlorid abgeschwächt ist.

Im allgemeinen wird man die Immunisierung zur Gewinnung des Typhusantitoxins (Antiendotoxins) in der Weise vornehmen, daß man mit kleinsten Dosen beginnt und dann allmählich nach Abklungensein der Reaktion zu immer höheren Dosen übergeht. Die Immunisierung gelingt rascher, wenn zu den ersten Injektionen abgeschwächtes Gift Verwendung gefunden hat, weil man auf diese Weise schneller zu höheren Dosen kommt. Die Abschwächung kann vorgenommen werden durch Erhitzung oder durch Zusatz von abgestuften Mengen von Jodtrichlorid. Die Bouillonfiltrate werden eine Stunde auf 60 bis 70° erwärmt. Dann gibt man zuerst 10 ccm intravenös, dann 15 ccm, 20, 25, 50 ccm; jetzt fängt die Behandlung mit vollvirulentem Material an. Die Dosierung kann in gleicher Weise eingehalten werden, so daß man während einer mehrere Monate dauernden Behandlung auf Gaben von 400 bis 500 ccm Bouillonkulturfiltrat kommt. Die Pausen, die man zwischen den einzelnen Einspritzungen eintreten lassen muß, lassen sich schwer schematisch festlegen. Man darf nur eine frische Injektion folgen lassen, wenn sich die Tiere wieder völlig erholt und einigermäßen ihr Körpergewicht wiedererlangt haben. In der Regel wird man in Zwischenzeiten von einer, zwei, drei bis fünf

Wochen die Injektionen wiederholen können. Öfter ist man auch gezwungen, anstatt die Dosis zu steigern, damit bei der neuen Injektion herunterzugehen. Über eine bestimmte Giftmenge läßt sich den Tieren selten intravenös einverleiben, weil sie sonst akut zugrunde gehen.

Bequemer als die intravenöse Injektionsweise ist die subkutane, da sie schonender für die Tiere ist und die Einverleibung ganz großer Giftmengen gestattet. Aber trotz monatelanger Immunisierung bekommt man kein so gutes Serum wie bei der intravenösen Behandlungsart. Auch läßt sich der Titer des Serums trotz Weiterbehandlung nicht über eine gewisse Höhe treiben. Die Gewinnung des Typhusserums ist jedenfalls sehr schwierig und langwierig.

Die Reaktionen auf die Einverleibung des Giftes sind selbst bei der subkutanen Applikation beträchtliche. Lokal treten an der Injektionsstelle mehr oder minder große Infiltrationen auf, die jedoch bald zurückgebildet werden. Die Allgemeinerscheinungen bestehen in Fieber, Niedergeschlagenheit und Freßunlust. Die Krankheitssymptome können mehrere Tage bestehen bleiben. Bei der intravenösen Giftapplikation sind die Erscheinungen viel heftiger und können wochenlang anhalten. Dazu kommen noch unmittelbar nach der Injektion Schüttelfrost, Kolikschmerzen, sehr hohes Fieber oder zuweilen subnormale Temperatur, einige Tage nachher Gelenkschwellungen und nässende Ekzeme mit Haar- ausfall.

Kraus und v. Stenitzer machten zuerst darauf aufmerksam, daß Ziegen bei der dritten oder wiederholten intravenösen Injektion selbst der gleichen oder doch nur doppelten Giftmenge (Agarbazillenextrakte) in 8- bis 14-tägigen Intervallen sofort nach der Injektion schwere, bisweilen akut innerhalb zehn Stunden zu Tode führende Vergiftungserscheinungen darboten (Anaphylaxie). Schon wenige Minuten nach der Injektion traten schwerste Dyspnöe und Kollaps auf, von dem sich manche Tiere nach tagelanger schwerer Krankheit erholten.

Der Aderlaß wird 8 bis 14 Tage nach der letzten Injektion ausgeführt und das Serum in üblicher Weise gewonnen.

Zur Titrierung des Typhusserums werden Kaninchen und Meerschweinchen verwendet. Aronson injiziert zuerst das Serum und 24 Stunden später das Gift intravenös oder er gibt Toxin-

Antitoxingemische, die zur besseren Bindung mehrere Stunden im Brutschrank verweilt haben. Das von Pferden und Ziegen gewonnene Typhusantitoxin v. Stenitzers neutralisierte in Dosen von 0,5 ccm die $1\frac{1}{2}$ -fache tödliche Dosis. v. Stenitzer ist es bei den Serumprüfungen wiederholt aufgefallen, daß ihr Serum, wie dies Aronson schon von seinem erwähnte, nur bei präventiver Impfung schützte.

Ein Serum von Chantemesse wirkte bei Meerschweinchen in Mengen von $\frac{1}{50}$ ccm präventiv und in solchen von $\frac{1}{4}$ bis 4 ccm kurativ gegen die dosis letalis. 1000 bis 1200 g schwere Kaninchen wurden durch vorherige Einspritzung von $\frac{1}{20}$ bis $\frac{1}{30}$ ccm Serum gegen die letale Dosis Typhusbouillonfiltrat geschützt.

Besredkas antiendotoxisches Serum neutralisiert in Mengen von 0,5 bis 1,0 bis 2,0 ccm 5 bis 10 bis 12 tödliche Dosen Endotoxin für Meerschweine. Sein Serum hatte auch präventiven und kurativen Wert. 2 ccm Typhusserum hatten eine deutliche Heilwirkung gegen die zwei Stunden vorher intraperitoneal injizierte tödliche Endotoxindosis.

Auch Macfadyen erzeugte ein Ziegenserum von Heilwirkung; $\frac{3}{4}$ Stunden nach der Einverleibung von fünf tödlichen Dosen genügten 2 ccm des antiendotoxischen Serums zur Rettung des Tieres. Weiter prüfte er den Wert des Serums durch den Mischversuch und bei gleichzeitiger getrennter intravenöser Applikation des Giftes und des Antiendotoxins. Bei letzterer Prüfungsart war 1 ccm imstande die fünffache, bei ersterer $\frac{1}{50}$ ccm die 30-fache letale Endotoxindosis unschädlich zu machen.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Bassenge, Deutsche med. Wochenschr. 1908. Chantemesse, Presse médicale 1902. Derselbe, Hygienischer Kongreß, Berlin 1907. Lentz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Macfadyen, Naturforscherversammlung, Kassel 1903. Meyer und Bergell, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Kraus und v. Stenitzer, Wiener klin. Wochenschr. 1907 u. 1908. v. Stenitzer, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 2 (1909).

Anmerkung: In derselben Weise, wie Typhusserum gewonnen wird, lassen sich auch Seren gegen die Erreger der Kälberruhr (Coli, Paracoli, Paratyphus A und B) und des Ferkeltyphus (zur Paratyphusgruppe gehörend) herstellen.

Das Kälberruhrserum wird an Meerschweinchen geprüft. Das Serum wird entweder drei bis fünf Stunden vorher oder gleichzeitig mit der Kultur eingespritzt. Die sicher tödliche Dosis beträgt je nach dem Typus $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{5}$ Öse einer 24-stündigen Agarkultur.

2. Antiinfektiöse Sera¹⁾.

Gefügelcholeraserum.

Zur Herstellung im großen eignen sich Pferd und Esel.

Nach Kitt ist die beste Applikationsweise der Hühnercholera-bakterien zur Immunisierung von Pferden die subkutane. Er behandelte die Pferde zunächst mit Serum, sodann in Zwischenräumen von vier bis acht Tagen mit ein- bis dreitägigen Bouillonkulturen und Agarkulturaufschwemmungen. Die injizierten Mengen betragen 0,5 bis 10 ccm, einige Male auch bis zu 17 ccm virulenter Kultur. Ein Pferd lieferte bereits nach vierwöchiger Behandlung mit insgesamt 14,5 ccm Hühnercholera Bazillen ein so wirksames Serum, daß es Kaninchen, Tauben, Enten und Hühner in Dosen von 1 bis 5 ccm gegen eine 24 Stunden später, zum Teil auch sofort vorgenommene Kontrollimpfung schützte, der die Kontrolltiere in einem bis vier Tagen erlagen.

Ein hochwertiges Serum gewann auch Hertel von einem Esel, dem er zuerst abgetötete, darauf lebende Kulturen in wiederholten Injektionen während etwa zwei Monaten intravenös injiziert hatte. Das Serum schützte Tauben bei gleichzeitiger örtlich getrennter Injektion von 0,5 ccm Serum und 0,001 ccm Kultur, der 10 000-fachen dosis letalis.

Lignièrès und Spitz gingen so vor, daß sie verschiedene Varietäten von Septikämiebazillen züchteten und die Mischkulturen zuerst subkutan und später intravenös in ansteigenden Dosen von 5 bis 20 ccm an Pferde verimpften.

Klett und Braun hatten zuerst Pferde mit vier Tage alten höchst virulenten Bakterienkulturen subkutan behandelt. Sie begannen mit Dosen von 0,25 ccm und stiegen langsam bis zu 14 bis 20 ccm. Mehr als 20 ccm vertrugen die Pferde subkutan nicht. Erst als sie zur intravenösen Einverleibungsart übergingen, konnten sie die Kulturmengen anstandslos erhöhen. Sie halten die intravenöse Einverleibung der Bakterienkulturen für die geeignetste Art zur Herstellung eines hoch wirksamen Serums gegen Gefügelcholera. Die Verwendung verschiedener Hühnercholera stämme halten Klett und Braun nicht für nötig.

¹⁾ Hierzu rechne ich alle Sera, die hauptsächlich mit lebenden Erregern gewonnen werden.

Die Reaktion ist je nach der Art der Einverleibung der Kulturen eine allgemeine und lokale. Die allgemeine Reaktion auf die Einspritzungen unter die Haut besteht in mehr oder weniger hohem Fieber, Abgeschlagenheit und Diarrhöe. Lokal kommt es zu Schwellungen, die je nach der individuellen Disposition der Pferde verschieden stark sind. Die intravenöse Injektion kann septiko-pyämische Erkrankungen mit exitus letalis nach sich ziehen.

Außerdem treten Eiterungen an der Jugularis auf. Vereiternde Thrombosen mit ihren Folgen stören den Versuch (Schwierigkeit für die neuen Injektionen). Trotz wiederholter Behandlung gehen die Tiere häufig auf eine erneute Impfung ein oder im Verlaufe der intravenösen Immunisierung machen Lähmungen eine Weiterverwendung der Tiere unmöglich (Kitt).

Die Blutentziehung wird 10 bis 14 Tage nach der letzten Injektion ausgeführt. Bei geeigneter Weiterbehandlung können die serumliefernden Tiere lange zur Serumgewinnung benutzt werden.

Für die Wertbemessung sind Hühner, Enten und Tauben weniger gut brauchbar als Mäuse und Kaninchen wegen der wechselnden Empfänglichkeit. Klett und Braun prüfen ihr Hühnercholeraserum an grauen Mäusen. Ihr Serum hat einen Titer von 0,0015 bis 0,005. Die staatliche Eichung des Geflügelcholeraserums wird an weißen Mäusen vorgenommen. Zum Vergleich dient ein Testserum. Es werden abgestufte Mengen (0,005; 0,0075; 0,05; 0,015; 0,02; 0,03 ccm) in zwei Reihen 24 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,01 ccm virulenter Hühnercholera-kulturen subkutan injiziert (zwei Kontrollen). Die Beobachtungsdauer der Mäuse beträgt zehn Tage.

Literatur: Casper, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 2 (1909). Jess, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1900 u. 1901. Kitt, Deutsche Ztschr. f. Tiermedizin 1888. Derselbe, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Lignières und Spitz, Revue vétérinaire 1902. Schreiber, Berl. tierärztl. Wochenschrift 1899. Otto und Boehncke, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Hutyrá, Kolle - v. Wassermann, ebenda 1912.

Maul- und Klauenseucheserum.

Die Gewinnung eines wirksamen Serums gegen Maul- und Klauenseuche gelingt nach Loeffler von Pferden und Rindern.

Der Erreger der Maul- und Klauenseuche gehört zu den unsichtbaren und unkultivierbaren Mikroorganismen. Man ist daher gezwungen, Material (Lympe) von kranken Tieren zur Immunisierung zu benutzen, welches den Erreger beherbergt. Unter Fortzuchtung der Lympe von Ferkel zu Ferkel oder abwechselnd von Rind und Schwein war es Loeffler möglich, eine Lympe zu gewinnen, die eine ziemlich konstante Virulenz aufwies. Bei Benutzung von Pferden zur Herstellung eines Serums gegen Maul- und Klauenseuche beginnt Loeffler die Behandlung sofort mit der Einspritzung von 1 ccm Lympe. Unter allmählicher Steigerung der Dosis werden die Injektionen in bestimmten Intervallen wiederholt. Nach Immunisierung eines Pferdes mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, ja 100 ccm Lympe erhält man von diesem ein gut wirksames Serum.

Bei Verwendung von Rindern muß man zunächst eine Grundimmunität schaffen, oder man benutzt solche Rinder, welche die Maul- und Klauenseuche erfolgreich überstanden haben, und treibt dann langsam die Immunität in die Höhe. Zur Erzielung einer Grundimmunität spritzt man den Rindern am besten subkutan ein Serum-Lymphgemisch ein. Man kann dazu Serum von Rindern benutzen, welche durch Überstehen der Maul- und Klauenseuche eine Immunität erworben haben. Die subkutane Injektion wird besser vertragen als die intravenöse. Auch erlangen die subkutan behandelten Tiere eine bessere Immunität als die intravenös vorbehandelten Rinder. Nach drei bis vier Wochen erhalten die Rinder $\frac{1}{300}$ ccm virulenter Lympe. In Zwischenzeiten von etwa 10 bis 14 Tagen werden diesen Tieren dann $\frac{1}{100}$ und $\frac{1}{25}$ ccm virulenter Lympe einverleibt. Nach einer weiteren Injektion von $\frac{1}{10}$ ccm Lympe nach derselben Pause kann mit der Injektion größerer Lymphmengen fortgefahren werden. Die Fortsetzung der Behandlung der Rinder zur Erzeugung eines hochwertigen Serums wird sich dann ähnlich gestalten wie die Immunisierung von Pferden.

Eine Prüfung des Serums auf seine Wirksamkeit kann in der Weise vorgenommen werden, daß man die Prüfungstiere, der Billigkeit halber Ferkel, nach Einverleibung verschiedener Serumdosen entweder der natürlichen Infektion aussetzt durch Einbringen in einen Stall, in dem sich kranke Tiere befinden oder vor kurzem aufgehalten haben, oder durch Injektion infektiösen Materials.

Zu gleicher Zeit müssen auch Tiere ohne Serumvorbehandlung derselben Prüfung unterworfen werden.

Literatur: Casper, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Loeffler und Frosch, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Loeffler und Uhlenhuth, Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1900. Loeffler, Festschrift zum 60. Geburtstage von R. Koch, Jena 1903. Loeffler, Deutsche med. Wochenschr. 1905.

Meningokokkenserum.

Die Gewinnung des Meningokokkenserums im großen geschieht fast nur an Pferden, die in der verschiedensten Weise behandelt werden. Die Applikation der Meningokokken oder deren Extrakte und Kulturfiltrate erfolgt subkutan und intravenös. Sollen die Pferde intravenös immunisiert werden, so dürfen nur Tiere mit tadellosen Beinen angekauft werden.

Alle Autoren, welche ihr Verfahren bekanntgegeben haben, benutzen zur Herstellung eines polyvalenten Serums möglichst viele biologisch differente Stämme. Dopter verwendet noch neben typischen Meningokokken Stämme, die sich infolge ihres agglutinatorischen und kulturellen Verhaltens von den typischen unterscheiden.

Nach den Vorschriften von Kolle und Wassermann bzw. Wassermann und Leuchs werden die Meningokokkenserum im Institut für Infektionskrankheiten in Berlin und im Schweizer staatlichen Seruminstitut in Bern gewonnen. Eine Gruppe von Pferden erhält zuerst subkutan, dann intravenös in steigenden Dosen zunächst abgetötete, später lebende Agarkulturaufschwemmungen von biologisch möglichst verschiedenen Stämmen. Eine andere Gruppe wird in der gleichen Weise mit einem bestimmten Stamm immunisiert, welcher erfahrungsgemäß hochwertige Sera liefert. Einer dritten Pferdegruppe werden anfangs subkutan, dann intravenös Schüttelextrakte injiziert. Die Schüttelextrakte werden so hergestellt, daß eine 24-stündige Kultur in Kollischer Flasche mit 5,0 ccm Aqua destillata abgespült wird und 48 Stunden, eventuell vier bis fünf Tage im Dunkeln in einem Apparat geschüttelt wird. Die geschüttelte Emulsion wird sodann klar abzentrifugiert, abpipettiert, mit 0,5 Proz. Carbolsäure versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Diese Extrakte enthalten reichliche Mengen Leibessubstanz der Meningokokken und geben mit

spezifischem Serum Präzipitation. In frischem Zustande müssen sie Meerschweinchen von 150 g in Mengen von 0,1 bis 0,3 ccm akut töten. Durch Mischung der Sera der in drei Gruppen behandelten Pferde erhält man ein Serum, welches sowohl antiinfektiöse als auch antiendotoxische Fähigkeiten hat.

Kraus und Doerr und Kraus und Baecher stellen ein polyvalentes Serum dar lediglich unter Benutzung von Agarkulturextrakten, welche sich nicht wesentlich von denen von Kolle und Wassermann unterscheiden. Massenkulturen in Kolleschen Flaschen von 48 Stunden werden mit 10 ccm $\frac{1}{10}$ -Sodalösung abgeschwemmt, bleiben nach einem Phenolzusatz von 0,5 Proz. 24 Stunden im Eisschrank stehen und werden stets frisch bereitete verwendet. Die abzentrifugierte klare Flüssigkeit (Toxin) ist für Meerschweine unter 150 g in einer Dosis von 0,3 bis 0,5 ccm in 24 Stunden tödlich. Außer diesen giftigen Agarkulturextrakten wurden früher von Kraus und seinen Mitarbeitern noch Bouillonkulturfiltrate zur Immunisierung benutzt. Die Injektionen werden subkutan und intravenös unter allmählicher Steigerung der Dosis ausgeführt.

Bei der Herstellung von Jochmanns Meningokokkenserum kommt eine möglichst große Zahl verschiedener, echter, frisch aus Genickstarrefällen auf Aszitesagar gezüchteter Kulturen zur Verwendung, die anfangs auch subkutan, zuletzt nur intravenös eingespritzt wurden. Man beginnt die Behandlung mit einer Öse und wiederholt die Injektionen in Zwischenzeiten von acht Tagen unter Verdoppelung der vorhergegangenen Injektionsmenge bis zur Einzelgabe von drei Kolleschen Schalen. Im Anfang der Behandlung werden die Meningokokken durch Erhitzung auf 60° abgetötet, nach einigen Monaten lebende eingespritzt.

Das Genickstarreserum von Flexner und Jobling wird mit lebenden Bakterien gewonnen. Unter vorsichtiger Dosierung werden frische Kulturen zuerst subkutan, dann intravenös gegeben. In derselben Weise gewinnt Dopter das Pariser Serum, indem er nur lebende Kulturen anfangs subkutan, später intravenös den Pferden einverleibt. Die Einspritzung von Extrakten hält Dopter für überflüssig, weil die Meningokokken kein echtes Toxin produzieren und die Endotoxine in den Phagozyten aus den Bakterienleibern freigemacht werden und so Veranlassung zur Bildung von antiendotoxischen Immunkörpern geben, die sich im Neutralisations-

versuch an jungen Meerschweinchen nachweisen lassen. Er will mittels lebender Bakterien eine bessere giftneutralisierende Wirkung seines Serums erzielt haben als bei Anwendung von Schüttel-extrakten. Dopter injiziert einmal wöchentlich, langsam steigend bis zur Menge einer Abschwemmung von zwei Kolleflaschen. Wie oben erwähnt, erzeugt Dopter auch ein polyvalentes Serum und verwendet außer echten Meningokokken noch solche Stämme, die durch die Agglutination und durch die Zuckervergärung von den typischen Kulturen abweichen.

Bei der subkutanen Einverleibungsart der lebenden Meningokokken bilden sich häufig Abszesse von größerem Umfang, die eine längere Unterbrechung der Immunisierung verursachen können. Die Temperaturerhöhungen, die meist rasch vorübergehen, sind bei der intravenösen Injektionsweise größer als bei der subkutanen. Auch bei vorsichtigster Steigerung der intravenösen Dosis treten nach Mengen von 1 ccm Toxin Fiebertemperaturen bis über 40,5° auf, während subkutan noch 30 ccm geringere Reaktionen hervorrufen. Anaphylaktische Erscheinungen, die Kraus und Doerr nach der intravenösen Einspritzung nach öfterer Vorbehandlung bei Ziegen beobachteten, sah Dopter bei Pferden in allen Stärkegraden auftreten, von rasch vorübergehenden Schwächezuständen bis zum Shock mit exitus letalis. Baecher verspricht sich etwas davon, bei der intravenösen Immunisierung solche Zwischenfälle dadurch auszuschalten zu suchen, daß man vor der eigentlichen Einspritzung eine kleine Dosis desselben Materials einige Stunden vorher injiziert, um so nach Besredka Antianaphylaxie zu erzeugen. Vermieden werden diese Unannehmlichkeiten noch bei ausschließlich subkutaner Immunisierung. Wassermann hat allerdings gefunden, daß intravenös behandelte Pferde das an Ambozeptoren reichste Serum geben. Nach Baecher konnten im Wiener Seruminstitut solche Unterschiede nicht konstatiert werden.

So zahlreich die von den verschiedenen Forschern empfohlenen Prüfungsmethoden sind, so wenig herrscht Einigkeit über eine brauchbare Bewertungsart des Meningokokkenserums. Eine Prüfung auf den antiinfektiösen Wert des Genickstarreserums im Tierversuch nehmen Ruppel und Jochmann vor. Ruppel benutzte nach eigenem Verfahren gezüchtete hoch virulente Meningokokken zur Infektion von Mäusen. Seine Angaben konnten jedoch nicht bestätigt werden. Jochmann injiziert Mäusen und Meer-

schweinen prophylaktisch subkutan oder intraperitoneal 0,2 bzw. 0,1 ccm Serum und 24 Stunden später die vierfache bzw. zweifache tödliche Kulturdosis. Diese Prüfungsmethoden der antiinfektiösen Wirkung des Meningokokkenserums werden wegen der inkonstanten Virulenz der Kokken und wegen des Mangels eines genügend empfänglichen Versuchstieres von den übrigen Autoren (Kolle und Wassermann, Kraus und Doerr, Neufeld, Flexner) abgelehnt.

