

Zeitschrift für angewandte Chemie

und

Zentralblatt für technische Chemie.

XXV. Jahrgang.

Heft 18.

3. Mai 1912.

Die Darstellung und Wertbestimmung der Heilsera¹⁾.

Von Stabsarzt Dr. K. E. BOEHNCKE,
Abteilungsvorsteher am Kgl. Institut für experimentelle
Therapie.

(Eingeg. 8. 2. 1912.)

Die Stoffe, mit denen die Immunitätsforschung arbeitet, Antigene und Antikörper, sind übereinstimmend negativ charakterisiert durch den Umstand, daß sie chemisch völlig unbekannte Gebilde darstellen. Mag nun darin ein prinzipielles Kriterium gelegen sein, das die Antigene und Antikörper von dem großen Reiche der chemisch definierten Substanzen trennt, oder mag dieses Unterscheidungsmerkmal nur ein Ausdruck unserer vorläufigen Unfähigkeit, chemisch weiter vorzudringen sein, Tatsache ist es, daß bisher, trotz zahlreicher Bemühungen es nicht gelungen ist, durch Vorbehandlung von Tieren mit Giften bekannter chemischer Konstitution Antikörper zu erzeugen, oder andererseits die Antigene chemisch zu analysieren. Die Erzeugung von Antikörpern ist ja in der Tat der einzige sichere Maßstab, den wir kennen, um Substanzen in die Reihe der Antigene einzureihen. Zu jedem Antigen gehört ein Antikörper und zu jedem Antikörper ein Antigen. Jedes Antigen wird durch seinen Antikörper gebunden, was mit die wichtigste Eigenschaft jedes Antigens ist. Um diese Bindung und damit überhaupt erkennen zu können, daß ein Antikörper vorhanden ist, ist es nötig, daß das Antigen eine sinnfällige funktionelle Wirkung ausübt. Dies ist wohl am klarsten zu erkennen, bei den Antigenen-Toxinen, und es ist daher kein Zufall, daß die fundamentale Entdeckung der Antikörper durch v. Behring die Antitoxine betrifft. Da die Toxine, wie ja ihr Name sagt, eine Giftwirkung, und zwar die meisten bakteriellen Toxine eine ganz gewaltige ausüben, sie aber durch ihre Antikörper, die sog. Antitoxine gebunden und damit entgiftet werden, so lag es auf der Hand, Mittel und Wege zu suchen, um die Antitoxine durch Toxineinverleibung in erhöhtem Maße darzustellen. Man machte die so vorbehandelten Tiere also giftfest oder, wie wir sagen, aktiv immun. Nun war die Möglichkeit der Erzielung einer großen Giftfestigkeit immerhin eine sehr interessante, für die Praxis jedoch nicht im großen Maßstabe verwertbare Tatsache, denn eine gewisse Giftfestigkeit konnte man ja, wie längst bekannt, in der Form der Giftgewöhnung auch durch andere Gifte organischer und anorganischer Natur, die keinen antigenen Charakter hatten, erzeugen. Da aber setzte die Entdeckung ein, daß es gelingt, durch Über-

tragung der erzeugten Antikörper, also in unserem Falle der Antitoxine, die Giftfestigkeit auf andere Tiere zu übertragen, oder, wie wir sagen, sie passiv zu immunisieren. Der Träger der Antikörper ist das Blutserum, und mit Eröffnung dieser neuen Blutserumtherapie sollte das Goethe'sche Wort: „Blut ist ein ganz besonderer Saft“, für unsere Tage eine ganz besondere Bedeutung erlangen.