Bessere Resultate werden erzielt nach der Methode von Kraus und Doerr, welche die giftneutralisierende Kraft des Serums bestimmt. Als Giftlösung werden frische Schüttelextrakte von Meningokokken benutzt und an jungen Meerschweinchen von höchstens 150 g Körpergewicht austitriert. Die kleinste tödliche Dosis soll höchstens 0,3 bis 0,5 ccm betragen. Das Gift ist sehr labil und nimmt beim Stehen spontan an Stärke ab, auch eignen sich nicht alle Stämme zur Gewinnung eines genügend wirksamen Giftes. Die doppelte Menge der tödlichen Giftdosis wird mit fallenden Serumgaben versetzt, eine halbe Stunde zur besseren Bindung stehen gelassen und dann Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. 0,5 ccm eines wirksamen Serums müssen genügen, um die doppelte tödliche Toxindosis zu neutralisieren, während die Kontrolltiere mit Normalserum zugrunde gehen sollen. Bei präventiver Injektion des Serums fallen die Versuchsreihen noch einheitlicher aus, doch sind die Serumwerte hierbei etwas geringer. Kraus und Baecher, Wassermann und Leuchs und Dopter haben diese Untersuchungen im allgemeinen bestätigt. Von besonderer

Beispiel eines antitoxischen Versuches nach Wassermann und Leuchs.

Meerschweinchen à 150 g	Toxin	Immunserum	Normales Pferdeserum	Impfart	Resultat
Nr. 1	0,1	1,0	—	intraperitoneal	lebt
" 2	0,1	0,5	—	"	"
" 3	0,1	0,3	—	"	"
" 4	0,1	—	1,0	"	tot nach 24 Stunden
" 5	0,1	—	0,5	"	" " 24 "
" 6	0,1	—	0,3	"	" " 24 "
" 7	0,1	—	—	"	" " 24 "

Wichtigkeit ist bei diesem Verfahren die Anwendung einer wirklich tödlichen Giftmenge. Aber auch der Wert dieser Methode wird durch häufiger auftretende Resistenzunterschiede der Meerschweinchen etwas unsicher. Krumbein und Diehl sprechen aus diesem Grunde der Wertbestimmung nach Kraus und Doerr die praktische Brauchbarkeit ab. Ihre Untersuchungen wurden allerdings an größeren Meerschweinchen ausgeführt.

Zu erwähnen ist noch eine früher von Kraus und Baecher geübte Wertbemessungsart, die die Bakterizidie des Serums im Meerschweinchenperitoneum zur Grundlage hatte. Fallende Mengen des Serums wurden gleichzeitig mit den Genickstarreerregern den Tieren intraperitoneal einverleibt und mittels Plattenaussaat des Exsudates die bakterizide Kraft der einzelnen Serumdosen festgestellt. Wegen der individuell verschiedenen Eignung der Meerschweinchen wurden aber brauchbare Ergebnisse nicht erzielt.

Kolle und Wassermann und Neufeld verwenden zur Eichung des Meningokokkenserums zwei verschiedene Wertbestimmungsmethoden, die unter Ausschaltung des Tierexperimentes arbeiten und lediglich die Ermittlung einer bestimmten Wirkungsweise des Serums in vitro bezwecken. Erstere bestimmen unter Anwendung des Bordet-Gengouschen Komplementbindungsverfahrens die Menge der komplementbindenden Antikörper in einem Serum, Neufeld bemißt den Wert eines Serums nach seiner bakteriotropen Wirkung.

Zu dem Verfahren von Kolle und Wassermann benötigt man 1. Meningokokkenantigen (Schüttelextrakt oder Bazill'emulsion), 2. Meningokokkenserum und 3. ein hämolytisches System, bestehend aus a) komplementfrischem Meerschweinchen-serum, b) inaktiviertem hämolytischen Kaninchenserum, auf Hammelblutkörperchen eingestellt, und c) gewaschene frische Hammelblutkörperchen in einer Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1:20. 1 ccm des bis zur halben Titerhöhe mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten hämolytischen Kaninchenserums und 1 ccm der Blutkörperchenaufschwemmung müssen nach Zugabe von 1 ccm Komplement (frisches Meerschweinchen-serum 1:10 physiologische NaCl-Lösung) komplette Hämolyse geben. Ohne Komplement darf keine Hämolyse eintreten. — Wassermann und Leuchs benutzen ein Standardextrakt als Antigen, welches in großen Mengen und möglichst multipartial

hergestellt und auf Eis im Dunkeln aufbewahrt wird. Von diesem Antigen wird die größte, die Hämolyse nicht hemmende Menge bestimmt, z. B. 0,2 ccm, 0,2 ccm + hämolytisches System gibt also komplette Hämolyse. Zur Titrierung eines zu prüfenden Serums werden fallende Mengen desselben nach vorheriger Inaktivierung durch halbstündige Erwärmung auf 56° mit der Hälfte der nicht hemmenden Antigenmenge, in diesem Falle also 0,1 ccm, mit 0,1 Komplement in sterilen Proberröhrchen gut vermischt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 3 ccm aufgefüllt. Die Reagenzgläser mit den verschiedenen Meningokokkenserumverdünnungen (0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,001 ccm) und den konstanten Antigen- und Komplementmengen werden darauf eine Stunde bei 37° der eventuellen Bindung überlassen. Jetzt wird das hämolytische System (1 ccm der halben Titerdosis des Kaninchenserums und 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung) hinzugefügt, gut gemischt, 2 Stunden bei 37° und sodann bis 24 Stunden im Eisschrank gehalten. Je nach der Menge der im Serum vorhandenen komplementbindenden Substanzen wird die kleinere oder größere Verdünnung des Heilserums das zur Hämolyse notwendige Komplement verankert haben, und in den betreffenden Röhrchen bleibt die Hämolyse aus. Die geringste Serummenge, welche noch völlige Hemmung der Hämolyse ergibt, ist für die Titerbestimmung maßgebend. Zur Kontrolle wird die gleiche Versuchsreihe mit normalem Pferdeserum angesetzt. Außerdem sind noch folgende Kontrollen unerlässlich: 1. Kontrolle des hämolytischen Systems, komplette Lösung; 2. Kontrolle des Antigens; doppelte Menge desselben darf die Hämolyse nicht hemmen; 3. Kontrolle des Heilserums; zweifache Höchstdosis muß mit hämolytischem System komplett lösen; 4. Kontrolle des Antigens auf seine eventuelle lösende Fähigkeit.

Diese Art der Wertbemessung hat ebenfalls ihre Gegner, da es sich einerseits nicht bewahrheitet hat, daß mit dem Komplementfixierungsverfahren die bakteriolytischen Ambozeptoren gemessen werden, wie die Autoren ursprünglich annahmen, andererseits aber der Gehalt an komplementbindenden Antikörpern keine Rückschlüsse auf die Höhe der antitoxischen, bakteriotropen und agglutinierenden Substanzen sowie die Schutzwirkung im experimentellen Infektionsversuch zuläßt. Aus diesen Gründen halten Neufeld und Baecher und Hachla die Feststellung der kom-

plementablenkenden Körper nicht für wertvoller zur Beurteilung des Wertes eines Serums als die Bestimmung des Agglutinationstiters.

Wegen der inkonstanten Resultate des Komplementbindungsverfahrens — bei Anwendung verschiedener Antigene, beim Vergleich wiederholter Prüfungen mit einem polyvalenten Serum werden ungleichmäßige Werte erhalten, desgleichen machen sich Unterschiede in der relativen Bewertbarkeit mehrerer Sera untereinander, also auch einem Standardserum gegenüber, selbst bei Verwendung des gleichen Antigens bemerkbar —, welche sich bei der Wertbestimmung des Meningokokkenserums ergeben, zog man zur Ergänzung der Bewertung des Genickstarreserums noch die von Neufeld angegebene Prüfung auf bakteriotrope Substanzen heran. Zur Feststellung des Gehaltes an Bakteriotropinen werden abgestufte Mengen Meningokokkenserum mit den Kokken und Leukozyten gemischt und etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden bei 37° gehalten. In Ausstrichpräparaten wird nun die unterste Serumverdünnung bestimmt, bei welcher noch eine spezifische Anregung der Phagozyten deutlich bemerkbar ist.

Die zur Ausführung der Untersuchung nötigen Leukozyten werden von mittelgroßen Meerschweinchen durch intraperitoneale Injektion von etwa 0,5 ccm mit Aleuronat versetzter Bouillon oder 10 bis 20 ccm Bouillon-Kochsalzgemisch nach gründlicher Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem Peritoneum gewonnen. Die Leukozyten sind brauchbar, wenn sie im ungefärbten Präparat in der Mehrzahl ganz feine fadenförmige Ausläufer oder plumpe Pseudopodien erkennen lassen. Die Leukozytenaufschwemmung soll so dicht sein, daß sie wie eine $\frac{1}{3}$ proz. Lezithinaufschwemmung (Meyer) aussieht. Die Bakterienemulsion wird hergestellt durch Abspülen einer etwa 20-stündigen Schrägagarkultur mit 1 ccm eines Gemisches von Bouillon und NaCl-Lösung $\bar{a}\bar{a}$ (= zu gleichen Teilen). Die Serumverdünnungen (siehe die Tabelle auf S. 259) werden in etwa 5 cm lange und 12 mm weite Röhrchen gebracht und zu jedem Röhrchen je ein Tropfen Meningokokkenaufschwemmung und je zwei Tropfen Leukozyten hinzugefügt. Außerdem werden Kontrollröhrchen mit Kochsalzlösung und entsprechender Verdünnung Normalserum angesetzt. Nach $1\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt in Thermostaten bei 37° haben sich die Leukozyten zu Boden gesetzt. Die überstehende Flüssigkeit wird abgossen und mit der Platinöse werden Ausstriche auf glatte Objektträger gemacht,

mit Alkohol-Äther \overline{aa} fixiert und mit alter Mansonlösung oder Pyronin-Methylgrün (Pappenheim) gefärbt. Wegen der oft mangelhaften Färbbarkeit einzelner Meningokokken wird die Stärke der Phagozytose nicht nach der eigentlichen Wrightschen Methode genau ausgezählt, sondern nur schätzungsweise bestimmt. Boehncke empfiehlt, zur sichereren Feststellung der Schätzwerte aus jedem Röhrchen je zwei Ausstriche zu machen. Zur Gewinnung der Leukozyten und zur Verdünnung des Serums soll am besten Kochsalzlösung benutzt werden, welche auf 37° vorgewärmt ist. Um die lästige Gerinnung bei der Ausspülung des Peritonealinhaltes zu vermeiden, setzt Boehncke der physiologischen NaCl-Lösung $\frac{1}{10}$ Proz. Natrium citricum zu. Ein Serum ist nach Neufeld genügend wirksam, wenn es in einer Verdünnung 1:1000 die Phagozytose noch deutlich vermehrt. Die Wirkung des zu prüfenden Serums muß stets mit der eines Standardserums verglichen werden. Diese Forderung ist leicht erfüllbar, da sich die Tropine im carbolversetzten Serum gut halten. Die Standardsera können daher, in üblicher Weise konserviert, in Flaschen mit Gummistopfen im Eisschrank aufbewahrt werden. Die Meningokokkenstämme, die zur Prüfung geeignet sind, müssen durch das spezifische Serum genügend beeinflussbar sein, dürfen aber innerhalb der Versuchszeit von $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden keine erhebliche Spontanphagozytose zeigen. Schließlich dürfen sowohl die gefressenen wie die freibleibenden Kokken keine erhebliche Degeneration während der angegebenen Zeit erleiden (Neigung zur Degeneration kann nach Neufeld durch Züchtung auf ungeeignetem Agar verursacht werden). In diesen Forderungen liegen bereits Nachteile der Tropinmethode, da zahlreiche Stämme zur Spontanphagozytose neigen und ebensowenig gleichmäßig gut gefärbte Kokken geben. Die Degeneration der phagozytierten Kokken soll nach Jobling vermindert werden, wenn Serum und Kokken zunächst eine Stunde allein bebrütet und erst die letzte halbe Stunde mit dem Leukozytenzusatz bei 37° gehalten werden.

Die Tropinmethode wird im allgemeinen als geeignete Hilfsmethode zur Wertbemessung des Meningokokkenserums angesehen (Baecher und Hachla, Wassermann, Onaka). Neufeld, Uhlenhuth sowie Jobling geben ihr jedoch den Vorzug vor allen anderen Verfahren der Wertbestimmung des Meningokokkenserums.

Gleichmäßig gute Resultate liefert keine der vorgeschlagenen Wertbemessungsarten und eine Entscheidung, welche Methode den Vorzug verdient, läßt sich zurzeit noch nicht fällen. Wegen der Wichtigkeit, die eine sichere Titrierung des Genickstarreserums für die Praxis hat, werden im Ehrlich'schen Institut in Frankfurt auf Veranlassung der Behörde diesbezügliche Nachuntersuchungen ausgeführt, welche insbesondere den Wert des Komplementbindungs- und des Tropinverfahrens ermitteln sollen (Otto und Boehncke).

Protokoll eines bakteriotropen Versuches (Otto u. Boehncke).

Nr. des Röhrchens	Serumverdünnung	Kokken-emulsion	Leukozyten-emulsion	Mikrosk. Resultat nach 1½ Stunden
1	NaCl-Kontrolle . . .	1 Tropfen	2 Tropfen	0
2	0,01 ccm (= 0,1 $\frac{1}{10}$)	"	"	†††
3	0,005 " (= 0,05 $\frac{1}{10}$)	"	"	†††
4	0,002 " (= 0,2 $\frac{1}{100}$)	"	"	††
5	0,001 " (= 0,1 $\frac{1}{100}$)	"	"	††
6	0,0005 " (= 0,05 $\frac{1}{100}$)	"	"	† bis ††
7	0,0002 " (= 0,2 $\frac{1}{1000}$)	"	"	schwach †
8	0,0001 " (= 0,1 $\frac{1}{1000}$)	"	"	0
	Normalserum:			
9	0,01 ccm (= 0,1 $\frac{1}{10}$) .	"	"	0

††† = sehr starke Phagozytose, †† = starke Phagozytose, † = deutliche Phagozytose, 0 = keine Phagozytose.

Literatur: Baecher, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1911. Baecher und Hachla, Ztschr. f. Immunitätsf. 1910. Dopfer, Ann. de l'Inst. Pasteur 1910. Derselbe, Compt. rend. soc. biol. 1909. Flexner, The Journ. of exper. med. 1907. Jochmann, Deutsche med. Wochenschr. 1906. Kolle, Zentralbl. f. Bakt. **44**, Ref. Kolle u. Wassermann, Deutsche med. Wochenschr. 1906. Dieselben, Klin. Jahrb. 1906. Kraus und Baecher, Ztschr. f. Immunitätsf. 1909. Kraus und Doerr, Wiener klin. Wochenschr. 1908. Krumbein und Diehl, Arb. a. d. Inst. z. Erforsch. d. Infektionskrankh. Bern 1908. Krumbein u. Schatiloff, Deutsche med. Wochenschr. 1908. Kutscher, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. v. Lingelsheim und Leuchs, Klin. Jahrb. 1906. Markl, Zentralbl. f. Bakt. **43**, **45**. Neufeld, Med. Klinik 1908. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. **42**, Ref. Neufeld und Händel, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt **15**. Neufeld, ebenda **34** (1910). Neufeld und Hüne, ebenda **25**. Otto und Boehncke, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Onaka, Ztschr. f. Hyg. 1910. Wassermann u. Leuchs, Klin. Jahrb. 1908. Wassermann, Zentralbl. f. Bakt. **44**, Ref. Weichselbaum, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1904.

Milzbrandserum.

Zur Gewinnung eines wirksamen Milzbrandserums eignen sich besonders Schafe, Pferde, Rinder, ferner Esel und Maultiere. Auch Ziegen und Hunde sollen brauchbar sein. Sobernheim benutzt zur Immunisierung Rinder, Pferde und Schafe und stellt ein Mischserum dieser Tierarten her. Esel werden zur Serumgewinnung u. a. von Sclavo und Carini bevorzugt. Detre-Deutsch nimmt Pferde und Esel zur Erzeugung seines Serums.

Nach der Pasteurschen Methode oder mittels Serovakzination wird bei den zur Serumgewinnung dienenden Tieren zunächst eine Grundimmunität geschaffen. In regelmäßigen Zwischenräumen von etwa 10 bis 14 bis 21 Tagen werden dann die Tiere mit Milzbrandkulturen in allmählich steigenden Mengen infiziert. Die erste Impfung mit virulenter Kultur beträgt nach Sobernheim $\frac{1}{200}$ bis $\frac{1}{1000}$ Öse¹⁾. Dieser Forscher macht die Injektionen nur subkutan und hält die intravenöse Einverleibung der Kultur nach Sclavo für wenig empfehlenswert, wegen der Gefahr von Embolien bei Verwendung von Massenkulturen, wie sie im Verlaufe der Behandlung nötig werden. Haben die Tiere die erste Impfung mit virulentem Material gut überstanden, so werden die Impfungen in der Weise wiederholt, daß man in Intervallen von zwei bis drei Wochen mit der Dosis ziemlich rasch auf eine Öse steigt, darauf zu Gaben von mehreren Ösen und langsam zu Dosen von mehreren Kulturen übergeht. Gegen Ende der Immunisierung gibt man eine und selbst mehrere Massenkulturen (nach Kolle). Zweckmäßig verwendet man 24-stündige Agarkulturen von hoher Virulenz. Je virulenter allerdings ein Milzbrandstamm ist, um so vorsichtiger muß man bei der Steigerung der Dosen sein, um so wirksamer wird aber auch das Serum. Es empfiehlt sich, Stämme verschiedener Herkunft zu verwenden, die möglichst frisch von tödlich verlaufenen Infektionen gezüchtet sind. Die Immunisierung ist bei Schafen wegen ihrer hohen Empfänglichkeit am schwierigsten, besonders vorsichtig muß man mit der ersten virulenten Dosis sein, wozu man am besten die minimale letale Dosis verwendet. Beim Rind und Pferd ist es nicht nötig, weniger als

¹⁾ Darunter versteht man eine Öse im Platindraht von gewöhnlich 2 mg Fassungsvermögen.

$\frac{1}{200}$ Öse als erste virulente Dosis zu geben. Im Verlaufe der Behandlung, die zum Hochtreiben der Wirksamkeit des Milzbrandserums vonnöten ist, geht ein nicht geringer Prozentsatz der eingestellten Schafe trotz vorsichtiger Dosierung in der Regel zugrunde. Während sich bei Pferden häufig in der Produktion wirksamer Sera nach den Erfahrungen von Sobernheim recht unliebsame individuelle Schwankungen bemerkbar machen, ist dies bei Rindern und noch weniger bei Schafen nicht der Fall. Derselbe Autor gewann die wirksamsten Seren von Schafen, dann folgt das Pferd und zum Schluß das Rind.

Gewöhnlich ist bei den behandelten Tieren bereits nach der Impfung von ein bis zwei Agarkulturen eine Schutzwirkung ihres Serums nachzuweisen, doch pflegt der Schutzwert des Serums erst dann ein genügend hoher zu sein, wenn die Tiere $\frac{1}{2}$ bis 1 Massenkultur vertragen. Die Dauer der Behandlung bis zur Erreichung eines genügend hohen Immunitätsgrades zwecks Blutentnahme beträgt durchschnittlich drei bis fünf Monate. Die Erhaltung der Tiere bzw. ihres Serums auf einem genügend hohen Titer ist nicht besonders schwierig. Etwa 14 Tage nach der Blutentnahme kann die neue Impfung schon wieder vorgenommen werden. In der Regel genügt eine Injektion, um den Antikörpergehalt des Blutes wieder auf seine Höhe vor der Blutentnahme zu bringen. In dieser Weise ist es möglich, von einem und demselben Tiere während eines Jahres etwa 10-mal wirksames Serum zu gewinnen, ohne daß die Tiere durch die abwechselnde Impfung und Blutentnahme besonders geschädigt werden.

Die Reaktion des immunisierten Tieres nach den Impfungen ist eine allgemeine und eine lokale. Die allgemeine Reaktion, die in Fieber mit seinen Folgeerscheinungen besteht, ist nach der ersten virulenten Injektion besonders heftig und hält meist mehrere Tage an. Später, wenn die Tiere größere Kulturmengen unter die Haut erhalten, kommt es nicht selten zu ausgedehnten lokalen Anschwellungen, die jedoch bald zurückgehen und das Allgemeinbefinden der Tiere wenig stören.

Der Aderlaß zur Gewinnung des Serums wird zweckmäßig 14 bis 16 Tage nach der letzten Kulturinjektion ausgeführt. Die Blutentnahme soll nicht früher vorgenommen werden, weil manchmal noch am achten oder neunten Tage nach einem fieberfreien Stadium plötzlich Temperatursteigerungen auftreten und weil

häufig noch bis zum zehnten und elften Tage lebende Milzbrandkeime im Blute kreisen.

Infolge der hohen Virulenz der Milzbrandbazillen für die kleinen Laboratoriumstiere, nämlich für Mäuse, Meerschweine, Kaninchen und Ratten, ist die Wertbemessung eine sehr schwierige und ungenaue. Eine quantitative Prüfungsmethode, die allgemein anerkannt wurde, gibt es bisher nicht.

Das Sobernheimsche Milzbrandserum wird an Kaninchen autitriert. Es werden fünf Tiere mit Serumdosen von 2, 3, 4, 5 und 6 ccm intravenös vorbehandelt. Fünf bis zehn Minuten nachher erfolgt die subkutane Infektion mit $\frac{1}{1000}$ Öse virulenter Kultur. Ein sechstes Tier hat statt Milzbrandserum 6 ccm Normalserum vom Pferd, Schaf oder Rind intravenös erhalten oder stellt ohne Serumvorbehandlung die Kontrolle dar, die nur der subkutanen Infektion unterworfen wurde. Sobernheim sieht ein Serum als spezifisch wirksam und brauchbar an, wenn von den vorbehandelten Tieren mindestens zwei mit dem Leben davorkommen und die übrigen erst später als das Kontrolltier sterben. Das Serum ist ganz außerordentlich wirksam, wenn mehr Tiere oder gar alle fünf am Leben bleiben, während die Kontrolle nach etwa 48 Stunden zugrunde geht. Sobernheim hebt noch besonders hervor, daß keineswegs immer die Tiere am Leben bleiben, welche die größte Serumdosis erhalten haben. Beispielsweise können die Kaninchen mit 2 und 4 ccm geschützt sein, während die anderen der Infektion erliegen.

Nach einem neueren Prüfungsverfahren benutzt Mendez die Mischmethode, indem er die 1000-fache dosis letalis einer mäßig virulenten Kultur mit abgestuften Serummengen mischt und Meerschweinchen subkutan injiziert. Diejenige Serumdosis enthält $\frac{1}{2}$ Immunitätseinheit, welche das Leben des Tieres um sechs bis acht Stunden gegenüber dem des Kontrolltieres verlängert.

Detre verwendet ein ähnliches Verfahren wie Sobernheim. Er nennt ein Serum normal, wenn 2 ccm bei intravenöser Applikation genügen, um ein 1500 g schweres Kaninchen gegen eine 18 Stunden später erfolgte Infektion mit virulenter Kultur zu schützen. Die Kontrolle muß nach zweieinhalb bis drei Tagen sterben. Die besten Sera sollen 4-fach normal sein, 0,5 ccm eines solchen Serums müssen also zum Schutze ausreichen.