Die Darstellung der Heilsera, zuerst nur in kleinen und einschlägigen Laboratorien versucht, wurde mit dem Wachsen der Erfolge in therapeutischer Hinsicht bald eine Sache des Großbetriebes, und heute, wo man auf den im Laufe der Jahre gemachten Erfahrungen fußen und weiterbauen kann, ist die Herstellung der Sera in den Fabriken in technischer Beziehung vielfach mustergültig ausgearbeitet. Als Serumspender benutzt man in der Regel die blutreicheren Versuchstiere, vor allem das Pferd, ev. noch Esel, Maultiere, Rinder, Ziegen und Schafe. Nun ist nicht jedes Pferd ohne weiteres ein guter Serumspender, sondern es gehört eine Auswahl nach ganz bestimmten Gesichtspunkten dazu. Mit Rücksicht auf Infektionskrankheiten, die ev. auf den Menschen übertragbar sind, sind nur ganz gesunde, ferner zweckmäßig keine jungen Tiere zu nehmen, sondern mindestens solche, die schon im 4.—5. Lebensjahre stehen. Der Injektionen wegen empfiehlt es sich, nur Pferde mit feiner, leicht verschieblicher Haut, also solche besserer Rasse, zu nehmen. Neben guter Fütterung ist eine genügende Bewegung im Freien für die Unterhaltung dieser Serumtiere durchaus notwendig. Verlangt man nun ein reichliches Auftreten von Antikörpern im Blut dieser Tiere, so hat das zur Voraussetzung, daß von der antigenen Substanz größere Dosen durch längere Zeit einverleibt werden. Diese Voraussetzung ist anscheinend am einfachsten bei ungiftigen Antigenen zu erfüllen. Weit häufiger und wichtiger sind aber die Fälle, in denen die Antigene starke Gifte für die zu behandelnden Tiere bilden, und man darum gezwungen ist, den Antikörperlieferanten zunächst giftfest zu machen, damit ihm größere Mengen der Antigene injiziert werden können. Nehmen wir als Beispiel der einzuschlagenden Technik die Erzeugung eines Diphtherieantitoxins, so stellt sich als erste Schwierigkeit hierbei in den Weg die eminent Empfindlichkeit des Pferdes gegenüber dem Diphtherietoxin (z. B. ist sie hundertmal stärker als die des Meerschweinchens). Außer dieser allgemeinen Empfindlichkeit gibt es aber noch recht ausgesprochene individuelle Differenzen, insbesondere sind die jüngeren Tiere vielfach doppelt so empfindlich, als vollkommen ausgewachsene. Die Schwierigkeit der Dosierung der ersten Gifteinspritzung hat man durch die Einführung abschwächender Zusätze

¹⁾ Vortrag, gehalten am 20./1. 1912 im Frankfurter Bezirksverein deutscher Chemiker.

zum Diphtherietoxin zu umgehen getrachtet, und haben sich als solche Jodjodkaliumlösung und Jodtrichlorid praktisch bewährt. Diese ungleichen Wirkungen des Giftes treten aber nicht nur bei der ersten Injektion, sondern auch bei späteren Gift-einspritzungen in oft recht störender Weise zutage, und wohl kein größeres Serumwerk ist in dieser Hinsicht ohne trübe Erfahrungen geblieben. Im allgemeinen hat sich die Injektionstechnik so modifiziert, daß starke Einzelreaktionen vermieden werden, was in der Tat durch die Einhaltung größerer Pausen bis zur Erreichung einer höheren aktiven Giftfestigkeit des Tieres, etwa bis zur anstandslosen Ertragung der 2—300fachen letalen Dosis gelingt. Im Verlauf von 8 Wochen ist das Tier meist aktiv immun. Nach einer zwei- bis dreiwöchigen Pause werden dann die Injektionen mit der letzten erreichten Dosis in immer kürzeren, bis zu dreitägigen Intervallen fortgesetzt. Als sehr schonend bei der Diphtherieimmunisierung hat sich die Methode der präventiven Antitoxingabe bewährt, weil dadurch die anfängliche Diphtherietoxinwirkung paralytiert bzw. bedeutend herabgesetzt wird. Dabei scheint die Methode den weiteren Vorteil zu haben, daß der mit ihr erzielte durchschnittliche antitoxische Wert entschieden besser ist, als nach der alten Injektionsweise. Was die Dauer der Verwendbarkeit der antitoxinliefernden Pferde betrifft, so sind die meisten 3—4 Jahre, andere 5 und 6 Jahre und sogar darüber verwendbar. Da jedem Pferde jährlich durchschnittlich in 12 Aderlässen 70—75 l Blut entzogen werden, so kann man bei einer durchschnittlichen Verwendungsdauer von 3½ Jahren, abzüglich der Probeimmunisierungszeit, auf etwa 180 l Blut resp. ca. 60 l Serum pro Pferd rechnen. Da 1 l Diphtherieserum von 4—500 I.-E. im Liter ca. 1200—1400 M kostet, so kann man sich den ungefährn Kosten- und Unkostenpunkt danach errechnen. In analoger Weise verläuft die Erzeugung anderer Antitoxine. Auch über die Erzeugung der anderen Sera mit agglutinierender, präcipitierender oder lytischer Wirkung ist vom technischen Standpunkt nichts Wesentliches hinzuzufügen. Ob man lebende oder abgetötete Kulturaufschwemmungen oder sonst wässrig gelöste Antigene injiziert, immer bleibt vorsichtige Steigerung der Einzelgaben und Beobachtung der Reaktionen des Tieres die Hauptbedingung des Gelingens.

Haben die Tiere nun den gewünschten Grad der Immunität erreicht, so werden sie gehluttet, d. h., es wird ihnen durch Finstich in die Halsvene mittels Aderlaß Blut entzogen. Wie bereits bemerkt, liefert ein Pferd bei jeder Blutentnahme durchschnittlich 5—6 l Blut, von denen man ungefähr 3 l reines Serum erhält. Das Blut wird in hohen, 1,5 l fassenden Standgefäßern steril aufgefangen und darin zwei Tage bei 10—25° ruhig stehen gelassen. Danach wird es mittels Hebers in sterile Kolben gesammelt. Da dieses sog. Rohserum in einigen Tagen beim Stehen in mittlerer Temperatur eine wechselnde Menge roter Blutkörperchen absetzt, so wird es nochmals in frische sterile Kolben hingepresst. Dann kann es nach Sterilitätsprüfung und Wertbestimmung zur Verwendung abgegeben werden. Besser ist es jedoch, derartig vorbehandelte Sera längere Zeit bei niederer Temperatur

stehen zu lassen. Es bildet sich dann ein weißlicher, an den Wänden haftender Belag, öfter auch eine dünne Haut, die im wesentlichen aus Cholesterin besteht. Nach der Abscheidung dieses Körpers bleibt das Serum, das in stärkeren Schichten eine grünlichgelbe Farbe im durchfallenden Licht, eine schmutzig graugrüne im auffallenden besitzt, jahrelang unverändert haltbar, wofür es nur kühl und vor Licht und bakterieller Verunreinigung geschützt aufbewahrt wird, weshalb man auch Konservierungsmittel, wie z. B. 0,5% Phenollösung, hinzufügt.

Die weitverbreitete Anwendung, welche das Diphtherieserum schon bald nach der Entdeckung der Antitoxine erfuhr, ließ es wünschenswert erscheinen, staatlicherseits für die Herstellung absolut unschädlicher und vollwertiger Serumpräparate Sorge zu tragen, einmal, um das Publikum gegen den Vertrieb minderwertiger und fehlerhaft zubereiteter Sera zu schützen, und andererseits, um für die leichtere Beurteilung der neuen Heilmethode durch Verwendung zweifellos guter Sera von feststehendem Wert eine sichere Grundlage zu schaffen. Dieser Zweck konnte auf zwei Wegen erreicht werden, entweder durch Verstaatlichung der Serumfabrikation überhaupt oder aber durch die Einführung einer staatlichen Serumkontrolle der für den Handel bestimmten Serumproben. Man entschied sich seinerzeit für den letzteren Weg, wobei zugleich durch Kaiserl. Verordnung vom 31./12. 1894 das Diphtherieheilserum dem freien Verkehr entzogen und in die Reihe derjenigen Arzneistoffe aufgenommen wurde, die nicht außerhalb der Apotheken feilgehalten und verkauft werden dürfen. Die Vornahme der staatlichen Prüfungen wurde zunächst dem Institut für Infektionskrankheiten in einer eigenen Kontrollstation übertragen. Daraus entstand das Institut für Serumforschung und Serumprüfung, zu dessen Leiter Paul Ehrlich im Jahre 1896 berufen wurde. 1899 wurde diese Anstalt als Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. neuerrichtet und seitdem die Prüfungen der Heilsersa in der prüfungstechnischen Abteilung des Instituts vorgenommen.