Ascoli bestimmt die Wertigkeit seines Serums wie Mendez an Meerschweinchen. Er benutzt zur Infektion einen abgeschwächten Milzbrandstamm, welcher für Kaninchen avirulent ist, Meerschweinchen gewöhnlich in $2\frac{1}{2}$ bis $3\frac{1}{2}$ Tagen tötet. Er verwendet zur Züchtung des Stammes Hühnerbouillon und sieht die Virulenz für ausreichend an, wenn 0,25 ccm einer 16- bis 20-stündigen Kultur in der angegebenen Zeit Meerschweine tötet. Außerdem muß die Virulenz des Stammes gegenüber einem bereits in seiner Wertigkeit bekannten Milzbrandserum bestimmt werden. Von sechs bzw. vier Meerschweinchen, die 24 Stunden vor der Infektion 2 ccm des Serums erhalten haben, müssen nach sechs Tagen mindestens vier bzw. drei Tiere überleben. Die Auswertung des unbekanntes Serums geschieht ebenfalls an vier bis sechs etwa 300 g schweren Meerschweinen. Jedes Tier erhält 2 ccm des Serums intraperitoneal und 24 Stunden darauf $\frac{1}{4}$ ccm Bouillonkultur subkutan. Es werden diejenigen Seren für die Veterinärpraxis freigegeben, nach deren Gebrauch drei bzw. vier Tiere noch sechs Tage am Leben sind. Für die Humanmedizin müssen die Sera in Mengen von 0,5 bis 1 ccm denselben Effekt haben. Nach den Untersuchungen von Bierbaum und Boehncke ist der Prüfungsmodus von Ascoli für dessen Serum im ganzen zur ungefähren Prüfung brauchbar. Für andere Sera scheint dies nicht der Fall zu sein.

Die Wertbemessung durch Bestimmung der spezifischen Schutzstoffe (komplementbindenden Antikörper und Bakteriotropinen) im Reagenzglas hat nach den Versuchen von Bierbaum und Boehncke auch nicht zu einer brauchbaren Prüfungsmethode geführt.

Rickmann¹⁾ hat in neuerer Zeit in Gemeinschaft mit Joseph ein Verfahren ausgearbeitet, welches eine quantitative Austitrierung des Milzbrandserums zuläßt. Als Prüfungsdosis gilt diejenige Menge Kultur — in feinsten Emulsion —, gegen welche 0,1 ccm eines als 10-fach angenommenen Standardserums gerade noch schützt. Im Vergleich mit dem Standardserum läßt sich dann unter Benutzung der ermittelten Kulturprüfungsdosis der Antikörpergehalt des unbekanntes Serums zahlenmäßig feststellen. Die Serumdosen werden Meerschweinchen intraperitoneal und eine Stunde darauf die Kultur subkutan eingespritzt.

¹⁾ Verhandl. d. Ges. deutsch. Naturf. und Ärzte, Wien 1913.

Eigenschaften. Die Antikörper im Milzbrandserum sind gegen Licht, Luft und Temperaturschwankungen sehr resistent. Ein mit Carbol versetztes Milzbrandserum behielt nach Sobernheim trotz öfterem Zutritt von Luft und Licht bei Temperaturen zwischen 5 und etwa 45° mehrere Jahre unvermindert seinen Schutzwert. Das Gefrieren scheint aber die Antikörper im Milzbrandserum zu schädigen. Durch Erwärmen auf 60 bis 70° erfolgt gewöhnlich keine Abschwächung des Milzbrandserums. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß derartige Beobachtungen keinen Anspruch auf große Genauigkeit machen können, wegen der Unmöglichkeit, das Milzbrandserum exakt quantitativ zu messen. Bei der Filtration gilt das beim Diphtherieserum Gesagte; je nach der Dichte der Filterkerzen tritt eine Verminderung der Antikörper ein oder nicht.

Die Milzbrandantikörper sind an die Globulinfraktion gebunden. Ascoli fand mittels Sättigung des Serums mit Ammoniumsulfat den Immunkörper im Ziegen- und Eselserum in der Pseudoglobulinfraktion, einen kleineren Teil im Ziegenserum auch in der Euglobulinfraktion. Das Pseudoglobulin des Eselserums verliert in wässriger Lösung allmählich seinen Schutzwert.

Literatur: Ascoli, Ztschr. f. physiol. Chem. 1906. Derselbe, Ref. Biochem. Zentralbl. 1906. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. 1906. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 1908. Bail, ebenda 1904, 1905 u. 1908. Detre-Deutsch, VIII. Internat. Tierärztl. Kongreß, Budapest 1905. Deutsch und Feistmantel, Impfstoffe und Sera, Leipzig 1903. Otto und Boehncke, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912, Sclavo, Zentralbl. f. Bakt. 18 u. 26. Sobernheim, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. f. Immunitätsforschung.

Pestserum.

Pferde im Alter von vier bis sieben Jahren eignen sich am besten zur Gewinnung des Pestserums. Die Tiere müssen absolut fehlerfreie Beine haben. Es ist ferner darauf zu achten, nur solche Pferde für die Pestserumbereitung zu wählen, die sehr ruhig und ziemlich unempfindlich gegen kleine Schmerzen sind. Tiere mit lebhaftem Temperament, Schläger und Beißer sind ganz unbrauchbar.

Sollen lebende Pestbazillen bei der Behandlung der serumliefernden Tiere verwendet werden, so sind für den Aufenthalt

der Tiere besondere Stallungen nötig. Die Konstruktion des Gebäudes muß derartig sein, daß das Eindringen von Ratten und anderen Tieren möglichst ausgeschlossen ist. Die Fenster und Ventilationsöffnungen müssen fliegensichere Vergitterungen haben. Die Vorräume müssen dunkel und dürfen nur von innen künstlich zu beleuchten sein. Sie sollen mit Doppeltüren versehen sein, die sich nur einzeln öffnen lassen. Diese Vorrichtungen dienen dazu, Fliegen und Bremsen fernzuhalten. In diesen Räumen sind auch Umkleidegelegenheiten und Desinfektionseinrichtungen unterzubringen. In den einzelnen Stallungen, die für jedes injizierte Pferd für sich abgeschlossen sind, befinden sich Suspensionsvorrichtungen. In einer großen Operationshalle werden die Injektionen und Entblutungen ausgeführt.

Zur Injektion, die intravenös vorgenommen wird, werden Agarkulturaufschwemmungen benutzt. Die Kultur ist eine gut virulente Agarrattenpassagekultur, die zwei Tage bei 30° gewachsen war. Die Behandlung der Pferde beginnt mit der Einspritzung abgetöteter Bazillen. Die Abtötung erfolgt durch einstündiges Erhitzen der Pestbazillenaufschwemmung im Wasserbade. Je nach der Virulenz der Kultur wird zuerst $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{4}$ Agarkultur injiziert. Nach Ablauf der Reaktionen wird die Behandlung fortgesetzt, indem man mit der Dosis auf $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 6 abgetötete Kulturen steigt. Die Injektionen mit abgetöteten Kulturen können in der Regel nach fünf bis acht Tagen wiederholt werden. Hat das Tier die Immunisierung bis zu sechs abgetöteten Kulturen gut vertragen, so fängt die Behandlung mit lebender Kultur an. Die Anfangsdosis beträgt $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{4}$ Kultur. Unter allmählicher Steigerung in Zwischenräumen von 8 bis 14 Tagen, je nach der vorhergegangenen Reaktion, werden dann Dosen von $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 Kulturen gegeben. Meistens genügt dieses Quantum, um eine gute Immunität zu erzielen. Größere Mengen werden gewöhnlich sehr schwer vertragen. Bei den Injektionen mit lebenden Pesterregern ist ganz besondere Sorgfalt nötig. Die Pferde müssen in den Notstand, bei größeren Mengen in den Suspensionsapparat gebracht werden, damit sie absolut ruhig stehen bzw. beim Schwindeligwerden infolge der Einspritzung nicht auf den Boden fallen und sich so Verletzungen zuziehen können, die ein Austreten lebender Pestkeime eventuell ermöglichen. Die Stelle, an der die Injektion vorgenommen werden soll, muß unbedingt rasiert werden,

damit nachher die Einstichstelle gut desinfiziert und ein Verband angelegt werden kann. Zur Aufnahme der Injektionsflüssigkeit benutzt man im Berner Seruminstitut ein mit Gummistopfen verschließbares zylindrisches Gefäß. Der Gummistopfen hat drei Öffnungen. Durch die eine ragt ein Trichter ins Innere, durch die zweite ein mit Watte verschlossenes Luftzuführungsrohr und durch die letzte ein Glasrohr, welches an dem oberen abgelenkten Ende mit dem Injektionsschlauch verbunden ist und mit dem anderen Ende bis zum Boden des Zylinders reicht. Dieses Rohr dient als Heber. Zuerst wird Kochsalzlösung eingegossen und der Injektionsschlauch gefüllt und mit einem Quetschhahn versehen. Erst jetzt wird die Kulturaufschwemmung in das Aufnahmegefäß durch den Trichter nachgegossen. Die Hohladel wird darauf in die Vene gut eingeführt und eine Olive, die in dem Injektionsschlauch befestigt ist, nunmehr gut mit der Hohladel verbunden. Durch Entfernen des Quetschhahnes vom Schlauch ist dann die Möglichkeit des Einfließens der Injektionsflüssigkeit gegeben. Ist der Behälter fast entleert, so wird öfter mit Kochsalzlösung nachgespült, um die Pesterreger tunlichst auszuschwemmen. Die Verbindungsstelle zwischen Hohladel und Olive wird vor der Einspritzung mit einem mit Sublimatlösung getränkten Wattebausch umwickelt. Nach beendigter Injektion wird der Quetschhahn geschlossen und die Injektionsnadel unter Aufdrücken eines großen Sublimatwattebausches in diesen zurückgezogen. Die ganze Apparatur wird in einen Bottich mit Desinfektionsflüssigkeit gebracht und bis zum nächsten Tage liegen gelassen.

Die unmittelbar nach den Einspritzungen auftretenden Reaktionen bestehen in Unruhe, starker Atemnot, profusem Schweißausbruch, Schwanken und Unfähigkeit, sich auf den Beinen zu halten. Stürzt das Tier, so bleibt es meist 10 bis 20 Minuten mit stark dyspnoischen Beschwerden liegen, um sich dann ziemlich rasch zu erholen. Die später auftretenden Reaktionen sind ebenfalls allgemeiner Natur, wie Temperatursteigerungen, Schüttelfröste, profuse Durchfälle, Anschwellungen an den Gelenken der Gliedmaßen, Unruhe und Unlust zum Fressen. Im Beginn der Behandlung beträgt die Dauer dieser Erscheinungen bis über zwei Wochen, um im Verlauf der Immunisierung sich mit zunehmendem Immunitätsgrade auf drei bis fünf Tage zu beschränken. Trotzdem gönnt man mit Vorteil den Tieren zwischen den Einspritzungen längere

Zeit Ruhe, besonders dann, wenn ein konstanter Gewichtsverlust zu vermerken ist.

Die bisher beschriebene Behandlungsmethode zur Herstellung eines Pestserums ist die im Berner Seruminstitut und im Institut Pasteur zu Paris übliche.

Der beste Zeitpunkt für die Blutentnahme liegt zwischen dem 14. bis 21. Tage nach der letzten Injektion. In dieser Zeit kann man ziemlich damit rechnen, daß kein freies Toxin und keine lebenden Keime mehr im Blute kreisen.

Nach Lustig verwendet man zur Immunisierung die nach seiner Methode gewonnenen Nukleoproteide. Die Pestkulturen werden in 1 proz. Kalilauge zur Auflösung gebracht und durch Zusatz von Essigsäure die Eiweißstoffe (Nukleoproteide) gefällt. Der Niederschlag wird getrocknet. Zur Injektion wird das Pulver mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, der etwas Alkali zugesetzt ist. Die Behandlung beginnt mit der Einverleibung von 0,1 g Trockensubstanz und steigt allmählich auf 1,5 bis 2 g in Intervallen von 14 bis 25 Tagen. Die Injektionen erfolgen subkutan. Die Reaktionen bestehen in Fieber und Ödemen an den Injektionsstellen. Die Blutentnahme geschieht 14 Tage nach der letzten Injektion.

Terni und Bandi benutzen als Serumpender Maultiere und Ochsen. Zur Immunisierung verwenden sie die natürlichen Baischen Aggressine, die sie in der Weise gewinnen, daß sie mit Pestbakterien intraperitoneal infizierte Meerschweine, wenn sie schwer krank sind, töten und das Bauchhöhlenexsudat auffangen. Durch Zentrifugieren und Filtrieren werden die lebenden Keime entfernt, und das sterile Exsudat (Aggressin) wird zur Gewinnung eines Serums injiziert. Dieses Pestserum soll neben antiinfektiösen und antiaggressiven Eigenschaften nach Terni auch antitoxische Fähigkeit besitzen.

Ein rein antitoxisches Serum will Markl gewonnen haben, indem er die Tiere mit den löslichen giftigen Stoffwechselprodukten behandelt, die er in älteren Bouillonkulturen nachgewiesen hat und als echte Toxine ansieht. Nach den Untersuchungen anderer Autoren handelt es sich um ausgelaugte Endotoxine und die Wirkung des Serums ist dementsprechend eine antiendotoxische.

Die Wertbemessung des Pestserums wird im Institut Pasteur an Mäusen ausgeführt, und zwar wird sowohl die Schutz- als auch die Heilwirkung geprüft. Bei ersterer Prüfung erhalten die Mäuse das Serum in abgestuften Mengen subkutan oder intraperitoneal, 24 Stunden später erfolgt die Infektion mittels infizierter Hohlneedle durch Stich in die Schwanzwurzel. Bei der Prüfung der Heilwirkung werden die verschiedenen Serumengen 16 Stunden nach erfolgter Infektion subkutan injiziert. Die beste Prüfungsmethode des Schutzwertes des Pestserums ist nach Kolle und seinen Mitarbeitern die im Berner Seruminstitut übliche. Dazu werden Ratten von 100 g Gewicht benutzt, und da die individuellen Schwankungen gegenüber der Pestinfektion auch bei den Ratten noch ziemlich groß sind, werden größere Versuchsreihen angesetzt und mit jeder Serumdosis zwei Tiere injiziert. Die Seruminspritzungen werden intraperitoneal vorgenommen, und die Infektion erfolgt am besten zu gleicher Zeit durch Stich mit infizierter Hohlneedle in die Schwanzwurzel. Ein absolut sicherer Schutz wird allerdings selbst mit großen Dosen nicht immer erzielt.

Literatur: Calmette u. Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur 1900. Calmette, Hyg. Rundschau 1901. Deutsch und Feistmantel, Impfstoffe und Sera, Leipzig 1903. Dieudonné, Immunität bei Pest, Handb. von Kolle - v. Wassermann, Bd. 4 u. Ergänzungsbd. 2. Derselbe, Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie, Leipzig 1909. Dieudonné und Otto, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Friedberger, ebenda 1912. Gottschlich, Ztschr. f. Hyg. 1900. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. Ref. **38**, 1906. Hetsch u. Otto, Klin. Jahrbuch 1903. Hueppe u. Kikuchi, Zentralbl. f. Bakt. **39**. Kitasato, Ref. Münch. med. Wochenschr. 1907. Koch, v. Behring, Pfeiffer, Kolle und Martini, Klin. Jahrb. 1902. Kolle, Festschr. f. Koch, Jena 1903. Kolle u. Hetsch, Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten, 1911. Kolle, Hetsch und Otto, Ztschr. f. Hyg. 1904. Kolle u. Krumbein, Handb. d. Immunitätsforschung von Kraus-Levaditi. Kolle und Otto, Ztschr. f. Hyg. **40** und **45**. Kraus, Wien. klin. Wochenschr. 1897. Lustig, Siero-terapia e vaccin prev. contro la peste, Turin 1899. Markl, Ztschr. f. Hyg. 1901 u. 1903. Derselbe, Wien. med. Wochenschr. 1900. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. **24**, **26**, **29**. Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur 1897. Otto und Boehncke, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. Roux, Sem. méd. Paris 1897. Tavel, Krumbein u. Glücksmann, Ztschr. f. Hyg. 1902. Terni, ebenda 1906. Derselbe, Ref. Zentralbl. f. Bakt. **40**. Taranuchin, ebenda **35**. Yersin, Calmette u. Borrel, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895. Yersin, ebenda 1894, 1897 und 1899.

Pneumokokkenserum.

Pferde, Rinder, Esel und Hammel sind geeignet zur Herstellung wirksamer Pneumokokkenserum. Zur Gewinnung des Serums für praktische Zwecke dienen aber hauptsächlich Pferde und Esel als serumspendende Tiere.

Bedingung für die Anreicherung großer Antikörpermengen im Blute ist die Verwendung virulenter Pneumokokkenstämme. Mit avirulenten Stämmen erzielt man selbst durch Injektion großer Mengen lebender Kulturen keine hochwertigen Sera (Neufeld und Rimpau). Zur Erzeugung der Grundimmunität bei den Serumtieren injiziert man einige Male abgetötetes Material oder abgeschwächte Pneumokokken. Die Abtötung erfolgt durch Hitze oder durch Auflösung der Kokken mittels Galle. Als abgeschwächtes Material dienen a priori wenig virulente, mit einem geeigneten chemischen Mittel oder durch Erwärmung abgeschwächte Pneumokokken. In bestimmten Zwischenzeiten werden dann die Einspritzungen wiederholt, indem man nach einer oder mehreren Injektionen mit totem oder abgeschwächtem Material zunächst zur Einverleibung kleiner Dosen vollvirulenter Kultur übergeht und die Dosen sodann allmählich steigert. Eine neue Einspritzung erfolgt immer erst zu einer Zeit, zu welcher sich die Tiere wieder völlig von den Folgen der vorhergegangenen Injektion erholt haben. Die Stärke der Reaktion liefert den Indikator für die Höhe der folgenden Dosis. Um sich vor unangenehmen Zwischenfällen zu schützen, muß man sich bei Benutzung frischer Stämme zuerst davon überzeugen, ob diese demselben Typus angehören wie die bereits verwendeten Stämme. Ist dies nicht der Fall, so darf die Kulturdosis nicht ohne weiteres nach der Größe der vorangegangenen Einspritzungen ermessen werden. Man beginnt wieder mit der Einverleibung kleinerer Mengen und geht danach langsam zu hohen Dosen über. Die Art der Einverleibung ist die intravenöse und subkutane.

Mennes ging bei der Immunisierung eines Pferdes, welches ihm ein gut wirksames Serum lieferte, so vor, daß er zunächst demselben erhitze Pneumokokkenbouillonkultur in allmählich zunehmenden Dosen von 5 bis 20 ccm einverleibte. Das Pferd wurde dann abwechselnd mit lebender Bouillonkultur und Blut infizierter Kaninchen weiterbehandelt. Das Tier vertrug schließlich 1 Liter

lebender Pneumokokkenbouillonkultur. 0,5 ccm des Serums dieses Pferdes genügten, um Kaninchen gegen die 100 000-fache tödliche Dosis zu schützen. In Mengen bis zu 1,0 ccm subkutan und 0,5 ccm intravenös hatte das Serum bei Kaninchen auch kurative Wirkung. Außer den antiinfektiösen Eigenschaften kamen diesem Serum noch antitoxische zu. Es verhinderte die Erkrankung von Kaninchen nach Injektion von Bouillonkulturfiltraten.

Washbourn immunisierte ein Pferd zuerst mit abgetöteten und später subkutan mit lebenden Agar- und Bouillonkulturen bis zur Höchstdosis von 200 ccm. Das Serum, welches erst nach 5 Monaten entnommen wurde, hatte präventive und heilende Wirksamkeit. 0,03 ccm davon mit der 10-fach tödlichen Dosis gemischt schützte Kaninchen bei intraperitonealer Injektion, Normalserum wirkte nur gegen die einfach tödliche Dosis. Kaninchen, die 2,0 ccm 5 bis 6 Stunden nach der Infektion erhielten, blieben am Leben. Pane erzeugte ein Schutz- und Heilserum von einer Kuh und einem Esel, welches letzterer das bessere Serum lieferte. Der Pneumokokkenstamm, der zur Behandlung der Tiere benutzt wurde, war hochvirulent. $\frac{1}{20\,000\,000}$ ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur tötete Kaninchen innerhalb einiger Tage.

Tizzoni und Panichi erhielten hochwirksame Sera vom Esel und Schaf. Die Grundimmunität erzeugten sie durch Injektion von Kulturfiltraten. Später injizierten sie in Pausen von 10 bis 12 Tagen den Tieren Serum und Kultur gleichzeitig in zwei verschiedene Venen. Die Immunisierung gelang besser mit unveränderter Kultur als mit Filtraten, gewaschenen Bakterienleibern oder besonders hergestellten Extrakten. Zur Züchtung der Pneumokokken verwandten sie besonders zubereitete Nährbouillon, in welcher die Kokken dieselben Toxine bilden sollten wie im Organismus.

Kindborg erhielt von Hammeln durch subkutane Vorbehandlung zuerst mit abgetöteten, dann mit lebenden, hochvirulenten Pneumokokken ein gut wirksames Serum, welches aber nach seinen Untersuchungen nur gegen den Pneumokokkenstamm wirkte, mit dem es gewonnen war. Damit steht er aber in Widerspruch mit den Beobachtungen vieler anderer Autoren. Während Mennes und Landmann gefunden hatten, daß ein hochwertiges Serum auch gegen viele andere Stämme als die zur Herstellung des Serums benutzten Pneumokokken Schutz verlieh, ja Landmann

noch nie einen Stamm erhalten hatte, der nicht durch sein hochwertiges Serum beeinflusst worden wäre, so ist Römer der Ansicht, daß gewisse Differenzen zwischen den einzelnen Stämmen in immunisatorischer Hinsicht bestehen. Er stellt daher unter Benutzung verschiedener Kulturen zu Heilzwecken ein polyvalentes Serum her. Erst durch die Untersuchungen von Neufeld und Händel sind eigenartige Unterschiede unter den verschiedenen Pneumokokkenstämmen zutage gefördert worden, die aber keineswegs so weitgehend sind, wie sie Kindborg mitgeteilt hat. Sie fanden, daß hochwertige Sera, welche durch Vorbehandlung mit einem Pneumoniestamm gewonnen waren, gegen die meisten anderen hochvirulenten Stämme fast ebenso schützten wie gegen den eigenen, daß es aber Stämme ohne sonstige besondere Merkmale gibt, die durch das Serum gar nicht beeinflusst wurden. Solche Stämme bezeichnen Neufeld und Händel als „atypisch“. Es folgt aus diesen Befunden, daß ein wirklich polyvalentes Serum nur dann erzeugt werden kann, wenn man bei der Immunisierung diesen Verschiedenheiten der Pneumokokkenstämmen in immunisatorischer Beziehung Rechnung trägt und nicht eine Reihe beliebiger Pneumokokkenstämmen zur Behandlung der Tiere benutzt. Es läßt sich mit atypischen Stämmen ebensogut ein wirksames Serum gewinnen wie mit den anderen Stämmen. Das auf diese Weise hergestellte Serum ist dann wieder nur wirksam gegen den atypischen Stamm oder solche fremde Kulturen, welche in die betreffende Gruppe gehören. Bisher konnten drei verschiedene Varietäten von Pneumokokkenstämmen ermittelt werden (Neufeld und Händel). Der Typus der Pneumokokkenkulturen scheint sich nach den genannten Autoren trotz zahlreicher Tierpassagen und jahrelanger Aufbewahrung nicht zu verändern. Ebenso wie die Schutzwirkung der Pneumokokkenserum scheint sich auch die Agglutinationswirkung nur auf Pneumokokkenkulturen desselben Typus zu erstrecken. Es ist dies sehr wichtig für die Auswahl der Stämme, die man zur Immunisierung benutzen will, weil man sie dadurch von vornherein differenzieren kann, ohne Tierversuche anstellen zu müssen.