Die amtliche Prüfung der Sera im Institut bezieht sich einmal auf die Feststellung ihrer Unschädlichkeit und zweitens auf die Prüfung ihres Wirkungswertes. Die Prüfung auf Unschädlichkeit begegnet keinen besonderen Schwierigkeiten. Als unschädlich wird eine Serumprobe angesehen, wenn sie 1. völlig klar und frei von größeren Niederschlägen ist; 2. keine bakteriellen Verunreinigungen enthält, bzw. bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seris den erlaubten Keimgehalt nicht überschreitet; 3. nicht mehr als 0,5% Phenol enthält; 4. frei von Toxinen ist, und 5. ihr Eiweißgehalt einen bestimmten Prozentsatz nicht übersteigt. Die Wertbestimmung der Sera ist dagegen mit Ausnahme der des Diphtherieheilserums in technischer Beziehung meist eine recht komplizierte, sie stellt dabei keine eigentliche Eichung der zur Prüfung eingesandten Probe dar, sondern beschränkt sich auf eine Nachprüfung des dem Institut von der Fabrik angegebenen Titers.

Bekanntlich unterscheiden wir unter den Immunseris, je nach ihrer Gewinnungsart und speziellen Wirkungsweise zwei verschiedene Typen, die antitoxischen und die antibak-

teriellen Heilsera. Die ersten lassen sich nur mit löslichen, Bakteriengiften, sog. Filtratgiften erzeugen, während man zur Herstellung der antibakteriellen die Leibessubstanzen der Bakterien verwendet. Verschieden, wie in ihrer Erzeugung, sind sie auch in ihrer Wirkungsweise, insofern, als die antitoxischen Sera nicht direkt gegen die Bakterien selbst, sondern zunächst gegen die von ihnen sezernierten Gifte wirksam sind, während die antibakteriellen Sera sich imstande erweisen, die Bakterien selbst zu vernichten. Um den Wirkungswert der Antitoxinsera zu definieren, messen wir ihren Gehalt an Antitoxinen durch Feststellung ihrer toxinneutralisierenden Kraft, wogegen der Wert bei den antibakteriellen Seris, wie wir später sehen werden, nach ihren Schutzwirkungen im Tierexperiment bemessen wird.

Beschäftigen wir uns zunächst mit der Bestimmung der antitoxischen Sera, so finden wir die Verhältnisse hier noch relativ einfach. Um den Wirkungswert eines antitoxischen Serums zu definieren, prüfen wir seinen Gehalt an Antitoxinen. Daß wir mit der Bestimmung des Gehaltes an Antitoxinen tatsächlich den ganzen Wertgehalt eines antitoxischen Serums analysieren können, schien ja vorerst Zweifel erregen zu sollen. Genauer schien es, wenn man bei der Prüfung eines antitoxischen Serums im ganzen vier Werte bestimmte. 1. den Immunisierungswert gegenüber einer Infektion; 2. den Heilwert gegenüber einer Infektion; 3. den Immunisierungswert gegenüber einer Intoxikation und 4. den Heilwert gegenüber einer Intoxikation. Allein durch zahlreiche Untersuchungen, von v. Behring und Ehrlich angefangen, von Marx fortgesetzt und in der neuesten Zeit durch Berghausen u. a. bestätigt, hat sich gezeigt, daß unter diesen vier Werten ein völliger Parallelismus besteht, und daß, wenn einer davon bestimmt ist, daraus Rückschlüsse auf die anderen gezogen werden können. Wir sind also hiernach berechtigt, die Wertbemessung der antitoxischen Sera allein durch die Feststellung ihres Gehaltes an I.-E.²⁾ vorzunehmen. Leider ist diese Bestimmung bei vielen antitoxischen Seris nicht so einfach. Am klarsten liegen die Verhältnisse noch beim Diphtherieserum und Tetanusserum, wo wir die genauesten Kenntnisse über die Konstitution der Gifte und über die Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin besitzen. Wir wissen heute, daß bei der Bindung zwischen Toxin und Antitoxin sich diese beiden Komponenten direkt chemisch vereinigen müssen, ohne Mitwirkung irgendwelcher vitaler Kräfte. Es entsteht bei der Bindung Toxin-Antitoxin eine neue ungiftige Verbindung ohne daß, wie man anfangs vielfach annahm, es zu einer Zerstörung des Toxins kommt, was daraus resultiert, daß es gelingt, durch sinnreiche Experimente das Toxin aus der neuen Verbindung wieder zu isolieren. Will man nun bei der Bestimmung der antitoxischen Wirkungskraft eines Serums vergleichbare Resultate erzielen, so ist es klar, daß man dazu eines unveränderlichen Maßstabes bedarf. Als solch ein auf unbegrenzte Zeiten hin konstant zu haltender Maßstab dient uns die sog. Immunitätseinheit. Anfangs anders bestimmt, sind