Die Reaktionen, welche auf die Injektionen von Pneumokokken auftreten, sind bei intravenöser Applikation Fieber, Mattigkeit, Freßunlust und Gewichtsabnahme. Bei fortgesetzter intravenöser Zufuhr der Kulturen kommt es nicht selten zu Affektionen

der Gelenke und Sehnenscheiden sowie chronischen Erkrankungen des Herzens. Die subkutane Einspritzung verursacht neben der Allgemeinreaktion, die geringgradiger ist als die bei intravenöser Vorbehandlung, an der Injektionsstelle mehr oder minder starkes Ödem und zuweilen Abszesse (Washbourn).

Der beste Zeitpunkt für die Blutentnahme zwecks Gewinnung des Serums liegt zwischen zwei bis drei Wochen nach Ablauf der Reaktion auf die letzte Einverleibung von Pneumokokken. Nach Tizzoni und Panichi sollen die Antikörper im Blute in maximaler Anhäufung nur während einer kurzen Zeit vorhanden sein.

Die Prüfung des Wirkungswertes des Pneumokokkenserums wird an weißen Mäusen vorgenommen. Die ursprüngliche Wertbemessungsmethode von Landmann bestand darin, daß das Serum Mäusen in fallenden Mengen subkutan und 24 Stunden später die 10-fach, 100-fach und 1000-fach tödliche Kulturdosis intraperitoneal gegeben wurde. Landmann bezeichnete ein Serum als einfach oder normal, wenn 0,01 ccm davon eine Maus gegen die 24 Stunden nachher erfolgte 10- bis 100-fache tödliche Dosis lebender Kultur schützte. 1 ccm eines solchen Serums enthält also 1 I.-E. Das zu prüfende Serum wird in seiner Wirkung mit einem Standardserum von bekanntem Werte verglichen. Das Serum wurde im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. in dieser Weise staatlich geprüft, doch hat man die provisorische staatliche Prüfung wieder aufgegeben mangels einer unveränderlichen bestimmten Virulenz der Pneumokokkenskulturen. Vor der eigentlichen Serumprüfung stellt Landmann jetzt in einem Versuch zunächst die einfach tödliche Dosis der Prüfungskultur fest, indem er mit jeder Kulturverdünnung drei Mäuse spritzt. Das zu prüfende Serum wird subkutan in abgestuften Mengen je fünf Mäusen injiziert, um so etwaige Unregelmäßigkeiten auszuschließen. 24 Stunden nachher werden die Mäuse mit der 1000-fach tödlichen Kulturdosis intraperitoneal infiziert. Je drei Kontrollmäuse erhalten die einfache bis 100-fache tödliche Kulturdosis intraperitoneal. Sie müssen der Infektion in 24 bzw. 48 Stunden erliegen.

Nach dieser Prüfung ist Pneumokokkenserum I knapp 30-fach, Pneumokokkenserum II 30-fach, Pneumokokkenserum III 20-fach.

Serumprüfung nach Landmann (Otto und Boehneke).

Normalität des Serums	Serummenge ccm	Kultur- verdünnungsgrade ccm	Pneumokokken- serum I*)	Pneumokokken- serum II	Pneumokokken- serum III
20-fach	0,000 5	0,000 03	—	—	—
	0,000 5	0,000 03	—	—	—
	0,000 5	0,000 03	†	—	—
	0,000 5	0,000 03	—	—	—
	0,000 5	0,000 03	—	—	—
30-fach	0,000 33	0,000 03	—	—	†
	0,000 33	0,000 03	—	—	†
	0,000 33	0,000 03	†	—	—
	0,000 33	0,000 03	—	—	—
	0,000 33	0,000 03	—	—	—
40-fach	0,000 25	0,000 03	—	—	†
	0,000 25	0,000 03	—	—	†
	0,000 25	0,000 03	†	†	—
	0,000 25	0,000 03	—	—	—
	0,000 25	0,000 03	—	—	—

*) — = lebt, † = tot.

Verdünnungsgrade der Kultur ccm	Kontroll- mäuse	Verdünnungsgrade der Kultur ccm	Kontroll- mäuse	Verdünnungsgrade der Kultur ccm	Kontroll- mäuse
0,000 003	†	0,000 000 3	†	0,000 000 03	†
0,000 003	†	0,000 000 3	†	0,000 000 03	—
0,000 003	†	0,000 000 3	†	0,000 000 03	†

Nach Otto und Boehncke bestimmt auch Ruppel vor der Titrierung des Pneumokokkenserums die Virulenz der Prüfungskultur. Von den 24-stündigen Serumbouillonkulturen werden Verdünnungen 1:5, 1:50, 1:125, 1:250, 1:500, 1:5000 hergestellt und von jeder Verdünnung einer weißen Maus von 15 bis 20 g Gewicht 0,5 ccm intraperitoneal einverleibt. Alle innerhalb fünf Tagen eingehenden Mäuse werden als positiv gerechnet. Die Wertbemessung des Pneumokokkenserums erfolgt gegen konstante und gegen wechselnde Kulturmengen. Bei ersterer Prüfungsweise erhalten die weißen Mäuse je 1 ccm folgender Serumverdünnungen: 1:10, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 subkutan und 24 Stunden danach die zehnfache aus dem Vorversuch ermittelte tödliche Kulturmenge intraperitoneal. Bei der zweiten Prüfungsart erhalten sechs Mäuse eine subkutane Injektion von 0,1 ccm Serum (1,0 einer Verdünnung 1:10). Die intraperitoneale Infektion wird 24 Stunden darauf vorgenommen, und zwar spritzt man jeder Maus je 0,5 ccm einer Kulturverdünnung ein: 1:10, 1:100, 1:125, 1:250, 1:500, 1:5000.

Neufeld und Händel benutzen zur Prüfung des nach ihren Angaben hergestellten Serums Kulturen, die von menschlichen Erkrankungen stammen und für Kaninchen und besonders weiße Mäuse sehr virulent sind. Eine sichere Virulenzhaltung, die monatelang bestehen bleibt, wird dadurch erreicht, daß man Organstücke von Tieren, die an Pneumokokkeninfektionen gestorben sind, in dicker Schicht im Exsikkator aufbewahrt. Benötigt man eine Prüfungskultur, so wird das getrocknete Material mit etwas Bouillon (0,25 ccm) im Achatmörser fein zerrieben und einer Maus oder einem Kaninchen injiziert. Aus dem Herzblut erhält man in 10 proz. Rinderserumbouillon eine Kultur von derselben Virulenz wie der der Ursprungskultur. Die Prüfung geschieht unter Zuhilfenahme eines Standardserums von bekanntem Wirkungswert mit gleichbleibenden Serumgaben gegen steigende Kulturmengen. Um Zufälligkeiten zu vermeiden, sollen die Versuchsreihen möglichst doppelt angesetzt werden. Serum und Kultur werden am besten intraperitoneal injiziert. Doch sind die Ergebnisse fast ebensogut, wenn die Infektion 24 Stunden nach der subkutanen Vorbehandlung intraperitoneal vorgenommen wird. Das Serum wird hauptsächlich gegen große und mittlere Infektionsdosen geprüft. — Zunächst wird diejenige Serummenge bestimmt, welche

den sogenannten Schwellenwert eines Pneumokokkenserums darstellt. Neufeld und Händel, sowie Ungermann und Kandiba haben nämlich gefunden, daß die Serumwirkung gegenüber Pneumokokken (Streptokokken und Rotlaufbazillen) bei einem bestimmten Verhältnis der Serummenge zum Körpergewicht bald einen gewissen Höhepunkt erreicht. Oberhalb dieses Schwellenwertes schützt das Serum gegen sehr große Multipla der einfach tödlichen Dosis, unterhalb desselben nimmt bei Verringerung der Serummenge die Schutzwirkung rasch ab, um bald fast völlig zu erlöschen. Die Eichung beginnt mit einer höheren Serumdosis, z. B. 0,2 ccm gegen eine größere Dosis einer 24-stündigen Kultur, von der 0,000 001 ccm bei intraperitonealer Infektion Mäuse von 20 g Körpergewicht innerhalb 24 bis 48 Stunden sicher tötet. Vier weißen Mäusen von 20 g werden je 0,2 ccm des Serums intraperitoneal gegeben. Zwei bis drei Stunden später erhalten die Tierchen gleichfalls intraperitoneal 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 ccm der Prüfungskultur. Die Infektionsdosen werden mit Bouillon auf 0,2 ergänzt. Die Kontrollmäuse (ohne Serumeinspritzung) erhalten 0,0001, 0,000 01 und 0,000 001 ccm Kultur intraperitoneal. Die Kontrollen müssen der Infektion innerhalb 48 Stunden erliegen. 0,2 ccm des Serums müssen gegen 0,01 bis 0,1 ccm Pneumokokkenkultur schützen. Hat ein Serum diese Schutzwirkung nach 48 Stunden (Beobachtungszeit der Prüfungsreihen), so soll es auch in geringeren Mengen, z. B. 0,05 und 0,02 ccm, geprüft werden. Doch soll man mit den Serumdosen nicht zu weit heruntergehen, weil dann die Mäusereihen trotz kleinster konstanter Kulturdosis ganz ungleichmäßig ausfallen. Die Autoren erklären diese eigenartigen quantitativen Verhältnisse damit, daß für das Pneumokokkenserum das Gesetz der Multipla keine Geltung hat. Die zum Schutze erforderlichen Serum mengen steigen bzw. fallen sehr viel langsamer als die Kultur Dosen.

In folgender Tabelle sind drei verschiedene Versuche zusammengefaßt. Im ersten Versuch ist das Pferdeserum R II zusammen mit der Probe R I in doppelten Reihen geprüft. Die bereits mehrfach untersuchte Probe R I dient dabei als Standardserum. Das Serum R II ist also mindestens dem anderen gleichwertig. In einer Dosis von 0,01 ccm haben beide noch hohen Schutzwert.

Im Versuch 2 sind zwei hochwertige Serumproben des Pferdes R miteinander, im Versuch 3 eine dieser Proben mit zwei anderen

Prüfung eines Pneumokokkenserums (nach Neufeld und Händel).

Versuch	Serumdosen in ccm	Pneumokokkenbouillonkultur in ccm						
		0,2	0,1	0,01	0,001	0,0001		
1.	0,05 Pferd R I	.	††	00	00	00	} 2 Tiere für jede Dosis	
	0,02 "	.	††	00	00	00		
	0,01 "	.	††	00	00	00		
	0,05 Pferd R II	.	00	00	00	00		
	0,02 "	.	††	00	00	00		
	0,01 "	.	††	00	00	00		
2.	0,03 Pferd R I	.	††	00	00	00	} 2 Tiere für jede Dosis	
	0,01 "	.	††	00	00	00		
	0,003 "	.	††	0†	00	00		
	0,03 Pferd R III	.	††	00	00	00		
	0,01 "	.	††	00	00	00		
	0,003 "	.	††	††	00	00		
3.	0,2 Pferd R II	0	0	0	0	0	} 1 Tier für jede Dosis	
	0,05 "	.	0	0	0	0		
	0,02 "	.	0	0	0	0		
	0,01 "	.	†	0	0	0		
	0,2 Esel I	0	0	0	0	0		
	0,05 "	.	†	†	†	†		
	0,02 "	.	†	†	†	†		
	0,01 "	.	†	†	†	†		
	0,2 Pferd S	†	0	0	0	0		
	0,05 "	.	†	†	†	†		
0,02 "	.	†	†	†	†			
0,01 "	.	†	†	†	†			

Kontrollmäuse in allen drei Versuchen mit 0,000001 †. † = innerhalb 48 Stunden gestorben. 0 = nach 48 Stunden überlebend.

schwächeren Pneumokokkenserum (von Pferd S und Esel I) verglichen. Die letzteren zwei Seren wirken nur in der Menge von 0,2 ccm sehr gut. Im letzten Versuch ist mit der Kulturdosis höher als gewöhnlich, nämlich bis 0,2 gestiegen worden.

Nach Ansicht der meisten Forscher sind die phagozytosebefördernden Antikörper von wesentlicher Bedeutung für die spezifische Wirkung des Pneumokokkenserums. Neufeld und Händel sehen in den bakteriotropen Substanzen die eigentlichen Träger der Wirksamkeit des Serums.

Literatur: Kindborg, Zentralbl. f. Bakt. **32**. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. **51**. Landmann, Deutsche med. Wochenschr. 1908. Levy und Aoki, Ztschr. f. Immunitätsf. **7**. Mennes, Ztschr. f. Hyg. **25**. Neufeld und Händel, Ztschr. f. Immunitätsf. **3**. Dieselben, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt **34**. Dieselben, Berl. klin. Wochenschr. 1912. Neufeld und Rimpau, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. 1905. Neufeld, Ztschr. f. Hyg. 1900, 1901 und 1902. Neufeld und Händel, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Otto und Boehncke, ebenda. Pane, Zentralbl. f. Bakt. **21**. Derselbe, Rif. med. 1897 u. 1898. Römer, Arch. f. Augenheilk. 1905. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1908 u. 1909. Derselbe, Ber. d. 3. Tagung der freien Ver. f. Mikrobiologie in Wien 1908. Derselbe, Experiment. u. klin. Grundlage f. d. Serumtherapie d. Pneumokokkeninfekt. d. menschl. Cornea. Wiesbaden 1909. Tizzoni und Panichi, R. accad. d. sc. Bologna 1903. Dieselben, Bull. d. sc. med. 1903. Dieselben, Journ. méd. de Bruxelles 1905. Dieselben, Mem. d. R. accad. d. sc. dell' istituto di Bologna 1906. Washbourn, Journ. of pathol. and bact. 1894 u. 1895. Derselbe, Brit. med. journ. 1897. Derselbe, Lancet 1902. Weichselbaum, Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1904.

Rabizides Serum (Lyssaserum).

Zur Herstellung des Serums gegen Lyssavirus (Tollwut) können Pferde, Esel, Hunde und Schafe Verwendung finden.

Die Grundimmunität kann erzielt werden durch Vorbehandlung nach der Pasteurschen Methode (Babes und seine Mitarbeiter, Kraus), nach der Methode von Högyes (Kraus) und nach dem sogenannten italienischen Verfahren. Es sind ungefähr alle Immunisierungsarten, welche einen aktiven Schutz gegen Tollwut hervorrufen, geeignet, rabizide Körper zu produzieren. Die Zahl dieser Immunkörper hängt wie bei den anderen Antikörpern ab von der Menge des einverleibten Infektionsstoffes und der Dauer der Immunisierung. Nach Schaffung der Grundimmunität wird den Tieren tollwuthaltiges Material in größeren Mengen und bestimmten

Zwischenzeiten subkutan injiziert. Die Frage, ob Straßenvirus oder Virus fixe sich besser zur Erlangung eines gut wirksamen rabiziden Serums eignen, ist noch nicht geklärt. Als bestes Immunisierungsverfahren geben Tizzoni und Centanni die wiederholte Behandlung mit verdaulichem Virus an, $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ g pro Kilogramm Körpergewicht alle acht bis zehn Tage und nachträgliche Einverleibung virulenter Substanz; vier Injektionen.

Der Aderlaß zur Gewinnung des Serums wird 20 bis 25 Tage nach der letzten Injektion gemacht (Babes, Tizzoni und Centanni). Auch Kraus und Kreissl haben bestätigt, daß die Antikörper gegen Lyssa später entstehen als die bakteriellen.

Zur Wertbemessung dienen Kaninchen. Babes stuft in seinen Mischversuchen *in vitro* die Serummengen ab und gibt gleiche Dosen Virus fixe, oder zu fallenden Mengen Virus fixe-Emulsionen werden gleiche Serummengen zugesetzt.

Tizzoni und Centanni mischen eine bestimmte Menge Virus fixe mit verschiedenen Serumdosen, lassen 24 Stunden stehen und injizieren damit Kaninchen subdural.

Kraus und seine Mitarbeiter legen besonderen Wert auf die Gleichmäßigkeit der Virusemulsion. Wegen der schwankenden Virulenz lassen auch sie Straßenvirus unberücksichtigt und verwenden nur Virus fixe. Als Viruseinheit gilt 1 ccm einer Emulsion Virus fixe 1 : 100. Die Emulsion muß durch Papier filtriert werden zur Entfernung größerer Partikelchen, die viel unmeßbares Virus enthalten. Abfallende Mengen des zu prüfenden Serums werden mit 1 ccm dieser Giftemulsion 1 : 100 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und davon etwa 0,1 bis 0,2 Kaninchen subdural eingespritzt.

Erwärmung auf 58 und 64° macht das Lyssaserum nicht unwirksam.

Literatur: Babes und Lepp, Ann. de l'Inst. Pasteur 1889. Babes und Cerchez, ebenda 1891. Fermi, Zentralbl. f. Bakt. 1908. Kraus und Kreissl, ebenda 1907. Kraus und Maresch, Ztschr. f. Hyg. **41**. Kraus, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2** (1909). Marie, ebenda 1911. Derselbe, Ann. de l'Inst. Pasteur 1905, 1908.

Rinderpestserum.

Bei der Auswahl der Rinder, von denen das Rinderpestserum gewonnen wird, ist besonders darauf zu achten, daß sie frei von

chronischen Infektionskrankheiten des Blutes sind, die durch den Immunisierungsprozeß florid werden und den Tod der Versuchstiere verschulden können. Die gefürchtetste Infektionskrankheit dieser Art ist das durch Piroplasmen bedingte Texasfieber. Man vermeidet daher die Einstellung von Rindern, die aus texasfieberverseuchten Gegenden stammen. Jedenfalls hat vor der Erzeugung der Grundimmunität eine genaue Untersuchung des Blutes auf Piroplasmen zu erfolgen. Am besten schützt man sich gegen die Blutinfektionskrankheiten, wie Texasfieber, Küstenfieber und tropische Piroplasmen dadurch, daß man Rinder, die aus Gegenden kommen, wo solche Krankheiten herrschen, von der Immunisierung gegen Rinderpest ausschließt. Ferner müssen die Rinder einer Rasse angehören, die eine gewisse Empfänglichkeit für das Rinderpestvirus besitzen. Am geeignetsten sind ältere ausgewachsene Rinder.

Der Infektionsstoff der Rinderpest ist unbekannt und nicht auf künstlichen Nährböden züchtbar. Er ist in großen Mengen im Blute rinderpestkranker Tiere vorhanden. Man gewinnt daher das Virus durch Fortimpfung auf gesunde Rinder. Die Auswahl der virusliefernden Tiere hat unter denselben Gesichtspunkten zu geschehen, wie sie zur Gewinnung des Pestserums nötig sind. Koch fand einen Ausweg, die gefürchteten Blutinfektionskrankheiten auszuschließen dadurch, daß er entdeckte, daß Schafe für den Infektionsstoff der Rinderpest empfänglich sind. Die Schafe sind aber refraktär gegen die erwähnten unerwünschten Blutinfektionskrankheiten der Rinder. Durch Passage des Pestvirus durch Schafe, die der Infektion nicht zu erliegen pflegen, wird auch die Virulenz des Pestblutes für Rinder erhöht. Die Tiere, von welchen der Infektionsstoff genommen werden soll, erhalten $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{20}$ ccm virulenten Blutes subkutan. Am dritten Tage nach Beginn des Fiebers, es ist dies der fünfte oder sechste Tag nach der subkutanen Infektion, werden die Tiere unter aseptischen Kautelen entblutet. Das Blut wird entweder defibriniert, oder man verhindert die Gerinnung durch Zusatz von Natriumzitat. 1 Proz. Natriumzitat bedingt innerhalb 24 Stunden keine wesentliche Abschwächung des virulenten Blutes. Das Blut, welches nur den Rinderpesterreger enthält, wird möglichst frisch zur Immunisierung verwendet. Die Applikationsweise ist die subkutane. Abszesse infolge der Einspritzung unter die Haut werden vermieden, wenn größere Virusmengen auf möglichst viele Stellen verteilt werden.

Die Schaffung einer Grundimmunität wird meist nach der Methode von Kolle und Turner mittels der Simultanimpfung erreicht. Die Rinder bekommen auf der einen Seite 1 ccm des infektiösen Blutes und auf der anderen Seite eine bestimmte Dosis Immuneserum injiziert. Dadurch machen die Tiere eine leichte Rinderpesterkrankung durch und werden immun. Obwohl das Serum dieser Rinder nun eine spezifische Schutzkraft besitzt, ist dieselbe für den praktischen Gebrauch zur Immunisierung oder zur Heilung nach allgemeinen Erfahrungen nicht groß genug. Pitchford und Theiler verstärkten den Immunkörpergehalt der Tiere dadurch, daß sie 10 bis 14 Tage nach völliger Genesung von der Simultanimpfung denselben 100 bis 200 ccm virushaltigen Blutes subkutan gaben. In derselben Weise gehen Bordet und Danysz vor. Eine systematische Hochtreibung der Immunität versuchten zuerst Kolle und Turner, indem sie sich die Methoden von Ehrlich und seinen Mitarbeitern zur Gewinnung des Diphtherie- und Tetanusserums zu eigen machten. Nachdem sich die Rinder vollständig von der durch die Simultanimpfung verursachten Krankheit erholt haben, erhalten sie als erste Gabe zur Weiterimmunisierung 100 ccm infektiösen Blutes, ungefähr acht Tage nach Rückkehr der Temperatursteigerung, die auf die erste Virusinjektion gefolgt ist, zur Norm erhöhen sie die Impfmenge auf 200 ccm. In denselben Zwischenzeiten wird dann die Injektion virulenten Blutes wiederholt und die Dosis auf 300 bis 400 bis 500 ccm und mehr gesteigert. Sobald das Tier 1000 ccm erhalten hat, die eine gute Reaktion zur Folge hatten, wird zum erstenmal Blut entzogen und an je drei aufeinanderfolgenden Tagen je ein Aderlaß von 4500 ccm Blut gemacht. Darauf wird nochmals eine große Impfdosis verabreicht und wiederum zwecks Serumdarstellung zweimal zur Blutabzapfung geschritten.

Nicolle und Adilbey geben nach Erzeugung der Grundimmunität den Rindern 8 bis 14 Tage später 4000 bis 5000 ccm Rinderpestvirus zugleich mit einer neuerlichen Serumgabe von 20 bis 30 ccm. Ähnlich immunisierte Dudukalow, und auch Bitter und Todd machen nur zwei Injektionen zur Hochtreibung der Immunität. In 14-tägigen Intervallen spritzten sie nach Wiedergenesung der Rinder von der Simultanimpfung zweimal je 4000 ccm virulenten Blutes. In weiteren Zwischenzeiten von 14 Tagen werden die Tiere dreimal zu Ader gelassen. Bei jedem Aderlaß werden

je 4 Liter Blut entzogen. Sodann beginnt die Behandlung zur Wiederherstellung der Schutzkraft des Serums von neuem in gleicher Weise.