die jetzt in der Prüfungstechnik gebrauchten Maßeinheiten, eben die I.-E., willkürlich gewählte Größen, die, einmal bestimmt, stets nur konstant erhalten werden müssen. So stellt z. B. die beim Diphtherieserum gebräuchliche I.-E. diejenige Menge Antotoxin dar, die Ehrlich bei seinen ersten Versuchen genügte, um damit 100 tödliche Meerschweinchengiftdosen abzusättigen. Daß man das Antitoxin und nicht das Gift als Träger der Maßeinheit wählt, liegt daran, daß eine Konstanterhaltung beim Gift sich nicht sicher erreichen läßt, während dies beim Serum durch bestimmte Konservierungsmethoden der Fall ist. Das erste zu Standardzwecken verwandte Serum, welches als Diphtherie *standard serum* im Frankfurter Institut, ähnlich wie das Metermaß in Paris aufbewahrt wird, ist z. B. ein seinerzeit evakuiertes Diphtherietrockenantitoxin von 1700facher Stärke. Da nun der Maßstab, wenn er verloren ginge, unersetzlich wäre, und die absolute Konstanterhaltung Grundbedingung einer exakten Wertbemessung ist, so liegt natürlich eine der Hauptaufgaben der amtlichen Prüfungsstelle darin, mit allen zu Gebote stehenden Mitteln für die absolute Unveränderlichkeit der Maßstäbe Sorge zu tragen, das geschieht durch die Konservierung der Sera in den Ehrlichen Vakuumapparaten. Von der gleichen praktischen Wichtigkeit wie die Konservierung ist natürlich auch die Fortführung der Maßeinheit bei der Einstellung eines neuen Standardserums, die deshalb mit der peinlichsten Akuratesse ausgeführt werden muß. Um ein neues Serum auf das alte einzustellen zu können, bedarf es als *tertium comparationis* noch eines spezifischen Giftes. Wir bezeichnen dieses Gift von prüfungstechnischer Konstanz als *standard-gift* und benutzen dazu beim Diphtherieserum sog. abgelagerte, in flüssigem Zustande unter Toluol konservierte Toxine. Beim Tetanusserum sind es trocken konservierte Gifte, da die flüssigen in ihrer Wirkung labil sind. Mit diesen Hilfsmitteln, Serum und Gift, gilt es nun, zwei Giftdosen zu ermitteln. Einmal die sog. L.-O. Dosis, die von der betreffenden Antitoxindosis so abgesättigt ist, daß eine Giftwirkung nicht mehr zu erkennen ist, und zweitens die sog. L. + Dosis, das ist diejenige Giftmenge, die so verändert ist, daß von den in dem Gift enthaltenen vielfachen tödlichen Giftdosen, nur eine einzige Dosis letalis übrig geblieben ist. In der Prüfungspraxis verwenden wir heute die L. + Dosis. Ausgeführt wird die Prüfung an bestimmten, hierzu ganz besonders geeigneten Versuchstieren, beim Diphtherieserum an Meerschweinchen, beim Tetanusantitoxin an weißen Mäusen, beim Dystenterieserum an Kaninchen usw. Bei der kolossalen Wirksamkeit unserer Prüfungskomponenten ist ein technisch minutioses Arbeiten natürlich Pflicht und Bedingung. Wir bedienen uns als *Meßapparate* ganz bestimmter, zum Teil eigens für diesen Zweck gefertigter Pipetten, von denen die sog. Feinpipetten auf $1/100$ ccm geeicht und von uns in den verschiedensten Sätzen vorrätig gehalten werden. Alle Mischungen von Gift und Serum nehmen wir in kleinen Fläschchen aus dunklem Glas vor, dann wird die Injektionsmenge mittels graduierter Spritzen entnommen, oder deren Inhalt wird, wie bei der Diphtherieserumprüfung,