Auf die Einverleibung kleinerer und größerer Mengen des Infektionsstoffes reagieren die Tiere fast immer mit allgemeinen und lokalen Erscheinungen. Wenn es sich um reine Reaktionen auf die Einspritzung von Pestvirus handelt, so ist die Temperatur, die 18 bis 36 Stunden erhöht ist, wieder normal, ebenso müssen die anderen Allgemeinerscheinungen, wie Mattigkeit und Freßlust, in dieser Zeit verschwunden sein. An der Injektionsstelle treten mehr oder minder starke Infiltrationen auf, die sich in zwei bis drei Tagen wieder zurückbilden. Es werden nur die Tiere in Intervallen von 8 bis 14 Tagen weiterbehandelt, welche wieder völlig gesund sind.

Der beste Zeitpunkt für die Blutentnahme ist die Zeit zwischen 10 und 14 Tagen nach der letzten Injektion von Rinderpestvirus. Nach drei Aderlässen müssen die Rinder wegen des raschen Absinkens ihres Serumwertes durch die Blutentziehung aufs neue immunisiert werden.

Die praktische Wertbemessung des Rinderpestserums ist nur an Rindern möglich. Zur Wertbemessung des Serums kommen nur gesunde, für das Virus völlig empfängliche Tiere in Betracht. Die Titrierung geschieht nach Kolle in folgender Weise: 10 bis 12 Tiere von möglichst gleicher kräftiger Konstitution und gleichem Körpergewicht und in nicht zu junglichem Alter erhalten in verschiedenen Gruppen abgestufte Mengen Serum und zu gleicher Zeit 1 ccm virulenten Pestblutes injiziert. Die Serumdosis wird immer entsprechend 300 kg Lebendgewicht gegeben. Es werden gegeben drei Tieren 15 ccm, drei Tieren 20 ccm, drei Tieren 25 ccm und drei weiteren Rindern 30 ccm des zu prüfenden Serums. Wie die Erfahrung gelehrt hat, gelingt eine Eichung nach diesem Verfahren leicht. Die Serumdosis, welche die Rinder vor dem Tode zu retten vermag, gibt den Titer des Serums an. Sterben z. B. von den Tieren, welche 15 ccm Serum erhalten haben, alle oder nur zwei davon, so beträgt der Wert des Serums 20 ccm. Die Versuchsgruppe mit der Dosis von 20 ccm kommt mit dem Leben davon, die mit der Serumdosis von 25 ccm wird dann nur leicht krank, und die Tiere der letzten Serie erkranken überhaupt nicht.

Das Rinderpestserum behält sehr lange seine spezifische Wirksamkeit, nach Kolle fast fünf Jahre unverändert.

Literatur: Dieckerhoff, Geschichte der Rinderpest und ihre Literatur. Berlin 1890. Koch, Zentralbl. f. Bakt. **21**. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Derselbe, Reiseberichte, Berlin 1898. Kolle, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1899. Derselbe, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2** (1909). Derselbe, Rinderpest. Ergebnisse der allgem. Pathologie usw. von Lubarsch und Ostertag 1901. Kolle und Turner, Deutsche med. Wochenschr. 1897. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **29**. Nicolle und Adil-Bey, Ann. de l'Inst. Pasteur 1899. Rogers, Ztschr. f. Hyg. 1900. Theiler, Schweizer Arch. f. Tierheilk. **39**. Derselbe, Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 1890.

Schafpocken Serum.

Das Serum gegen die Schafpocken liefern Schafe, die mit dem Virus der Pocken behandelt worden sind. Der Schafpockenreger ist ein gewisse Filter passierendes Agens, welches wie die anderen Virusarten dieser Art bisher noch nicht gezüchtet werden konnte. Man ist darauf angewiesen, sich das Virus durch Fortzüchtung auf Tiere zu beschaffen. Nach Borrel hat sich folgende Methode der Lymphgewinnung zum Zwecke der Immunisierung als praktisch erwiesen:

1 ccm eines reinen, von einer gewöhnlichen Pustel herführendes Virus wird mit 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. 300 bis 400 ccm dieser Mischung werden mit einer langen Kanüle unter die sorgfältig rasierte Haut am Bauche eines jungen Schafes geimpft. Durch Hin- und Herschieben der Nadel in verschiedenen Richtungen wird das Virus möglichst gleichmäßig verteilt. Bis zur vollständigen Resorption bleibt das Tier noch auf dem Operationstisch (etwa eine Stunde) liegen. Die Pustelbildung beginnt am Ende des vierten Tages; es tritt an der Injektionsstelle eine ausgebreitete leichte Schwellung auf und erreicht ihren Höhepunkt am achten Tage. Das Tier wird jetzt durch Stich in die Medulla oblongata getötet, und die Verarbeitung der Pustel geschieht folgendermaßen: Um die ganze affizierte Hautpartie wird mit dem Thermokauter ein Ring gezogen und die eingeschlossene Haut bis auf das Stratum Malpighii abgetragen. Die so entstandene Wundfläche wird mit dem scharfen Löffel abgeschabt und die heraustretende Flüssigkeit mit der Pipette aufgesaugt. Das ganze ödematöse Gewebe wird darauf bis zur Muskelfaszie ab-

präpariert und zerrieben. Man läßt das Gewebe so lange in einem besonderen Zerreibungsapparat, bis sich eine bestimmte Menge (100 ccm von einem Schafe) Preßsaft gebildet hat. Nun laugt man das Gewebe mit physiologischer Kochsalzlösung aus, indem man immer neue Mengen Spülflüssigkeit in den Zerreibungsapparat zugibt. Der reine Preßsaft wird mit dem ersten Liter Spülwasser als Lymphe aufbewahrt und stellt das „Claveau“ Borreels dar. Alles übrige Spülwasser, das zum Ausziehen des Virus gedient hat, wird zur Herstellung des Serums benutzt. Das Schafpockenvirus wird sehr rasch abgeschwächt und muß daher in zugeschmolzenen Röhren auf Eis gehalten werden.

Zur Gewinnung des Serums behandelt man Schafe, die eine schwerere Infektion überstanden haben und sich wieder guter Gesundheit erfreuen, mit subkutanen Einspritzungen des auf die beschriebene Weise hergestellten Virus. Das Injektionsmaterial muß von anderen Krankheitskeimen frei sein. Man spritzt den Tieren 200 bis 500 ccm Virus dieser Art unter die Bauchhaut und wiederholt die Injektionen unter Steigerung der Dosen in Intervallen von 14 Tagen. Nach fünf bis sechs Einspritzungen ist das Serum der Schafe meist genügend wirksam, und die Tiere können entblutet werden.

Beispiel einer erfolgreich durchgeführten Immunisierung nach Borrel.

Datum	Injektions- mengen Virus	Bemerkungen
15. Juli	200 ccm	Starkes Ödem, das sich nach 10 Tagen vollständig zurückgebildet hat.
30. "	200 "	Großes Ödem, nach 6 bis 8 Tagen verschwunden.
15. Aug.	300 "	Geringgradiges Ödem, wird rasch resorbiert.
30. "	300 "	Kein Ödem.
15. Sept.	300 "	" "
		22. Sept. Aderlaß von 500 ccm
		27. " " " 300 "
30. "	300 "	Geringes Ödem.
		7. Oktober Blutentnahme.

Nach Borreels Erfahrungen liefert ein Hammel mit Leichtigkeit 1 Liter Blut im Monat. Nach einer oder zwei Blutentziehungen wird der Immunkörpergehalt des Blutes wieder in die Höhe getrieben.

Ein Hammel gibt genügend Virus zur Immunisierung von zwölf Seruntieren (Borrel).

Die Prüfung des Wirkungswertes des Schafpockenserums wird am Hammel vorgenommen, und zwar wird das Serum entweder mit der Viruslösung vorher im Reagenzglas gemischt oder es wird den Tieren zuerst das Serum gegeben und 24 Stunden später das Virus injiziert. Die Giftlösung wird so dargestellt, daß man einer Pustel 1 ccm Inhalt entnimmt und diesen mit 150 ccm Nährbouillon mischt und durch Papier filtriert. Ein Tropfen dieser Verdünnung, die stets frisch bereitet wird, genügt, um eine enorme Pustel zu erzeugen.

Zum Mischversuch wird je 1 ccm des Filtrats mit 1,0, 0,5, 0,25 ccm, drei Tropfen, zwei und einem Tropfen Serum gemischt und je einem Hammel injiziert. Die Kontrolltiere erhalten nur das Virus. 0,5 ccm des wirksamen Serums verhindert jede Reaktion.

Zur Titrierung ohne vorherige Mischung *in vitro* werden den Schafen verschiedene Mengen reinen Serums (2 bis 20 ccm) subkutan einverleibt. Am nächsten Tage erhalten die Seruntiere mit einigen Kontrollhammeln je 1 ccm der vorhin erwähnten Virus-emulsion subkutan. Erfahrungsgemäß verhüten bei dieser Prüfungsart des Serums schon 2 ccm eine Allgemeininfektion, während Dosen von 15 bis 20 ccm Serum auch die lokale Pustelbildung verhindern.

Literatur: Borrel, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902. Derselbe, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903. Bosc, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902, 1905. Derselbe, Compt. rend. de l'Acad. des Sciences 1902. Levaditi, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 2 (1909). Martel, Bull. de la Soc. centrale de méd. vétérin. 1903.

Schweinepestserum.

Das serumliefernde Tier ist das Schwein. Andere Tierarten, von denen eine größere Serummenge zu erhalten wäre, sind unbrauchbar, weil sie die Injektion mit Schweinepestvirus zu wiederholten Malen nicht vertragen. Das Virus der Schweinepest ist unbekannt und bisher noch nicht kultivierbar. Man ist also gezwungen, hauptsächlich Blut und Organextrakte vom Schweine zur Immunisierung zu verwenden. In größeren Mengen anderen Tieren wie Pferden, Eseln, Rindern und Ziegen intravenös einverleibt, ist das Schweineeiweiß so giftig, daß die Tiere häufig gleich bei der ersten Injektion zugrunde gehen. Wird aber öfter in kleineren

Dosen immunisiert, so treten auf das artfremde Eiweiß die unangenehmen Erscheinungen der Anaphylaxie auf. Auch bilden sich gegen das eingespritzte Blut hier unerwünschte Antikörper (Hämolyse, Präzipitine, Agglutinine), die eine weitere Steigerung der Virusdosen unmöglich machen. Alle Versuche, das Virus aus dem Blut und den Organen der Schweine eiweißfrei zu gewinnen, sind fehlgeschlagen. Notgezwungen mußte man daher das weniger blutreiche Schwein zur Herstellung des Pestserums im großen benutzen.

Die Vorbehandlung der Schweine kann auf subkutanem, intraperitonealem, intravenösem und intramuskulärem Wege geschehen. Dorset bevorzugt die subkutane Injektionsweise, Uhlenhuth und Hübener erhielten bessere Resultate, wenn sie die Einspritzungen in die Vene vornahmen. Als Injektionsmaterial dienen defibriniertes Blut, Serum, Organsaft, Galle und Urin, in welchen das Virus der Schweinepest enthalten ist. Man verwendet am besten immer frisches Virus zur Vorbehandlung der Schweine, welches man von schwerkranken oder eben verendeten Schweinen gewinnt, wiewohl sich das Schweinepestvirus, vor Fäulnis geschützt aufbewahrt, lange Zeit im Eisschrank vollvirulent erhält. Am zweckmäßigsten wird man zur Serumdarstellung ältere Schweine vorziehen, die die spontane Pestinfektion überstanden haben und wieder völlig gesund sind. So kann man, ohne Impfverluste befürchten zu müssen, gleich größere Dosen Virus injizieren. Sonst kann eine Grundimmunität durch Einverleibung von Immuserum und kleinen Mengen Virus bei normalen Schweinen geschaffen werden.

Dorset hat sich zwei Behandlungsmethoden in Amerika und Frankreich patentieren lassen. Bei beiden Immunisierungsarten werden den Schweinen, die einen auf natürlichem oder künstlichem Wege erworbenen Schutz gegen Schweinepest haben, zur Erzeugung einer Grundimmunität 20 ccm Virus eingespritzt. Sodann beginnt die eigentliche Behandlung zur Erlangung eines wirksamen Serums.

Bei der schnellen Methode (quick method) erhalten die Schweine auf einmal — auf 50 kg Körpergewicht berechnet — 1000 ccm defibriniertes Pestblut subkutan injiziert. Genau drei Wochen später wird den Tieren dann soviel wie möglich Blut entnommen. Der Aderlaß wird in Zwischenräumen von sieben bis

acht Tagen dreimal wiederholt. Meistens wird ein Monat nach dem dritten Aderlaß noch ein vierter vorgenommen.

Bei der langsamen Methode (slow method) werden die Tiere dreimal mit ansteigenden Mengen defibrinierten Blutes vorbehandelt. Die erste Dosis beträgt 100 ccm Virus, die zweite, welche nach 10 bis 14 Tagen gegeben wird, 250 ccm, die letzte Dose von 500 ccm wird nach etwa zwölf Tagen injiziert. Alle Dosen sind auf 50 kg Körpergewicht berechnet. Neun bis zehn Tage nach der dritten Injektion wird Blut abgezapft und diese Blutentziehung zwei- bis dreimal wiederholt. Von 13 in dieser Weise vorbehandelten Schweinen haben 12 ein gut wirksames Serum geliefert.

Der Wert der Sera war fast stets der gleiche, jedoch ein wenig besser bei der schnellen Methode, welche auch als rationell für die Praxis empfohlen wird. Statt der wiederholten Aderlässe aus dem Schwanz kann auch das Blut auf einmal entzogen werden durch Einführen einer Kanüle in das Herz.

Bei den wiederholten Aderlässen wird das Blut, solange es wirksam ist, entnommen, und dann werden durch erneute Injektionen von Virus die Immunsubstanzen im Blute wieder angehäuft.

Uhlenhuth und Hübener empfehlen, den serumspendenden Tieren das keimfrei filtrierte Blutserum oder den keimfrei filtrierten Organsaft intravenös, in die Ohrvene, zu geben. Größere Schweine, welche in natürlicher oder künstlicher Weise eine Immunität gegen Schweinepest erworben haben, bekommen in etwa 14-tägigen Intervallen fünf- bis sechsmal möglichst frisches, von schwerkranken Schweinen stammendes Virus injiziert. Die Anfangsdosis beträgt 50 bis 60 ccm keimfreies Serumfiltrat. Bei jeder folgenden Injektion wird um dieselbe Menge gestiegen. Zur Vermeidung von unangenehmen Zwischenfällen ist es besser, bei der Impfung großer Virusmengen diese in fraktionierten Dosen von nicht mehr als 100 ccm zu injizieren. Nach der vierten oder fünften Injektion wird aus Schwanz oder Ohr ein Aderlaß von 60 bis 100 ccm gemacht und das Serum auf seine Wirksamkeit an Ferkeln untersucht. Erweist sich das Serum als wirksam, so erhalten die Schweine noch eine Einspritzung und werden drei Wochen später zur Gewinnung des Serums durch vollständiges Entbluten getötet.

Häufig entstehen nach subkutaner Injektion von nicht keimfreiem Virus Infiltrationen und Abszesse. Wird nicht keimfrei filtriertes Serum oder Organsaft intravenös geimpft, so treten nicht

selten septikämische Erkrankungen auf, an denen viele Tiere zugrunde gehen. Andererseits schädigen sie die spezifische Antikörperproduktion ebenso wie die Abszesse. Auf die intravenöse Einverleibung keimfreien Materials reagieren die Schweine mit Fieber und bei großen Dosen mit starker Schlaptheit, von der sie sich aber bald erholen. Jedenfalls dürfen die Immunschweine erst dann weiterbehandelt werden, wenn sie sich völlig von der letzten Impfung erholt haben.

Die Prüfung des Serums wird nach Uhlenhuth und Hübener in der Weise vorgenommen, daß die mit dem Serum geimpften Ferkel der natürlichen Infektion ausgesetzt werden. Kleinere Laboratoriumstiere sind für das Schweinepestvirus nicht empfänglich und daher zur Prüfung nicht verwendbar. Die natürliche Infektion im Seuchenstall wird zur Wertbemessung des Schweinepestserums benutzt wegen der Unmöglichkeit, ein gleichmäßig infektiöses Virus bereit zu halten. Wir haben zurzeit absolut keine Anhaltspunkte dafür, ob viel oder wenig Virus im Blute eines pestkranken Schweines vorhanden ist. Vier Ferkel im Alter von sechs Wochen erhalten 5, 10, 20, 30 ccm Serum eingespritzt. Die mit den beiden höheren Serumdosen behandelten Schweine müssen im Seuchenstall mindestens vier Wochen lang gesund bleiben, während ein bis zwei Kontrollferkel, die normales Schweine-serum erhalten haben, prompt erkranken müssen.

Literatur: Dorset, Bureau of Animal Industry 1904, Zirkular 43. Dorset, Bryde und Niles, ebenda 1908, Bulletin 102. Joest, Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1904. Ostertag, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1906. Ostertag und Stadie, Zeitschr. f. Infektionskrankh. usw. der Haustiere 1907. Uhlenhuth und Hübener, Kraus-Levaditi, Handb. der Technik usw. 2 (1909). Uhlenhuth und Haendel, Kolle- v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913.

Schweinerotlaufserum.

Das Rotlaufserum wird im großen durch Immunisierung von Pferden und Rindern gewonnen. Als Injektionsweise wird gewöhnlich die intravenöse Einverleibung der Rotlaufkulturen gewählt. Wegen des schlechten Wachstums der Rotlaufbazillen auf festen Nährboden benutzt man meist Bouillonkulturen. Prettnier fordert, daß nicht nur vollvirulente Kulturen verwendet werden, sie müssen auch verschiedener Herkunft sein. Er benutzt zur Behandlung

der serumspendenden Tiere abwechselnd Bazillen von Mäuse-, Tauben- und Schweinepassagen, wodurch die Reaktionen größer und die Immunkörperbildung stärker werden soll. Da die Pferde und Rinder für Rotlauf wenig empfänglich sind, bietet die Immunisierung keine besonderen Schwierigkeiten. Man beginnt sofort mit der Injektion von 50 bis 100 ccm virulenter Bouillonkultur (Leclainche, Prettner), um in Zwischenräumen von acht bis zehn Tagen auf 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 ccm usw. zu steigen. Z. B. verfuhr Prettner bei der Immunisierung eines Pferdes in folgender Weise:

Datum	Kulturmenge	Datum	Kulturmenge
20. April . . .	100 ccm	1. Juni . . .	400 ccm
28. " . . .	200 "	8. " . . .	500 "
6. Mai . . .	300 "	15. " . . .	500 "
16. " . . .	200 "	24. " . . .	300 "
24. " . . .	300 "	30. " . . .	300 "

Der Serumtiter betrug dann 0,1 ccm (Maus).

Prettner behandelt Rinder auch intraperitoneal, weil intravenöse Injektionen bei älteren Rindern leicht Endokarditen hervorrufen. Im Landsberger Seruminstitut (Schreiber) wurde früher eine Mischung von Pferde- und Rinderimmunserum (Doppelserum) hergestellt, welches wegen der leichteren Komplettierung eine bessere Wirksamkeit entfalten soll, was jedoch von anderer Seite (Prettner) nicht bestätigt werden konnte. Von den hochimmunisierten Tieren werden in der üblichen Weise Blutentnahmen vorgenommen. Durch neuerliche Einspritzungen großer Kulturmengen, die von Zeit zu Zeit gemacht werden, wird der Titer des Serums auf der gewünschten Höhe gehalten. Die Tiere können in dieser Weise längere Zeit zur Serumgewinnung benutzt werden.

Nach Prettner ist es empfehlenswert, nach der letzten Kulturinjektion zwei Aderlässe zu machen und im unmittelbaren Anschluß an die zweite Blutentnahme eine neue Kulturdosis von 300 bis 400 ccm zu geben. Diese sofortige Einverleibung der Rotlaufkultur wird von den Tieren besser vertragen als nach einigen Tagen. Außerdem gewinnt man durch dieses Verfahren Zeit.

Geringe Kulturdoscn (bis 50 ccm) werden fast ganz reaktionslos vertragen. Erst auf große Dosen folgen Temperatursteigerungen, Abgeschlagenheit und Fraßunlust, Erscheinungen, die aber nach 24 bis 48 Stunden in der Regel wieder verschwinden. Längere intravenöse Behandlung mit Rotlaufkulturen bedingt aber in nicht wenigen Fällen (Leclainche, Prettnier) Abmagerung, Gelenk- und Sehnenscheidenentzündung, sowie Endokarditis.

Die Blutentziehung wird 10 bis 14 Tage nach der letzten Injektionsdosis gemacht.

Schnürer, welcher außer Pferden mitunter Rinder und Schweine als serumspendende Tiere benutzt, verwendet möglichst viele direkt aus gefallenen Schweinen gezüchtete Stämme zur Immunisierung. Er betont, daß die nötige Zahl und Menge der injizierten Kulturflüssigkeit bei den verschiedenen Pferden außerordentlich wechselt. Nur große Dosen lösen Antikörperbildung aus. Gewöhnlich müssen 1000 bis 1500 ccm Kultur, innerhalb fünf bis acht Wochen, geimpft werden, um nachweisbare Mengen von Antikörpern zu bilden und weitere 500 bis 600 ccm in vier bis fünf Wochen, um ein hochwertiges Serum zu erzeugen. Es sind also nicht allein große, sondern auch rasch aufeinander folgende Einspritzungen zur reichlichen Erzeugung von Immunkörpern notwendig. Folgende Beispiele mögen dies illustrieren: Eine zweiwöchentliche Behandlung (sechs Injektionen mit insgesamt 2270 ccm Kultur) liefert manchmal ein einfach normales und nach weiteren zwei Wochen (insgesamt elf Injektionen mit 4620 ccm Kultur) ein fünffaches Serum. Dagegen erzielte Schnürer von einem Pferde, welches während fünf Monaten mit 2210 ccm Kultur behandelt worden war, nur ein einfach normales Serum.

Rinder werden in derselben Weise intravenös geimpft. Zwei Rinder, welchen nach 14 Wochen 3450 ccm Kultur injiziert waren, lieferten ein fünffaches Serum.

Bei Schweinen genügen schon geringe Mengen subkutan. So erzeugten bei einem Tier fünf Injektionen mit 115 ccm Kultur ein einfach normales, bei einem zweiten Schweine neun Injektionen mit 315 ccm Kultur ein fünffach normales Serum.

Prinzipiell ist zu erwähnen, daß auch abgetötete Bakterien Antikörper produzieren und die subkutane Einverleibung von lebenden und toten Bazillen bei Pferden Verwendung finden kann.

Die Einspritzungen werden in den ersten Monaten ohne Schädigung vertragen. Es kommt nur zu leichten Temperatursteigerungen und Kolikerscheinungen. Erst in den späteren Monaten der Behandlung treten Erkrankungen des Endokards auf. Das erste klinische Zeichen der Endokarditis besteht in Gewichtsabnahme. Erst später tritt Intoleranz auf gegen intravenöse Injektionen, die sich in unregelmäßigen Fiebersteigerungen nach jeder Injektion, auch nur kleiner Mengen (50 ccm), sowie in Herzschwäche (Taumeln, Zusammenstürzen, schlechter Puls) äußert.

Wenn das Serum auf der gewünschten Höhe ist, macht Schnürer jede Woche Aderlässe von $5\frac{1}{2}$ Liter. Vom Pferd gewinnt man jährlich durchschnittlich 200 Liter Blut mit rund 50 Proz. Serumausbeute. Bei gutem Haferfutter mit Zugabe von Kalk und Kochsalz vertragen die Tiere die gehäuften Aderlässe gut. Ein Pferd, das über drei Jahre in Behandlung stand, lieferte 470 Liter Blut (240 Liter Serum). Beim völligen Ausbluten eines Pferdes bekommt man nur 20 bis 32 Liter Blut.

Zum Entbluten der Schweine empfiehlt Schnürer den Schächtschnitt. Ein Schwein von 50 kg gibt ungefähr 13,7 Liter Blut (7 Liter Serum).

Soll ein Pferd wiederholt geblutet werden und das Serum auf der gewünschten Höhe bleiben, so gibt man am besten sofort nach jedem Aderlaß 50 bis 100 ccm Kultur. Ohne Aderlaß hält sich das Serum etwa sechs Monate auf der Höhe.

Vorteilhaft erwies sich Schnürer die Mischung von verschiedenen Pferdeseren, da durch Mischung von höher- mit geringwertigem Serum auch derselben Tierart das Gesamtergebn über den Durchschnitt verbessert werden kann.

Die Wertbemessung des Rotlaufserums geschieht nach Lorenz an grauen Hausmäusen. Die Mäuse erhalten in der Gegend der Schwanzwurzel 0,01 ccm Kultur subkutan und sofort nach der Infektion das Serum in fallenden Mengen gleichfalls unter die Kutis des Rückens. Außer der Kontrollmaus werden gewöhnlich drei Mäuse verwendet, die mit 0,005, 0,01 und 0,015 g Serum behandelt werden. Ein Serum ist genügend wirksam, wenn 0,01 g Serum 10 g Maus gegen die Infektionsdosis von 0,01 ccm Kultur zu schützen vermögen. Da die Mäuse, die Lorenz zur Eichung seines Serums nimmt, etwa 15 g wiegen, so verlangt er einen Seramtiter von 0,015 g pro Maus.

Voges und Schütz nahmen die Bewertung des Serums auch an Mäusen vor, indem sie Serum und Kultur gemischt subkutan injizierten.

Leclainche, Deutsch und Schnürer benutzen die Taube als Prüfungstier. Leclainche gibt die Serumkulturmischung intramuskulär. Ein Serum ist nach ihm brauchbar, wenn 0,5 ccm Serum 1 ccm Kultur neutralisiert. Die Kontrolltauben müssen in zwei bis drei Tagen sterben.

Deutsch hat dieses Verfahren dahin abgeändert, daß er je $\frac{1}{2}$ ccm virulenter 36-stündiger Rotlaufkultur mit abgestuften Mengen Serum fünf Minuten sensibilisiert und darauf die Mischung 300 bis 400 g schweren Tauben intramuskulär injiziert. 0,5 ccm eines Serums müssen genügen, um eine Taube gegen die Infektion zu schützen, der die Kontrollen in 2 bis $2\frac{1}{2}$ Tagen erliegen. Anderenfalls ist das Serum minderwertig.

Schnürer nimmt die Injektionen getrennt vor. Er verwendet eine 48-stündige Kultur (0,5 ccm), von der Taubenpassage des vorhergegangenen Versuches herrührend, welche die Kontrollen sehr regelmäßig in drei bis vier Tagen tötet. Die Serumdosen betragen 0,8, 0,4, 0,16 und 0,08 ccm.

Infolge der langsamen Komplettierung des Rotlaufserums im Mäuseorganismus erhält man sehr ungleichmäßige Resultate, wenn den Mäusen Kultur und Serum gemischt injiziert wird. Diesem Übelstande konnte Marx dadurch abhelfen, daß er 24 Stunden vor der Infektion, die intraperitoneal ausgeführt wird, das Serum den grauen Mäusen subkutan einverleibte. Bei Verwendung von weißen Mäusen kann die Infektion bereits eine Stunde nach der Serumapplikation stattfinden, da diese scheinbar das Rotlaufserum schneller aktivieren als die grauen Mäuse.

Die staatliche Prüfung des Rotlaufserums wird nach der Marxschen Methode in der Weise ausgeführt, daß stets zwei Prüfungsreihen angesetzt werden, eine mit Standardserum und eine mit dem zu prüfenden Serum. Das Standardserum wird in der für jede Prüfung nötigen Menge von 0,6 ccm (= 0,06 g Trockenserum) in Ehrlich'schen Vakuum-Trockenapparaten aufbewahrt und muß zu jeder Wertbemessung frisch gelöst werden. Es hat den konventionell angenommenen Titer von 100 I.-E. in einem Kubikzentimeter, es schützt also angeblich 0,01 g gegen die nachfolgende dosis letalis lebender Bazillen. Gegen die Prüfungs-

dosis schützen gewöhnlich 0,015 ccm des Standardserums. Die Prüfungsdosis ist 0,01 ccm einer virulenten 24-stündigen Bouillonkultur. Es werden folgende Verdünnungen des Standardserums injiziert, um alle Serumdosen zu finden, bei denen die Tiere verzögert sterben oder aber leben bleiben:

0,005	== 0,5	der Verdünnung	1 : 100
0,008	== 0,4	"	1 : 50
0,01	== 0,5	"	1 : 50
0,015	== 0,75	"	1 : 50
0,02	== 0,4	"	1 : 20
0,03	== 0,6	"	1 : 20

Ist der Wert des von einer Fabrik eingesandten Serums gleichfalls als 100-fach angegeben, so werden von demselben die gleichen Verdünnungen gemacht (die Rotlaufsera müssen alle 100-fach sein).

Mit jeder Serumdosis werden zwei Mäuse subkutan injiziert, und eine Stunde später werden alle Mäuse nebst zwei Kontrollen mit der Prüfungsdosis ($\frac{1}{100}$ ccm einer eintägigen Bouillonkultur) intraperitoneal infiziert. Bei regelmäßigem Verlauf des Versuches müssen die Kontrollen in zwei bis drei Tagen zugrunde gehen, die Serummäuse der Standardreihe bis zu 0,01 ccm müssen einige Tage nachher sterben, während alle anderen Tierchen am Leben bleiben müssen. Dasselbe gilt für die Mäuserihe, die mit dem zu wertenden Serum gespritzt ist, sonst entspricht dasselbe nicht dem als 100-fach angegebenen Werte. Die Versuchstiere werden acht Tage lang beobachtet, so daß die Prüfung am neunten Tage beendet ist.

Eine Konzentration der Immunkörper des Schweinerotlaufserums ist durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat aus Schweineserum möglich (Lorenz), doch macht die Gewinnung hochwertiger Immunsera vom Pferde diese Konzentrierung überflüssig.

Literatur: Joest, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1909. Lorenz, Arch. f. wissenschaftliche und prakt. Tierheilkunde 1892. Derselbe, Badische tierärztl. Mitteil. 1892. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 1893. Derselbe, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1893. Derselbe, ebenda 1894. Derselbe, Deutsche Ztschr. f. Tiermed. 1894. Derselbe, ebenda 1895. Derselbe, Verhandlg. d. VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899. Leclainche, Compt. rend. de la Soc. de Biologie 1899. Derselbe, Revue vétérinaire 1900. Derselbe, Rec. de méd. vét. 1900. Kitt, Monatshefte f. prakt. Tierheilk. 1901. Marx, Deutsche tierärztl. Wochenschr.

1901. Nocard, Verhandl. d. VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899. Preisz, Kolle-v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Prettner, Tierärztl. Zentralbl. 1906. Derselbe, Ztschr. f. Infektionskr. d. Haustiere 1907. Schreiber, Österr. Monatshefte f. Tierheilk. 1906. Schubert, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1901. Schütz, Verhandl. d. VII. Internat. tierärztl. Kongresses, Baden-Baden 1899. Schütz u. Voges, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1899. Schnürer, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 1911.

Schweineseucheserum.

Das Schweineseucheserum wird meist durch Immunisierung von Pferden gewonnen.

Das Schweineseucheserum von v. Wassermann und v. Ostertag wird „multipartial“ (polyvalent) hergestellt. Verschiedene Gruppen von Pferden werden mit je vier bis fünf verschiedenen Stämmen vorbehandelt, und das Serum zahlreicher Pferde wird zum Schlusse gemischt. Die Schweineseuchestämme, welche zur Gewinnung des Serums dienen, werden fortlaufend durch solche Stämme ergänzt, gegen welche eine Schutzwirkung des Serums noch nicht besteht. Zu diesem Zwecke werden stets aus einer großen Anzahl zur Autopsie kommender Schweine, die an Schweineseuche zugrunde gegangen sind, die ovoiden Bakterien ohne weitere Tierpassagen gezüchtet und an mit Serum vorbehandelten Mäusen geprüft. Die Mäuse werden mit der zehnfach tödlichen Dosis infiziert, um Täuschungen infolge verschiedener Virulenz der Bakterien zu vermeiden. Alle neuen Schweineseuchestämme, gegen die das Serum im Mäuseversuch nicht schützt, werden zur Immunisierung mitbenutzt. Außerdem werden noch Pferde mit keimfreiem Extrakt aus Schweineseuchebazillen behandelt. Auf diese Weise erzielten v. Ostertag und v. Wassermann auch Schutzstoffe gegenüber den gelösten giftigen Substanzen der Schweineseuchebakterien. Das Serum der mit den toxischen Substanzen vorbehandelten Pferde wird ebenfalls dem Gesamtserum zugemischt.

Schreiber glaubte ein polyvalentes Serum dadurch zu gewinnen, daß er verschiedene Tierarten mit einem durch Tierpassagen hoch virulenten Schweineseuchestamm immunisierte und das Serum dieser Tiere mischte. Jetzt benutzt er aber auch zahlreiche Stämme.

Braun und Klett stellen ihr Serum hauptsächlich durch Vorbehandlung der Tiere mit Autolysaten aus Schweineseuchebakterien her.

Die Injektion kann intravenös und subkutan vorgenommen werden. Man beginnt entweder mit der Einverleibung von abgetöteten Erregern oder mit kleinen Mengen (0,5 ccm) lebender virulenter Bakterien. In acht- bis zwölftägigen Intervallen geht man dann allmählich zu höheren Dosen über, bis sich so viel Immunkörper im Blute angesammelt haben, daß das Serum für die Praxis brauchbar ist.

In gleicher Weise werden die Tiere, die das Serum liefern, mit immer steigenden Dosen von Schweineseuchebazillenextrakten oder Autolysaten behandelt. Die Anfangsdosis richtet sich nach der Stärke des verwendeten Präparates.

Die Blutentnahme geschieht 10 bis 14 Tage nach der letzten Injektion. Durch erneute Einspritzungen wird das Serum auf der gewünschten Höhe gehalten, so daß von einem Pferde längere Zeit ein wirksames Serum gewonnen werden kann.

Das Serum von v. Wassermann und v. Ostertag wird entsprechend seiner „polyvalenten“ Herstellung auch gegen verschiedene Stämme geprüft. Das zu prüfende Serum wird im Vergleich zu einem Standardserum gemessen und hat einen Titer von 0,01 ccm pro Maus. Die Wertbemessung wird im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie folgendermaßen ausgeführt:

Standardserum	Serumdosis	Zu prüfendes Serum
2 Mäuse	0,005 = 0,5 (1:100)	2 Mäuse
2 "	0,0075 = 0,75 (1:100)	2 "
2 "	0,01 = 0,5 (1:50)	2 "
2 "	0,015 = 0,3 (1:20)	2 "
2 "	0,02 = 0,4 (1:20)	2 "
2 "	0,03 = 0,6 (1:20)	2 "

Jede Serumdosis wird also je zwei Mäusen injiziert. 24 Stunden später erhalten alle Tierchen mit zwei Kontrollmäusen $\frac{1}{100}$ ccm eines Bakteriengemisches, welches aus acht verschiedenen Bouillonkulturen besteht. Die Kontrolltiere erliegen der Infektion in zwei bis drei Tagen. Die Mäuse werden zehn Tage lang beobachtet.

Die anderen Schweineseuchesera werden in gleicher Weise geprüft, doch wird zur Infektion nur ein Stamm benutzt.

Literatur: Braun und Klett, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1900. Breidert, Ztschr. f. Hyg. 1904. Bruck, ebenda 1904. Krautstrunk, ebenda. Joest, Kollé-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1904. Schreiber, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1902. Schubert, Deutsche tierärztl. Wochenschr. 1904. Otto und Boehnecke, Kollé v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Uhlenhuth und Haendel, ebenda 1913. Wassermann und Ostertag, Mitteilg. d. Verein. deutscher Schweinezüchter 1899 bis 1901. Dieselben, Bericht an den preußischen Minister f. Landwirtschaft 1901. Dieselben, Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 1903. Dieselben, Ztschr. f. Hyg. 1904. Wassermann, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. 2, 1909.

Anmerkung: Gegen die septische Pneumonie der Kälber, deren Erreger ebenfalls zur Gruppe der hämorrhagischen Septikämie gehören, kann nach denselben Gesichtspunkten ein Serum hergestellt werden.

Streptokokkenserum.

Zur Herstellung des Streptokokkenserums für praktische Zwecke bedient man sich fast ausschließlich der Pferde und Maultiere. Die Immunisierung der Tiere kann auf subkutanem und intravenösem Wege vorgenommen werden. Zieht man die intravenöse Injektionsweise der Streptokokkenkulturen vor, so ist es unerlässlich, nur solche Tiere zu verwenden, die eine tadellose Beschaffenheit sämtlicher Extremitäten aufweisen. Das Alter der Pferde soll nicht unter vier und nicht über zwölf Jahre betragen.

Marmorek, der zuerst ein Streptokokkenserum vom Pferd dargestellt hat, verwendet von vornherein nur vollvirulente Kulturen, nach deren Injektion eine kräftige Reaktion hervorgerufen wird. Aronson gewinnt sein hochwertiges Serum in der Weise, daß er zunächst mit durch Hitze abgetöteten und dann mit durch weniger starke Erwärmung abgeschwächten Streptokokken eine Grundimmunität schafft. Darauf wird mit lebenden vollvirulenten Kulturen weiter behandelt, indem man mit kleinen Dosen beginnt und allmählich zu höheren Gaben übergeht. Die Abschwächung der Streptokokkenkulturen wird erreicht durch einstündiges Erhitzen auf 70° im Wasserbade, durch Zusatz von Jodtrichlorid oder durch Mäusepassage (nach Knorr). v. Lingelsheim beginnt die Immunisierung mit abgeschwächten, wenig virulenten Kulturen, die nur geringe lokale Reaktionen hervorrufen, und spritzt erst dann virulentes Material ein.

Nach Neufeld wird die erste Injektion mit abgetöteter Kultur gemacht. Etwa zehn Tage darauf geht er sofort zur Einverleibung

von lebender vollvirulenter Kultur über. Die Dosen mit virulenten Streptokokken werden schnell stark gesteigert und so kräftige Reaktionen hervorgerufen. Zu den Injektionen mit lebenden Streptokokken werden nur die Bakterienleiber benutzt, die Neufeld durch Zentrifugieren aus den Bouillonkulturen gewinnt. Zangemeister glaubt ebenfalls, daß es nur dann zu einer kräftigen Antikörperproduktion kommt, wenn lebende Streptokokken injiziert werden und die Tiere nach Einverleibung der Kulturen schwer erkranken.

Im staatlichen Seruminstitut in Wien werden nach Schwoner die Injektionen stets nur subkutan vorgenommen. Zur Verwendung kommen meist zwei bis acht Tage alte Bouillonkulturen, die mit wöchentlichen Intervallen in steigenden Dosen den Pferden injiziert werden. Die der Einspritzung folgende Reaktion ist meist mäßig. Als Anfangsdosis wird gewöhnlich 0,5 ccm Bouillonkultur gewählt und allmählich bis zu 100 und 200 ccm gestiegen. Nach sechsmonatiger Behandlung ist der Antikörpergehalt des Blutes in der Regel so hoch getrieben, daß zu einem größeren Aderlaß geschritten werden kann.

Nebenstehende Tabelle, die nach einer Kurve von Schwoner zusammengestellt ist, gebe den Verlauf einer Behandlung wieder, bei der direkt vom Menschen stammende Scharlachstreptokokken bei subkutaner Einverleibung zur Immunisierung Verwendung fanden.

Das Körpergewicht betrug zu Beginn der Immunisierung 476 kg, hatte um die Zeit des 1. Februar 488 kg erreicht, um dann allmählich zu sinken. Vom 28. März bis 30. April hielt sich das Gewicht auf etwa 480 kg und fiel darauf ab bis zum niedrigsten Gewicht von 460 kg am 4. Juni. Nun beginnt wieder eine allmähliche Gewichtszunahme, so daß Ende des Monats das Höchstgewicht wieder erreicht war.

Am 30. Juni bestand eine ödematöse Schwellung an der Impfstelle und Sekretion aus dem Stichkanal.

In derselben Weise läßt sich auch auf intravenösem Wege immunisieren. Zieht man hier vor, im Anfange der Behandlung abgetötete oder abgeschwächte Streptokokken zu verwenden, so empfiehlt es sich, folgendermaßen vorzugehen: Zur ersten Injektion verwendet man etwa 50 ccm Streptokokkenkultur, die eine Stunde auf 85° bzw. auf 70° erwärmt war. Nun verdoppelt man nach

Datum	Dosis Streptokokken ccm	Temperatur Grad
15. Januar	0,5	38,0
22. "	1,0	37,8
30. "	1,5	38,2
5. Februar	2,5	38,1
19. "	4,0	38,1
27. "	6,5	38,4
6. März	9,0	38,4
12. "	12,0	38,3
19. "	18,0	39,0
26. "	20,0	38,7
2. April	25,0	38,7
9. "	30,0	39,5
16. "	30,0	39,7
23. "	30,0	38,9
30. "	40,0	39,6
7. Mai	40,0	40,5
8. "	—	39,1
14. "	40,0	38,5
29. "	50,0	39,0
30. "	—	38,2
4. Juni.	60,0	40,0
5. "	—	39,0
11. "	60,0	38,3
12. "	—	38,1
18. "	60,0	39,3
19. "	—	38,5
26. "	40,0	40,5
27. "	—	38,6

ungefähr acht Tagen die erste Dosis oder man geht herunter auf 10 bis 15 ccm vollvirulenter Kultur. In Zwischenräumen von acht bis zehn Tagen werden dann die Injektionen unter allmählicher Steigerung der Dosis wiederholt. Die auf die Injektion folgenden Temperatursteigerungen und Körpergewichtsänderungen liefern die Grundlage für die Höhe der Dosis bei der nächsten Injektion. Ruft beispielsweise eine Injektion eine Temperatursteigerung bis 40° hervor, so darf die nächste Dosis zum mindesten nicht höher sein, ja, man tut gut daran, eine kleinere Menge folgen zu lassen. Starke Temperaturerhöhungen haben gewöhnlich eine beträchtliche Abnahme des Gewichtes im Gefolge, die bei Wiederkehr der Freßlust in einigen Tagen wieder ausgeglichen werden kann. Bei Pferden, welche während der ganzen Behandlung nicht an Gewicht zunehmen oder gar dauernd geringgradig abnehmen, muß man

äußerst vorsichtig in der Dosierung sein und stärkere Reaktionen zu vermeiden suchen. In der Regel beträgt die Injektionsmenge nach fünf bis sechs Injektionen etwa 100 ccm und nach mehrmonatiger Behandlung bis zu 300 ccm. Die Behandlungsdauer ist individuell verschieden. Während bei einem Pferde der Antikörpergehalt des Blutes nach sechs bis sieben Injektionen schon so beträchtlich sein kann, daß ein größerer Aderlaß rationell erscheint, ist dieser Serumtiter bei anderen Pferden erst nach sechs bis acht Monaten erreicht. Während der Behandlung werden des öfteren kleine Probeaderlässe gemacht zwecks Prüfung des Serums.

Die Reaktionen, die durch die Injektion der Streptokokkenkulturen hervorgerufen werden, sind allgemeiner und lokaler Natur. Die allgemeine Reaktion besteht in Fieber, verminderter Freßlust und Gewichtsabnahme. Bei der intravenösen Behandlungsmethode treten noch recht häufig Gelenkschwellungen und Erkrankungen des Endokards auf, die häufig den Tod der Serumtiere herbeiführen. Wenn auch die Krankheitserscheinungen an den Gelenken nicht zum Tode führen, so muß doch in nicht seltenen Fällen die Behandlung lange Zeit unterbrochen und öfters sogar ganz aufgegeben werden, da die Pferde sich nach weiteren Injektionen nicht mehr auf den Beinen zu halten vermögen. An der Injektionsstelle in die Vene kommt es bei nicht sorgfältiger Ausführung der Einspritzung zu ausgedehnten, zuweilen eiternden Phlegmonen und Thrombophlebiten, die weitere Injektionen unmöglich machen. Die lokalen Erscheinungen bei der subkutanen Einverleibungsart der Streptokokkenkultur bestehen in Schwellung und Abszedierung der Injektionsstelle und Eiterung des Stichkanals.

Die Behandlung wird erst dann fortgesetzt, wenn die Reaktionen, vor allem das Fieber, völlig verschwunden sind.

Je nachdem die einzelnen Darsteller des Antistreptokokkenserums auf dem Standpunkt der „Einheit“ aller Streptokokken stehen oder nicht, ist auch die Herstellung ihres Serums eine verschiedene. Die meisten Seren werden polyvalent hergestellt, d. h. zu ihrer Gewinnung werden Streptokokken verwendet, die von den verschiedensten Krankheiten stammen. Den Gegensatz zu diesen stellen die monovalenten Sera dar, welche nur mit einem Streptococcus gewonnen werden. Ich werde die bekanntesten Antistreptokokkenserum aufzählen:

1. Serum Marmorek, monovalent, mit tierpassiertem Stamm gewonnen, hergestellt im Institut Pasteur, Paris;
2. Serum Denys- van de Velde, mono- und polyvalent, mit tierpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt in Louvain, Belgien;
3. Serum Aronson, polyvalent, mit tierpassierten und unpassierten Stämmen hergestellt, erzeugt bei Schering, Berlin;
4. Serum Tavel, polyvalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt im Schweizer Seruminstitut;
5. Serum Menzer, monovalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt bei Merck-Darmstadt;
6. Serum Moser, polyvalent, mit unpassierten Scharlachstreptokokken gewonnen, dargestellt im Seruminstitut Wien;
7. Serum Paltauf, polyvalent, mit unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt im Seruminstitut Wien;
8. Serum Höchst, polyvalent, mit passierten und unpassierten Stämmen gewonnen, dargestellt in den Farbwerken Meister, Lucius u. Brüning, Höchst a. M.

Wegen der Wichtigkeit für die Darstellung des Streptokokken-serums muß die Frage, ob man berechtigt ist, eine Arteinheit der Streptokokken anzunehmen, etwas eingehender erörtert werden.