2) I.-E. = Immunitätseinheit (s. u.).

direkt in die sog. Kochschen Spritzen übergeossen. So vorbereitet, wenden wir uns nun zur Ausführung der Prüfung eines Diphtherieheilserums, wobei ich bemerken möchte, daß die amtliche Prüfung vorschriftsmäßig stets von zwei Mitgliedern unseres Institutes unabhängig voneinander ausgeführt wird und bei differenten Resultaten eine Wiederholung unter eigener Kontrolle des Direktors auszuführen ist. Zuerst erfolgt die Prüfung auf Unschädlichkeit und dann die eigentliche Wertbemessung mit dem Giftserumgemisch an einem Meerschweinchen. Das Ergebnis wird in ein Protokollbuch eingetragen und der einsendenden Fabrik auf einem Prüfungsschein mitgeteilt, wonach, wenn das Serum als vollwertig³⁾ befunden ist, die Freigabe durch den staatlichen Kontrollbeamten in der Fabrik erfolgt, und das Serum zur Abfüllung gelangt. Die von uns ausgeübte Wertbemessungsmethode ist seinerzeit von Ehrlich ausgearbeitet und später noch mehrfach verbessert worden, so daß sie mit einer Fehlerquelle von höchstens 2% arbeitet. Auch das Ausland hat die Methode zum größten Teil angenommen, und ist die größte Gleichmäßigkeit dadurch gewährleistet, daß auch im Ausland eine große Reihe staatlicher Institute und wissenschaftlicher Laboratorien (zurzeit 56) regelmäßig alle zwei Monate frisch eingesetztes Standardserum von unserem Institut beziehen und damit den einheitlichen Maßstab auch ihren Prüfungen zugrunde legen. In Deutschland besteht für die Prüfung des Diphtherieserums eine amtliche Prüfungschrift, die sowohl die Kontrolle im Fabrikationsbetriebe durch staatliche Kontrollbeamte als auch die Ausführung der amtlichen Prüfungen genauestens reguliert. Die Prüfung ist definitiv (obligatorisch), d. h. ungeprüftes Diphtherieheilserum darf in Deutschland nicht in den Handel gebracht werden. Um das Publikum nun auch weiterhin vor verdorbenen oder abgeschwächten Seren zu schützen, besteht die Vorschrift, daß alle Diphtheriesera sechs Monate bzw. zwei Jahre nach ihrer Zulassung einer Nachprüfung zu unterziehen sind. Sera, die dabei eine Abschwächung von mehr als 10% erkennen lassen, gelangen zur Einziehung, wobei den Apotheken von den Fabrikationsstätten unentgeltlich entsprechender Ersatz zu leisten ist; nach drei Jahren werden alle Sera ohne weiteres eingezogen, so daß also die bisweilen geäußerte Meinung, es seien Schädigungen durch zu altes oder zu schwaches oder verdorbenes Serum hervorgerufen worden, meist in das Reich der Fabel verwiesen werden kann.