Trotz vielfacher Untersuchungen in den letzten Jahren konnte eine Artverschiedenheit der Streptokokken bei den verschiedenen Erkrankungen nicht erwiesen werden. Eine Kennzeichnung der verschiedenen gefundenen Streptokokkenarten wurde nach folgenden Methoden von einer großen Anzahl von Forschern versucht, nachdem sich die mikroskopische Betrachtung der Zellen als nicht verwendbar herausgestellt hatte:

1. durch den Kulturversuch,
2. durch das Agglutinationsverfahren,
3. durch die Virulenzprüfung,
4. durch die Immunisierung.

Es interessiert hier in erster Linie die Frage, wie sich die verschiedenen Streptokokkenarten immunisatorisch zueinander verhalten. Die ersten Zweifel in die Frage der Unität der Streptokokken brachten verschiedene Arbeiten von Autoren, die mit dem

Serum von Marmorek gefunden hatten, daß ein mit einem bestimmten Streptococcus hergestelltes Serum nur gegen diesen, nicht aber gegen andere Streptokokkenstämme Schutz verleihe. Diese wurden aber gleich von Petruschky widerlegt, indem er nachwies, daß in dem damals von Marmorek ausgegebenen Serum überhaupt keine spezifischen immunisierenden Stoffe, nicht einmal gegen Marmoreks eigenen Stamm, vorhanden waren. Andere Autoren kamen zu demselben Resultat. Im Gegensatz zu diesen Behauptungen hatte Aronson darauf hingewiesen, daß ein mit einem Stamm gewonnenes Serum gegen die verschiedensten Streptokokkenstämme schützte. Er hatte allerdings seine Streptokokken alle durch Mäusepassage zuerst virulent gemacht, um sie prüfen zu können. Hiergegen wurde nun eingewendet, daß der ursprüngliche Bau der Rezeptoren verloren gegangen sei und alle Stämme durch die öftere Mäusepassage gleichartig geworden seien. Trotzdem sind die Versuchsergebnisse von Aronson richtig, wie sich aus den Experimenten von Neufeld, Sommerfeld, späteren Versuchen von Aronson und von mir ergibt. Neufelds Kaninchen-serum, welches mit einem Phlegmonestreptococcus hergestellt war, schützte in gleicher Höhe auch gegen andere Streptokokkenstämme. Sommerfeld stellte vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Streptokokkenseris an, und zwar verwandte er die Seren von Roux, Tavel, Moser-Paltauf und Aronson. Daß die Streptokokken, die er zur Prüfung benutzte, ihre ursprünglichen biologischen Eigenschaften nicht eingebüßt hatten, trotz einiger Mäusepassagen, erwies sich aus dem Verlaufe seiner Versuche, zu denen verschiedene Streptokokkenstämme herangezogen waren. Während nämlich die Seren von Roux und Tavel gegen hochvirulente Passagestämme gar nicht schützten, das Serum Moser-Paltauf einfach, das mit einem Scharlachpassagestamm hergestellte Serum von Aronson 20- bis 50-fach, wirkten die ersten beiden Seren etwas gegen Streptokokken mit wenig Passagen, das Serum Moser-Paltauf besser als diese, das Serum von Aronson war aber auch diesem letzteren weit überlegen. Neuerdings haben nun Meyer und Ruppel in einer Arbeit betont, daß ein durch Immunisierung von Pferden mit einem künstlich virulent gemachten Passagestamm gewonnenes Serum nicht gegen die virulenten Kulturen schützt, die direkt ohne Passage von Menschen gezüchtet sind. Aronson verneinte zuerst diese prinzipielle Unterscheidung,

indem er nachwies, daß ein monovalentes mit einem Passagestamm hergestelltes Serum auch diese direkt virulenten Stämme immunisatorisch beeinflusste. Bei meinen Untersuchungen zur Ergründung der Frage der Artverschiedenheit der einzelnen Streptokokken bediente ich mich ebenfalls der aktiven und passiven Immunisierung. Zu solchen Versuchen können naturgemäß nur Streptokokken benutzt werden, welche eine gewisse Tiervirulenz besitzen.

Meine aktiven Schutzimpfungsversuche zeigten deutlich, daß es gelingt, durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Passagestreptokokken diesen Tieren eine Immunität zu verleihen gegen Drusestreptokokken ohne jegliche Tierpassage. Desgleichen waren die Kaninchen gegen einen puerperalen Menschenstamm immun, wenn die Schutzimpfung mit Drusestreptokokken vorgenommen war. In Bestätigung der Versuche von Aronson, Neufeld und Sommerfeld und übereinstimmend mit meinen aktiven Schutzimpfungsergebnissen fielen meine Serumprüfungen an Mäusen aus. Zunächst fand ich wieder, daß mit einem Passagestamm immunisierte Pferde ein Serum liefern, das sowohl gegen diesen als auch gegen a priori virulente Menschenstreptokokken schützte. Weiter konnte ich feststellen, daß ein monovalentes Druseserum auch gegen Menschenstämme ohne Tierpassage wirkte. Umgekehrt war ein Serum, welches mit einem Menschenstamm allein gewonnen war, ebenso wirksam gegen Drusestreptokokken wie gegen diesen selbst.

In der Tabelle auf folgender Seite sei ein Versuch wiedergegeben, zu dem vom Menschen stammende Seren (Patientenserum) verwandt wurden, die durch Vakzination mit puerperalen Streptokokken gewonnen waren, außerdem ein Pferdeserum, welches mit einem hoch virulenten Mäusepassagestreptococcus dargestellt war (Passageserum) und ein Druseserum.

Das Ergebnis ist dasselbe wie in meinen übrigen Versuchen. Es zeigte sich wieder, daß Seren, welche sich gegen Passagestreptokokken als gut erweisen, dies in gleicher Weise auch gegen Menschen- und Drusestreptokokken sind. Nur ist der Schutzwert gegen hoch virulente Streptokokken mit geringer tödlicher Dosis höher als gegen a priori virulente Kettenkokken mit absolut größerer tödlicher Dosis. Die Patientenserum Nr. 64 und 76 stammen von derselben Wöchnerin, und doch war eines in diesem Versuche besser als das andere. Das kommt daher, weil nicht hochwertige Seren trotz der hohen Serumdosis gegen Streptokokkenstämme

mit großer tödlicher Dosis schlechter schützen als gegen hoch virulente Passagestämme, deren dosis letalis Bruchteile eines millionstel Kubikzenti-meters betragen. Diese Erscheinung macht sich auch bisweilen schon bemerkbar bei so geringen Unterschieden in der dosis letalis wie bei dem Scharlachstreptococcus 8 und dem Drusestreptococcus 7, gegen welchen die Seren im allgemeinen wirksamer waren. In der angewandten Verdünnung hatte das Druseserum Höchst weder gegen den Scharlachstreptococcus noch gegen den Drusestreptococcus geschützt. Es war also nicht so hochwertig wie ein von mir früher benutztes monovalentes Druseserum, welches gegen eben diesen Scharlachstreptococcus und gegen einen puerperalen Kettencoccus Schutz gewährt hatte. Mein Passageserum hatte sich gegen die beiden Streptokokken wirksam erwiesen. Ich machte nun einen neuen doppelten Vergleichsversuch mit dem Druseserum Höchst und dem Passageserum von Pferd 2, in welchem wieder das letztere das bessere war.

Hinsichtlich der Wirkung der verschiedenartig gewonnenen Seren besteht also kein grundlegender Unterschied, ob sie gegen Scharlachstreptokokken, puerperale oder Drusekokken verwandt wurden. Es wurden sowohl menschliche tiervirulente Kettenkokken als auch Drusestreptokokken in gleicher Weise von Passageserum beeinflusst, andererseits wirken mit tiervirulenten Menschenstreptokokken hergestellte Pferdeseren ebenso auf Drusestreptokokken und

Maus 71	10. März 0,01 cem Serum Pf. 2	11. März 0,01 cem Scharlachstrept. Nr. 8	+2
" 72			0
" 73	11. " 0,005 " Drusestrept.	" 7	+4
" 74			0
" 75	10. März 0,01 cem Serum Höchst	" 8	+1
" 76			+1
" 77	11. " 0,005 " Drusestrept.	" 7	+2
" 78			+2
" 79	Kontrollen	" 8	+1
" 80			+1

umgekehrt schützen Druseseren gegen menschliche Streptokokken. Mit puerperalen Stämmen gewonnene Menschenseren hatten im Mäuseversuch denselben Schutzwert gegen verschiedene Menschenstreptokokken wie gegen Drusekokken.

Trotzdem hat es eine Berechtigung, ein polyvalentes Serum herzustellen, wenn zur Immunisierung auch zahlreiche Stämme benutzt werden, die keine Tiervirulenz besitzen, bei denen es sich infolgedessen im exakten Experiment nicht feststellen läßt, ob sie durch ein monovalentes Serum unschädlich gemacht werden können. Als tiervirulent kann man einen Streptococcus betrachten, von dem höchstens 0,1 ccm einer eintägigen Bouillonkultur nötig ist, um eine Maus in 24 bis 48 Stunden zu töten.

Von Zangemeister ist in neuerer Zeit vorgeschlagen worden, Affen als Serumspender zu benutzen. Er hatte nämlich gefunden, daß ein Affenserum nur Affen gegen eine Infektion mit Streptokokken schützte, nicht aber Mäuse. Eine Nachprüfung seiner Versuche durch Aronson ergab jedoch, daß dies nicht der Fall war. War ein vom Affen stammendes Serum hochwertig genug, um diese zu schützen, so erwies es sich auch als schützend im Mäuseversuch. Die Annahme Zangemeisters, daß dem Menschen nächstehende Tiere (Affen) Seren liefern, die besonders wirksam sein müßten bei Menschen, weil sie bei niederer stehenden Tieren unwirksam seien, ist also für das Streptokokkenserum nicht bewiesen.

Die Blutentnahme zur Herstellung des Serums geschieht etwa 10 bis 14 Tage nach der letzten Injektion.

Die Wertbemessung des Antistreptokokkenserums ist je nach der Art der Herstellung eine verschiedene. Die Seren, welche durch Behandlung mit vielen direkt vom Menschen gezüchteten nicht tiervirulenten Streptokokken gewonnen werden (Menzer und Moser), lassen sich im Tierexperiment überhaupt nicht prüfen. Diese Sera werden vor dem Gebrauch am Krankenbett geprüft. Menzer bezeichnet als Normalserum ein Serum, welches in Mengen von 1 ccm bei chronischen Streptokokkeninfektionen eine sichtbare lokale und allgemeine Reaktion hervorzurufen imstande ist.

Streptokokkenserum, bei deren Herstellung tiervirulente Streptokokken Verwendung gefunden haben, können auf ihren Antikörpergehalt an weißen Mäusen ausgewertet werden. Die Eichung nach

Aronson wird in der Weise vorgenommen, daß den weißen Mäusen abgestufte Mengen des zu titrierenden Serums subkutan gespritzt werden und 24 Stunden darauf die 10- bis 100-fache tödliche Kulturdosis intraperitoneal gegeben wird. Als Normalserum bezeichnet Aronson ein Serum, von dem 0,01 ccm genügt, um eine Maus gegen die 10- bis 100-fache tödliche Dosis zu schützen. 1 ccm dieses Serums enthält eine Immunitäts-Einheit (= I.-E.).

Nach der Prüfungsmethode von Neufeld wird den Mäusen eine gleichbleibende Menge des Serums injiziert und 24 Stunden später abgestufte Kulturmengen (0,1 bis 0,00001 ccm).

Die üblichste Auswertungsmethode ist die Aronsonsche, die auch als Grundlage für die staatliche Prüfung, welche nicht obligatorisch ist, gedient hat.

Meyer und Ruppel (Höchster Serum) prüfen ihr Serum gegen einen Passagestamm, mit dem die Grundimmunität bei den Serumtieren erzielt wird, und gegen a priori virulente Menschenstreptokokken ohne Tierpassage, die zum Teil bei der Weiterimmunisierung benutzt wurden. Das Höchster Serum enthält nach Aronsonscher Berechnung 20 bis 40 I.-E. in 1 ccm. Das Serum ist also imstande, in einer Verdünnung 1:2000 bis 1:4000 eine Maus gegen die nachherige Infektion mit der 10- bis 100-fachen tödlichen Dosis zu schützen.

Die amtliche Wertbemessung des Scheringschen Serums nach Aronson wird folgendermaßen vorgenommen, wobei als Maßstab ein Standardserum mit dem nach Übereinkunft angenommenen Titer von 20 I.-E. dient:

Es werden 4 Parallelreihen mit fallenden Dosen Serum von 1:500 bis 1:6000 subkutan injiziert. Reihe 1 und 3 werden mit dem Standardserum, Reihe 2 und 4 mit dem eingesandten Serum vorbehandelt. Nach 24 Stunden erhalten die Parallelreihen 1 und 2 $\frac{1}{100000}$ ccm, die beiden letzten Reihen $\frac{1}{10000}$ ccm einer Kultur intraperitoneal, die noch in einer Verdünnung 1:1000000 weiße Mäuse akut innerhalb 24 bis 48 Stunden tötet. Die Ausführung des Versuches in zwei Doppelreihen ist nötig wegen der Virulenzschwankung der Kultur und wegen der verschiedenen Wirksamkeit des Serums gegen verschiedene Infektionsdosen.

Die zahlreich ausgeführten Prüfungsversuche haben gezeigt, daß sich nach der Aronsonschen Bewertungsmethode eine Wert-

bemessung des Antistreptokokkenserums mit genügender Genauigkeit durchführen läßt.

Die Titrierung des im Wiener staatlichen serotherapeutischen Institut erzeugten Streptokokkenserums wird gleichfalls nach der von Aronson ausgearbeiteten Methode ausgeführt.

Vor Anstellung eines Prüfungsversuches muß die Kultur jedesmal auf ihre Virulenz geprüft werden und nötigenfalls muß die Virulenz durch eine oder mehrere Mäusepassagen in die Höhe getrieben werden.

Noch ein Wort über die Wirksamkeit eines Streptokokkenserums gegenüber Kulturen, von denen größere Mengen nötig sind, um eine Maus akut zu töten. Es schützt ein Streptokokkenserum um so besser gegen einen Streptococcus, je geringer die Injektionsmenge ist, die zum Tod einer Maus nötig ist. So z. B. wird ein Streptokokkenserum, welches 20-fach gegen einen hoch virulenten Passagestamm wirkt, dessen dosis letalis $\frac{1}{1\,000\,000}$ bis $\frac{1}{10\,000\,000}$ ccm einer Bouillonkultur beträgt, nur etwa 1- bis 5-fach gegen einen Streptococcus schützen, gleichgültig, ob er vom Menschen oder Tiere stammt, von welchem man 0,01 bis 0,005 ccm zur Herbeiführung des Todes spritzen muß. Es wirkt also ein Streptokokkenserum um so besser, je geringer die absolute Menge der tödlichen Dosis ist.

Eigenschaften. Das Antistreptokokkenserum ist vor Licht und Luft geschützt und kühl aufbewahrt lange haltbar (etwa zwei Jahre). Nur allmählich nimmt der Antikörpergehalt in geringem Grade ab. Erwärmen des Streptokokkenserums auf über 70° schädigt dasselbe rasch.

Die Antikörper des Streptokokkenserums sind an die Euglobulinfraktion gebunden. Rodhain (Hofmeisters Beiträge, Bd. III, 1903) bediente sich der Hofmeisterschen Fällungsmethode und fand die Albumin- und Pseudoglobulinfraktion bei Schutzversuchen unwirksam. Nur der Euglobulinfraktion kam Schutzwirkung zu.

Literatur: Aronson, Berl. klin. Wochenschr. 1896, 1902 u. 1908. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1903. v. Behring, Zentralbl. f. Bakt. 1892. Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur 1904. Gabritschewsky, Zentralbl. f. Bakt. 1906. v. Lingelsheim, Kolle- v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912. Marmorek, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895 u. 1896. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1902. Marxer, ebenda 1910. Derselbe, Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere 1910. Derselbe, Zentralbl. f. Bakt. 60 (1911). Menzer, Ztschr. f. klin. Med. 1902.

Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1902. Derselbe, Münch. med. Wochenschr. 1903. Meyer, Deutsche med. Wochenschr. 1903 u. 1902. Derselbe, Berl. klin. Wochenschr. 1905 u. 1902. Derselbe, Therapie d. Gegenwart 1906. Meyer u. Ruppel, Med. Klinik 1907. Moser, Wiener klin. Wochenschr. 1902. Derselbe, Jahrb. d. Kinderheilkunde 1903. Moser-v. Pirquet, Zentralbl. f. Bakt. 1903. Neufeld, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **44** (1905). Derselbe, ebenda. Neufeld und Rimpau, Deutsche med. Wochenschr. 1904. Petruschky, Zentralbl. f. Bakt. 1895 u. 1896. Derselbe, Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1894. Piorkowsky, Berl. klin. Wochenschr. 1902. Ruppel, Med. Klinik 1905. Schwoner, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. **2** (1909). Tavel; Klin. therap. Wochenschr. 1902. Derselbe, Deutsche med. Wochenschr. 1903. Tavel u. Krumbein, Korrespond. f. Schweizer Ärzte 1901. van de Velde, Arch. de médecine 1897. Zangemeister, Münch. med. Wochenschr. 1907 u. 1908.

Anhang.

Die Serumkrankheit.

(Anaphylaxie, Allergie, Überempfindlichkeit.)

Bereits im Jahre 1894 beobachtete man bei Personen, die mit Diphtherieheilserum behandelt waren, Krankheitserscheinungen (Hautausschläge, Fieber, Gelenkschwellungen, Diarrhöen), die vielfach als Nebenwirkungen des in dem spezifischen Serum enthaltenen Antitoxins aufgefaßt wurden. Jedoch schon im folgenden Jahre konnte festgestellt werden, daß die subkutane Einspritzung von normalem Pferdeserum die gleichen Symptome verursachen kann. Eine experimentelle Bestätigung dieser Beobachtungen brachte eine Arbeit von Arthus aus dem Jahre 1903. Arthus hatte gefunden, daß Kaninchen die ersten Injektionen von Pferdeserum ohne Nachteil vertrugen. Eine neue subkutane Einspritzung rief an der Injektionsstelle starke Reaktionen (Ödem, Hautinfiltration und Nekrose) hervor. Spritzte er mit Serum vorbehandelten Tieren das Serum intravenös ein, so traten häufig hochgradige Atemnot, Diarrhöen, Krämpfe und der Tod unter Lähmungserscheinungen ein. Daß es sich dabei um eine spezifische Reaktion handelte, ging daraus hervor, daß die mit Pferdeserum vorbehandelten Kaninchen Injektionen von Serum einer anderen Tierart ohne Nachteil ertrugen.

Fast gleichzeitig mit Arthus gaben v. Pirquet und Schick vorwiegend klinische Beobachtungen bekannt, in denen sie die Ansicht vertraten, daß der Organismus nach Behandlung mit gewissen Stoffen, unter anderem mit Serum, die Fähigkeit gewinnt, auf eine erneute Einverleibung derselben Substanz mit größerer Intensität zu reagieren. In einer Monographie, in welcher sie die Folgeerscheinungen der Serumbehandlung als „Serumkrankheit“ bezeichneten, legten sie die grundlegenden Forschungen nieder.

Durch eine Beobachtung von Theobald Smith erlangten wir dann die Kenntnis, daß sich Meerschweinchen weit besser als das von Arthus benutzte Kaninchen zum Studium der Serumüberempfindlichkeit eignen. Smith hatte gefunden, daß Meerschweinchen, welche zur Wertbestimmung des Diphtherieserums gedient, also Diphtherietoxin gemischt mit antitoxinhaltigem Pferdeserum einverleibt erhalten hatten und völlig gesund geblieben waren, rasch schwer erkrankten, ja zugrunde gingen, wenn ihnen nach einigen Wochen eine geringe Menge normalen Pferdeserums subkutan injiziert wurde. Otto hat auf Anregung von Ehrlich diese Smithsche Beobachtung nachgeprüft und bestätigt. Infolge des großen Interesses, welches man dann der Erscheinung der Serumüberempfindlichkeit in neuerer Zeit entgegen brachte, hat dieses Gebiet der Immunitätsforschung eine rasche Entwicklung aufzuweisen.

Man versteht unter Anaphylaxie (diese Bezeichnung stammt von Richet) die Überempfindlichkeit gegenüber parenteral zugeführtem Eiweiß, also mit Umgehung des Verdauungstraktus. Durch Vorbehandlung mit einem Eiweißkörper entstehen im Organismus nach einer geraumen Zeit Antikörper gegen dieses Eiweiß. Wird nun denselben Tiere eine gewisse Menge der Eiweißart reinjiziert, mit der es vorbehandelt ist, so werden aus ihr mit Hilfe des Antikörpers und des Komplementes rasch giftige Stoffe gebildet, welche akut zum Tode führen oder eine Temperatursenkung verursachen, in kleineren Mengen bedingen sie eine Temperatursteigerung. Überlebt das Tier die schwere Erkrankung, so ist es gegen eine nochmalige Zufuhr der gleichen Eiweißart antianaphylaktisch, d. h. unempfindlich. Nur höhere Eiweißkörper rufen beim Tier Anaphylaxie hervor, einfachen Eiweißkörpern fehlt diese Eigenschaft. Zur Auslösung der Überempfindlichkeit und zur Präparierung gilt als Grundbedingung, daß das Eiweiß zum mindesten teilweise nicht der Wirkung der Verdauungssäfte unterliegt. Die Sensibilisierung, d. h. die Vorbehandlung, kann subkutan, intraperitoneal, intravenös und auch vom Rectum aus erfolgen. Die zweite Zufuhr geschieht auf demselben Wege wie die Präparierung.

Sogar die Inhalation der Eiweißlösung mittels Spray kann zwar nicht den Shock, wohl aber Temperaturreaktion hervorrufen. Daß es auch verschiedenen Autoren gelungen ist, die Anaphylaxie

durch Verfütterung zu erzeugen, ist so zu erklären, daß bei den diesbezüglichen Versuchen so große Mengen Eiweiß in den Verdauungstraktus gelangten, daß kleinere Mengen der enteralen Verdauung entgangen sind und unverdaut in die Blutbahn gelangten, so daß auch in diesen Fällen das Eiweiß parenteral zugeführt wurde. Ferner gelingt die Präparierung durch die Schleimhaut und unverletzte Haut. Die gleichmäßigsten und konstantesten Resultate bei Anaphylaxieversuchen erhält man bei der subkutanen Sensibilisierung und intravenösen Reinjektion zur Auslösung des Shocks. Es existieren genaue Versuche darüber, welche kleinen Mengen zur Sensibilisierung mit verschiedenen Eiweißsorten genügen. So braucht man 0,000 01 g Rinderserum, 0,000 001 g Pferdeserum und nur 0,000 000 05 g kristallisiertes Eiereiweiß, um ein Meerschwein zu präparieren. Den tödlichen Shock lösen folgende Quantitäten des gleichen Eiweißes aus: 0,01 g Rinderserum, 0,001 g Pferdeserum und 0,0001 g kristallisiertes Eiereiweiß. Letztere Dosen sind also größer als die sensibilisierenden. Gleichmäßigere Resultate werden jedoch erzielt, wenn 0,01 bis 0,1 g des Antigens zur Präparierung benutzt werden. Das Kaninchen ist nicht so empfindlich wie das Meerschweinchen, auch die Maus läßt sich nur durch intravenöse Reinjektion in den tödlichen Shock versetzen; ziemlich unempfindlich ist der Hund, der ja auch ein schlechter Präzipitinbildner ist. Die Empfindlichkeit gegenüber der Anaphylaxie ist also bei den einzelnen Tierspezies sehr verschieden.