Erheblich schwieriger als beim Diphtherieheilserum liegen die Verhältnisse bei der Wertbemessung des Tetanusantitoxins. Sie sind bedingt einmal durch eine ganz kolossale Labilität des Giftes im flüssigen Zustande und dann durch die geringe Avidität des Tetanustoxins zu seinem Antitoxin. Dieser Schwierigkeiten sucht man Herr zu werden, einmal durch Trockenkonserverung des Tetanustestgiftes und zweitens durch besondere Vornahme der Prüfungen. Man macht nämlich beim Tetanusserum stets zwei Prüfungs-

³⁾ In Deutschland verwendetes Diphtherieheilserum muß mindestens 350 J.-E. in 1 ccm enthalten. Heilsera, die 500 J.-E. und darüber in 1 ccm enthalten, werden als „hochwertig“ bezeichnet.

reihen, eine unter Zugrundelegung unseres Standardserums und Standardgiftes und eine zweite mit dem zu prüfenden Serum und dem Standardgift. Durch den Vergleich dieser beiden Reihen ist man stets in der Lage, zu erkennen, ob das zu prüfende Serum den von der Fabrik angegebenen Wertgehalt besitzt. Wir konservieren dabei sowohl Serum wie Gift in Einzeldosen in abgeschmolzenen Glasröhren. Nach Lösung des Standardserums in entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung und desgleichen des zu prüfenden Serums, so zwar, daß in 1 ccm der Verdünnung genau $1/100$ Antitoxineinheit enthalten sein muß, 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 und in die der zweiten Reihe je 1 ccm der von dem zu prüfenden Serum hergestellten Lösung. Zu jeder Reihe gibt man steigende Dosen Toxin, die man so wählt, daß voraussichtlich alle Werte von LO. bis L+ getroffen werden, dann werden die Gemische mit physiologischer Kochsalzlösung auf 4 ccm angefüllt und nach halbtständiger Bindung im Dunkeln bei Zimmertemperatur von jedem Gemisch 0,4 ccm weißen Mäusen subcutan unter die Haut des rechten Hinterfußes injiziert, so daß also jede Maus $1/1000$ Antitoxineinheit plus fallende Mengen Giftes erhält. 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. Wie aus dem Gesagten hervorgeht, ist also die Wertbemessung des Tetanusantitoxins viel komplizierter als die des Diphtherieheilserums. Aus diesem Grunde wird auch eine absolut genaue Werteinstellung von seiten der Fabrik bei Einsendung der Präparate nicht verlangt. Zwar müssen auch hier die Sera mit einer bestimmten Titerangabe zur Prüfung eingesandt werden, werden jedoch, wenn sie sich bei der Prüfung als nicht vollwertig erweisen, nicht direkt zurückgewiesen, sondern in diesem Falle stellt das Institut die Sera genauer ein und läßt sie zu dem gefundenen Titer zu, vorausgesetzt, daß mindestens vier Antitoxineinheiten in 1 ccm flüssigem bzw. 40 in 1 g trockenem Serum vorhanden sind. Auch für das Tetanusantitoxin ist bei uns die Prüfung seit einigen Jahren eine definitive geworden. Erwähnen möchte ich hierbei noch, daß man in Frankreich die Prüfung des Tetanusserums nicht an weißen Mäusen, sondern an Meerschweinchen vornimmt, und daß man je nach dem Wertgehalt die Sera zum Gebrauch in der Veterinärpraxis oder die Höherwertigen zum Gebrauch in der humanen Medizin zuläßt. Von den ersten verlangt man, daß $1/10000$ bis ein $1/1000$ cmm 100 letale Dosen für ein Meerschweinchen völlig neutralisiert, während das für die menschliche Medizin bestimmte Serum dieselbe Wirkung noch in $1/1000000$ cmm ausüben muß. Außer diesen beiden, dem Diphtherie- und dem Tetanusserum, gibt es noch andere antitoxische Sera, die in ihrer praktischen Bedeutung an diese aber bei weitem nicht heranreichen und daher der staatlichen Kontrolle bisher nicht unterliegen. Ich möchte hier nur das Rausch-