Als Resultat mehrfacher Untersuchungen hat sich ergeben, daß dieselben Komponenten im Eiweiß bei der Präparierung und Reinjektion wirken.

Die Anaphylaxie ist spezifisch, d. h. sie tritt nur auf Reinjektion derselben Eiweißart auf, mit welcher die Präparierung erfolgt ist. Eine ganze Reihe Stoffe ist bekannt, welche in geringsten Mengen Überempfindlichkeit erzeugen, so viele tierische Gifte und Fermente, verschiedene Eiweißsorten tierischer Herkunft und verschiedene Stoffe pflanzlicher Abstammung, auch tote Bakterien und Bakterienprodukte, weiter kennen wir verschiedene Virusarten, wovon zuerst das Pockenvirus durch Pirquet erwähnt wurde, welche Anaphylaxie erzeugen. In Wechselwirkung stehen ferner verschiedene Infektionserreger mit ihren Stoffwechselprodukten, die wir zu diagnostischen Zwecken benutzen, wie die Tuberkulin- und Mallein-

reaktion. Im Gegensatz zu dieser Artspezifizität kommt auch eine Organspezifizität, z. B. beim Linseneiweiß vor. Dieses spezifische Organeiweiß ist allen Tieren gemeinsam.

Wie jeder Immunitätsvorgang hat auch die Anaphylaxie ein Inkubationsstadium, d. h. eine Zeit, bis zu der die meisten Antikörper gebildet sind, und welche infolgedessen den optimalen Zeitpunkt darstellt zur Auslösung der Erscheinungen. Die Dauer des Latenzstadiums ist abhängig von der Tierspezies und bei derselben Tierart von der Art der Einverleibung des Antigens.

Daß es sich bei der Überempfindlichkeit um eine echte Immunität handelt, geht auch daraus hervor, daß sich dieselbe passiv übertragen läßt. Wie bei jeder passiven Immunität ist das Inkubationsstadium wesentlich verkürzt, und die Immunität ist von kürzerer Dauer als bei der aktiven Immunität. Entsprechend dem allgemeinen Verhalten der Immunkörper gehen diese bei der Anaphylaxie auch von der Mutter auf den Fötus über, gleichgültig ob die Mutter vor oder während der Schwangerschaft sensibilisiert wurde. Vom Vater soll eine Überempfindlichkeit nicht übertragbar sein.

Beim Zusammentreffen von Eiweiß, Antieiweißserum und Komplement im Reagenzglas wird das Komplement verankert. Ebenso braucht die Mischung des anaphylaktischen Reaktionskörpers mit dem Antieiweißkörper das Komplement zur Entfaltung der Wirksamkeit. Friedberger und Hartoch fanden in allen Fällen, sowohl bei aktiver wie bei passiver Anaphylaxie, im unmittelbaren Anschluß an die Reinjektion eine ausgesprochene Komplementverarmung. Wird das Komplement durch irgend einen Eingriff vor der Reinjektion verankert, so tritt keine Anaphylaxie ein. Den zwingenden Beweis für die Notwendigkeit des Komplementes erbrachte Friedberger damit, daß es ihm auch *in vitro* gelungen ist, mittels des Komplements plus spezifischem Antikörper aus dem dazugehörigen Eiweiß das spezifische Gift der Überempfindlichkeit, das Anaphylatoxin, herzustellen. Auch mit dem Komplement allein konnte er aus Eiweißarten und Bakterien das Anaphylatoxin gewinnen.

Ist nun das Anaphylatoxin mit dem spezifischen Gifte der Anaphylaxie identisch und geht die Bildung dieses Giftes im Tierkörper parallel mit der Abspaltung desselben *in vitro*? Daß

dies der Fall ist, glaubt Friedberger aus folgenden Gründen schließen zu können:

1. Die Symptome bei der Vergiftung sind dieselben, wie bei der aktiven und passiven Anaphylaxie.
2. Der anatomische Befund ist derselbe.
3. Die bestimmbareren Erscheinungen, wie Temperatursturz, verzögerte Blutgerinnung, Leukopenie sind die gleichen.
4. Das Anaphylaxiegift im Reagenzglas wird aus denselben Komponenten gebildet, wie sie bei der aktiven und passiven Anaphylaxie in Aktion treten.
5. Das Anaphylatoxin läßt sich aus denselben Antigenmengen, ja aus noch geringeren Mengen wie im Organismus abspalten.
6. Das Anaphylaxiegift wird auch im Tierkörper gebildet.

Friedberger und Nathan fanden bei Injektion von *Prodigiosus*bazillen in das Peritoneum von Meerschweinchen nach sechs Stunden das abzentrifugierte Exsudat zusammen mit der zur Spülung benutzten Kochsalzlösung für Meerschweinchen akut tödlich.

Im Gegensatz zu Friedberger ist nach anderen Forschern (Kraus, Doerr, v. Behring, Kopaczewski und Mutermilch, Sachs und Nathan u. a.) die Giftbildung auf physikalische Veränderungen der Eiweißkolloide zurückzuführen. Nach ihren Untersuchungen, auf die einzugehen zu weit führen würde, besteht das Anaphylatoxin also nicht aus Eiweißspaltprodukten.

Das Gift der Überempfindlichkeit wird durch den Urin ausgeschieden (H. Pfeiffer), welcher beim anaphylaktischen Tier proportional dem Grad der Vergiftung toxische Eigenschaften annimmt.

Die chemische Natur der Spaltprodukte von giftiger Eigenschaft, welche im Tierkörper und bei der Anaphylatoxinbildung auftreten, ist unbekannt. Nur eines haben beide Reaktionen gemeinsam, daß regelmäßig Spaltprodukte entstehen, die positive Biuretreaktion geben. Daß dies kein Zufallsbefund ist, geht daraus hervor, daß zahlreiche Spaltprodukte aus Eiweißarten und Bakterien die anaphylaktischen Symptome ebenfalls erzeugen.

Die Symptome der Anaphylaxie sind sehr charakteristisch. Wird nach Ablauf des Inkubationsstadiums einem Meerschweinchen

10 bis 14 Tage nach der Vorbehandlung das Antigen intravenös reinjiziert, so stirbt das Tier im anaphylaktischen Shock. Bald nach der Injektion wird das Tier unruhig, schnuppert, juckt sich an der Nase, sträubt die Haare, läßt Kot und Urin. Nach einigen Minuten erfolgen schwere Krämpfe und Sprünge; das Tier wälzt sich, schlägt nach allen Seiten und wird oft von einer Stelle zur anderen geschleudert, bis es dann liegen bleibt. Die Kornealreflexe erlöschen, es treten noch einzelne tiefe Atemzüge auf, wobei der Thorax starr bleibt. Nach etwa drei bis fünf Minuten ist dann das Tier unter typischen suffokatorischen Erscheinungen eingegangen.

Nach den Untersuchungen von Gay und Southardt sowie Auer und Levis ist der Tod im Shock ein Erstickungstod. Auffallend sind vor allem die mächtigen Atembewegungen, die aber zu keiner inspiratorischen Erweiterung des Thorax führen, zum Schluß kommt es zu Atemstillstand bei noch schlagendem Herzen. Alle bisher vorgeschlagenen Mittel zur Verhinderung der Atemlähmung und zur Hebung des Blutdruckes sind praktisch unbrauchbar. Der Sektionsbefund ist nicht minder eigenartig. Die Lunge ist stark gebläht und überlagert teilweise das Herz. Sie ist bald anämisch, bald mehr oder weniger ödematös-hämorrhagisch mit zahlreichen punktförmigen Blutungen durchsetzt. An manchen Stellen sieht man ein geringes interstitielles Ödem und das Bild des Bronchialmuskelkrampfes. Das Herz schlägt noch längere Zeit nach dem Tode weiter. Die Gerinnungsfähigkeit des Blutes ist stark herabgesetzt. Es besteht eine deutliche Leukopenie.

Anders sind die Symptome, wenn bei der Reinjektion nur kleine Antigenmengen intravenös gegeben werden oder größere Dosen intraperitoneal. Es treten hier die typischen Springkrämpfe nicht auf, das Stadium der Erregung geht langsam in eine Depression über. Die vorher unruhigen Tiere, die mit gesträubtem Haar ängstlich hin und her gelaufen waren, werden matt, legen sich auf die Seite und können so stundenlang schwach atmend liegen bleiben, bis sie sich erholen, oder nach Stunden, Tagen, häufig nach Wochen erst an Marasmus eingehen. Der Tod ist hier nicht auf Erstickung zurückzuführen, wie beim Shock, sondern nach H. Pfeiffer die Folge einer peripheren Gefäßlähmung und einer damit verbundenen Blutdrucksenkung. Dafür spricht der Sektionsbefund, die Lungenstarre fehlt, die Serosa ist stark

injiziert, häufig mit Petechien bedeckt. Die Darmschleimhaut ist gerötet, der Darminhalt ist breiig und häufig flüssig. Eine Folge der Blutdrucksenkung ist ferner der von H. Pfeiffer entdeckte Temperatursturz, der infolgedessen als anaphylaktischer Temperatursturz gekennzeichnet wurde und ebenso typisch ist wie der Shock. Er hat den Vorteil, daß er auch meßbar ist, wenn sonstige klinische Symptome fehlen. Bei Tieren, die sich wieder erholen, kann er 7 bis 9°, in letal endenden Fällen sogar 11 bis 13° betragen.

Wird das Antigen zum zweiten Male subkutan einverleibt, so bemerken wir die unter dem Namen „Arthussches Phänomen“ bekannten Erscheinungen. Es entsteht zunächst ein Ödem, das hämorrhagisch wird oder sich in ein derbes Infiltrat umwandelt. Die Haut wird nekrotisch und löst sich ab. Es kommt zu einem scharf abgegrenzten Geschwür, das nach längerer Zeit unter Bildung einer strahligen Narbe ausheilt.

Aber mit diesen beiden typischen Symptomen, dem Shock und dem Temperatursturz, ist das Bild, welches die Anaphylaxie zeigen kann, noch nicht erschöpft. Es gibt noch eine Erscheinung, auf die Friedberger zuerst aufmerksam gemacht hat und die für die Auffassung des Fiebers bei Infektionskrankheiten von großer Bedeutung ist, nämlich die Temperatursteigerung. Ward bei der Reinjektion die Dosis beim anaphylaktischen Tier so klein gewählt, gleichgültig bei welcher Applikationsweise, daß weder Shock noch Temperatursturz eintritt, so kommt es bei sonstigem Wohlbefinden des Tieres zu einer Temperatursteigerung.

Wir haben also bei der Anaphylaxie eine Trias von Symptomen, den Shock bei großen Dosen, bei mittleren Dosen den Temperatursturz und die Temperatursteigerung, durch kleinste Mengen verursacht.

Am besten treten diese Symptome in Erscheinung beim Meerschwein, aber auch bei den anderen Tieren, die mehr oder weniger empfindlich sind, läßt sich durch entsprechende Dosen das gleiche Krankheitsbild auslösen. Zu erwähnen wäre noch, daß beim Hunde die Blutdrucksenkung mit seinen Begleiterscheinungen im Vordergrund des Symptomkomplexes steht.

Das bei der Überempfindlichkeit wirkende Gift und das von Friedberger gefundene und im Reagenzglas zuerst dargestellte Anaphylaxiegift ist ein einheitliches Gift und unspezifisch, nur

der Modus der Giftbildung ist spezifisch. Friedberger war dann auch der erste, welcher die Anaphylaxie in Beziehungen brachte zur Infektion und Immunität. Er stellte als erster aus Bakterien das Anaphylatoxin dar. Die Abspaltung des Giftes gelang bisher nach der Methode von Friedberger aus Typhus-, Tuberkel- und Prodigiosusbazillen, sowie aus dem *Vibrio Metschnikoff* (Friedberger und Goldschmidt), weiter aus Staphylokokken (Friedberger und Szymanowsky), ferner aus Pneumokokken und Cholerabazillen (Neufeld und Dold) und aus Milzbrandbakterien (Schütze, Aronson). Wie die Anaphylatoxinbildung aus Bakterien möglich war, so gelingt auch die Sensibilisierung im Organismus mit Bakterien und deren Produkten und die Auslösung der Anaphylaxie mit denselben zur Vorbehandlung verwendeten Bakterien. Dementsprechend hält Friedberger die Infektion für eine milde protrahierte Form der Anaphylaxie und umgekehrt die Anaphylaxie für eine extreme und akute Form der Infektion. Ebenso wie sich durch Injektion von Bakterien wie von Eiweißarten Überempfindlichkeit ausbilden kann, so läßt sich mit Eiweißkörpern das Bild der Infektion erzeugen. Der Beweis dafür ist Friedberger und Castelli gelungen, sie waren in der Lage, durch Variierung der Eiweißdosen alle Arten des Fiebers, wie wir sie bei Infektionskrankheiten kennen, künstlich zu erzielen. Wir haben uns also das Fieber bei den Infektionen nach Friedberger so vorzustellen, daß es durch Abspaltung des Anaphylatoxins aus dem fortgesetzt parenteral zugeführten Eiweiß infolge stetiger Vermehrung der Bakterien entsteht.

Vom Standpunkt der Technik der Heilsera interessiert uns besonders die Frage, ob es möglich ist, durch besondere Präparation des Serums die Serumkrankheit zu verhindern. Das beste Mittel wäre naturgemäß eine Reindarstellung der Antikörper ohne Beimengungen eines artfremden Serums. Leider ist dies bisher nicht gelungen. Eine bloße Reinigung der Antikörper dadurch, daß man einen großen Teil des Eiweißes aus dem antikörperhaltigen Serum entfernt, verringert zwar die Gefahr der Serumkrankheit, doch hebt sie sie nicht völlig auf. In anderer Weise versucht man die unangenehmen Nebenwirkungen des artfremden Serums möglichst einzuschränken, indem man sich bemüht, nur sehr hochwertiges Serum herzustellen. Man braucht dann nur eine entsprechend geringere Menge artfremdes Eiweiß zu injizieren

und vermindert dadurch das Auftreten anaphylaktischer Erscheinungen.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, auf experimenteller Basis Mittel und Wege zu finden, die Reinjektion von Eiweiß für das sensibilisierte Meerschweinchen unschädlich zu machen. Man konnte so hoffen, ein Mittel ausfindig zu machen, mit dem man auch die Serumkrankheit erfolgreich bekämpfen könnte. Amerikanische Forscher (Rosenau und Anderson) haben zahlreiche experimentelle Untersuchungen ausgeführt, die den Zweck hatten, die Giftigkeit des Serums in irgend einer Weise herabzusetzen. Sie verwandten dazu die verschiedensten chemischen und physikalischen Mittel. Nacheinander wurden untersucht: Buttersäure, Kalium permanganicum, Natrium citricum, Alkohol, das Peroxyd der Bernsteinsäure, Wasserstoffsuperoxyd Ammonium sulfuricum, Chloroform, Trikresol, die verschiedensten Fermente, Alkaloide und Salzverbindungen (Takadiastase, Pankreatin, Myrosin, Invertin, Emulsin, Pepsin in saurer und alkalischer Lösung und noch andere Enzyme), Atropin, Strychnin, Morphin, Coffein, Calciumchlorür, Magnesiumsulfat, Formalin, Rindergalle, schließlich Röntgenstrahlen, Passage durch Porzellanfilter und Einfrieren und Wiederauftauen des Serums. Alle Methoden waren jedoch erfolglos.

Eine sechsstündige Erwärmung des Serums auf 60° hatte gleichfalls keinen Einfluß auf seine Giftigkeit. Erst eine fünfzehnstündige Erhitzung auf 100° zerstörte die Giftigkeit.

Besredka versuchte auf zwei Wegen eine Schutzmethode gegen die Serumüberempfindlichkeit ausfindig zu machen: einmal durch künstliche Herabsetzung der Giftkomponente im Serum, sodann durch geeignete Behandlung des Tieres, um es gegen die Giftwirkung des Serums immun zu machen. Seine Versuche, mit chemischen Mitteln die Serumgiftigkeit herabzusetzen, schlugen ebenso fehl wie die der früheren Forscher.

Die Entgiftung des Serums durch Siedetemperatur, wie sie Rosenau und Anderson gefunden hatten, wurde von Besredka bestätigt. Diese Entgiftung hat aber insofern keinen praktischen Wert, als bei diesen hohen Hitzegraden auch die Antikörper zerstört werden. Besredka hat deshalb in seinen Experimenten nur Temperaturen von 59 bis 60° angewandt, die er eine bis sieben Stunden einwirken ließ. Er konnte bei einem besonders giftigen Serum die Abschwächung der Toxizität graduell verfolgen.

Das Resultat seiner Untersuchungen war die Herabsetzung der Giftigkeit eines Serums (um das Vier- bis Fünffache) infolge mäßiger fraktionierter Erwärmung.

Das nicht erhitzte Serum tötete sensibilisierte Meerschweinchen in einer Dosis von $\frac{1}{40}$ ccm bei intrazerebraler Injektion.

Infolge einstündiger Erwärmung auf 60° an drei aufeinander folgenden Tagen betrug der Giftigkeitstiter:

- $\frac{1}{4}$ ccm . . . sicherer Tod;
- $\frac{1}{10}$ ccm . . . schwere, aber nicht tödliche Symptome;
- $\frac{1}{20}$ ccm . . . keine Symptome.

Nach einstündiger Erhitzung auf 60° an fünf folgenden Tagen:

- $\frac{1}{4}$ ccm . . . sicherer Tod;
- $\frac{1}{8}$ ccm . . . ernste, aber bald vorübergehende Symptome;
- $\frac{1}{16}$ ccm . . . fast gar keine Symptome.

Die Resultate änderten sich auch nicht, wenn das Serum an sieben aufeinander folgenden Tagen eine Stunde auf 60° erwärmt wurde.

Die Giftigkeit des Serums wird ebenfalls herabgesetzt (um das Dreifache) durch eine noch gelindere Erwärmung (drei Tage je eine Stunde, am vierten Tage bis zwei Stunden auf 50°).

Besredka glaubt auf Grund seiner Versuche, daß die Serumkrankheit deshalb in Frankreich nicht so häufig und heftig auftritt, wie in anderen Ländern, weil im Institut Pasteur die Erwärmung der Heilseren vor der Abgabe seit vielen Jahren gebräuchlich ist.

Besredka ist der Meinung, daß man mit Hilfe intrazerebraler Injektionen an sensibilisierten Meerschweinchen die Giftigkeit der Heilseren auswerten kann. Mit dieser Methode fand er große Schwankungen in der Giftigkeit von Seren verschiedener Herkunft. Die tödliche Dosis liegt zwischen $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{128}$ ccm.

Pferde, die unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten werden, weisen keine nennenswerten individuellen Unterschiede in der Giftigkeit ihres Serums auf.

Besredka fand weiter, daß der Giftwert eines Serums mit dem Alter abnimmt. Ganz frisches Serum ist in der Regel hyper-toxisch. In den ersten zehn Tagen nach der Blutentnahme sinkt die Giftigkeit eines Serums um die Hälfte. Später geht der Gift-titer während eines bis eineinhalb Monaten, allerdings langsamer herunter. Dann hält sich der Giftwert des Serums monatelang

auf gleicher Höhe. Besredka sieht deshalb jedes Heilserum während der ersten zwei Monate nach der Gewinnung als giftig an. Er fordert ferner die Ausmerzungen jeden Serums, welches bei intrazerebraler Impfung in einer Dosis von $\frac{1}{16}$ bis $\frac{1}{20}$ ccm schwere anaphylaktische Erscheinungen bei Meerschweinchen hervorruft.

Es ist also möglich, die Erscheinungen der Überempfindlichkeit abzuschwächen, dadurch, daß man die Heilseren vor dem Gebrauch auf 56° erwärmt oder sie längere Zeit ablagern läßt.

Die Serumkrankheit läßt sich nach Besredka ganz vermeiden, wenn man das betreffende Individuum in den Zustand der Antianaphylaxie versetzt. Dies läßt sich erreichen durch Vakzination mit normalem, nicht vorbehandeltem Serum entweder durch rektale Applikation oder noch besser durch subkutane Einspritzung kleinster Mengen einige Stunden vor der eigentlichen Serumbehandlung.

Andere Bestreben zielen dahin, die Serumkrankheit in der Weise zu vermeiden, daß zu prophylaktischen Zwecken eiweißarme Seren, oder an Stelle des Diphtherieserums vom Pferd solches vom Rind oder Hammel angewendet werden.

v. Behring empfiehlt zur prophylaktischen Impfung ein nach besonderem Verfahren gereinigtes Serum, dessen Toxizität um das 8- bis 10-fache herabgesetzt ist. Er berechnet die Giftigkeit eines Serums nach Anatoxineinheiten = An.-E. 1 An.-E. ist diejenige Dosis von einem Proteinpräparat, welche nach vorausgegangener Sensibilisierung ein etwa 250 g schweres Meerschwein von der Blutbahn aus mit Sicherheit akut tötet. Bei einem Serum mit $\frac{1}{30}$ An.-E. auf 1 A.-E. (= Antitoxineinheit) hält v. Behring das Auftreten einer Serumkrankheit auch bei anaphylaktisch überempfindlichen Individuen für ausgeschlossen.

Neuerdings haben sich Kalle & Co. ein Verfahren patentieren lassen (K. 30 h. G. 6. März 1913), welches auch die Krankheitserscheinungen, welche durch erhitztes Serum noch hervorgerufen werden, völlig beseitigen soll.

Immunserum (oder Immunblut) mit einem Zusatz von 0,1 bis 0,5 Proz., unter Umständen mehr, Milchsäure wird im Wasserbade auf 37° erwärmt. Die Temperatur wird nach einiger Zeit auf 40 bis 54° gesteigert. Zwischen 37° und 54° werden Teilungen der Flüssigkeit, etwa die Hälfte, abgegossen und der Rest bis auf 70° eventuell 100° weiter erhitzt. Nach einer viertelstündigen

Erhitzung auf 70 bzw. 100° läßt man die Flüssigkeit abkühlen und mischt dann die getrennten Portionen wieder. Die auf diese Weise behandelte antikörperhaltige Flüssigkeit soll nun einen stärkeren Überschuß an antitoxisch wirkenden Substanzen aufweisen. Das Serum wird durch die Erwärmung nach dieser Methode also nicht abgeschwächt.

Der Patentanspruch umfaßt alle Verfahren zur Darstellung ungiftiger Serum- oder Immunblutpräparate, die die Entgiftung eiweißhaltiger Präparate durch Zusatz einer organischen Säure und Erwärmung der sauren Lösungen zwischen etwa 37 und 70° bezwecken.

Eine Nachprüfung dieses Verfahrens in der Praxis wird ergeben, ob es geeignet ist, die Serumkrankheit zu verhindern.

Literatur: (Zusammenfassende Übersichten.) Besredka, Über Anaphylaxie, Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik usw. d. Immunitätsforsch. 1911. Doerr, Die Anaphylaxie, ebenda 1909. Derselbe, Allergie und Anaphylaxie, Kolle - v. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 1913. Friedberger, Fortschr. d. deutsch. Klin. 2, 1911.