b r a n d a n t i t o x i n, ferner das besonders in letzter Zeit anläßlich der Berliner Vergiftungssaffaire vielgenannte **B o t u l i s m u s s e r u m** und endlich ein für die Tropen sehr wichtiges Serum, das **S c h l a n g e n g i f t a n t i t o x i n**, erwähnen. Dieses wird in Lille von Calmette im Institut Pasteur, außerdem von Speziallaboratorien in Britisch-Indien, sowie in Nordamerika und Brasilien hergestellt. Da die zu ihrer Darstellung nötigen Schlangengifte verschieden in ihrer Zusammensetzung und Wirkung sind, je nachdem sie von den Colubriden oder Viperiden stammen, sind erklärlicherweise auch die betreffenden Antitoxine wirksam nur gegen ihre spezifischen Toxine. So sind die mit dem Gift amerikanischer Viperiden hergestellten Sera unwirksam gegen das Toxin der Colubridenarten, da die Wirksamkeit des ersten Giftes in seinem Gehalt an Hämorrhagin und Hämolytin beruht, während das Colubridengift daran arm ist, aber reich an neurotoxischen Substanzen. Die Wertbemessung wird gewöhnlich an Kaninchen vorgenommen. Calmette prüft den Schutzwert des Serums, indem er dem Versuchstier erst 2 ccm Serum in eine Ohrvene injiziert und zwei Stunden später diesem und einem Kontrolltier 1 mg Gift, wonach letzteres bei intravenöser Applikation innerhalb 30 Minuten und bei subcutaner Einverleibung nach 2—3 Stunden zugrunde gehen muß.

Außer den vorbesprochenen rein antitoxischen Seris, kennen wir nun noch eine Reihe wohl hauptsächlich antitoxisch bzw. antiendotoxisch⁴⁾ wirkender Sera. Hierbei wäre zu berücksichtigen das Dysenterie- oder Ruhrserum, das Typhus- und das Choleraantitoxin und endlich das in den letzten Jahren vielgenannte Meningokokken- oder Genickstarreserum. Die Frage ihrer Wirksamkeit ist zurzeit noch nicht völlig geklärt, jedoch neigt man nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen dazu, das wirkende Agens in einem spezifischen Antitoxin zu suchen. Auf der Ermittlung des Antitoxingehaltes bauen sich daher die jetzt gebrauchten Wertbestimmungsmethoden in der Hauptsache auf, wenn auch der Gehalt an anderen Immunkörpern, wie wir nachher sehen werden, dabei oft noch eine Berücksichtigung finden muß. Während dem Typhus- und dem Choleraserum eine Wirksamkeit bisher nur von einzelnen Untersuchern vindiziert wurde, scheint das antitoxische Ruhserum tatsächlich des öfteren bei großen und schweren Ruhrepidemien, wie sie besonders in Galizien vorgekommen sind, unzweifelhaft therapeutische Wirksamkeit entfaltet zu haben. Als Versuchstiere für die Auswertung antitoxischer Dysenteriesera kommen hauptsächlich Kaninchen in Frage. Während nun einzelne Autoren die Bestimmung des Wertgehaltes nach der vorbesprochenen **E h r l i c h s c h e n** Giftserummischungsmethode ausführen, verleiben andere das Toxin und das Antitoxin zwar gleichzeitig, aber getrennt ein. Zur therapeutischen Verwendung geeignet erscheint Dysenterieserum, welches in Dosen von 0,1 ccm Kaninchen von 1000 g bei gleichzeitiger, aber getrenn-

ter intravenöser Applikation des Giftes gegen die einfach letale Giftdosis zu schützen vermag. Weit größere Bedeutsamkeit aber kommt in der Praxis der Wertbemessung des **G e n i c k s t a r r e s e r u m s** zu. Während nun die therapeutische Wirksamkeit dieses Serums nach den ziemlich übereinstimmenden Berichten der klinischen Beobachter außer Zweifel steht, herrscht über die Frage einer praktisch brauchbaren Wertbemessungsmethode des Serums unter den Autoren zurzeit noch keine Einigkeit. Während die Prüfungen an weißen Mäusen gegen einverleibte Kulturdosen einigen Untersuchern günstige Resultate ergaben, hat die Mehrzahl der Autoren diese Prüfungsmethode wegen der geringen Virulenz der Meningokokken für Mäuse abgelehnt. Dagegen läßt sich die giftneutralisierende Fähigkeit des Meningokokkenserums konstant und ziemlich sicher quantitativ nachweisen. Als Versuchstiere dienen Meerschweinchen von 150 g Gewicht. Als Giftlösung verwendet man toxische Extrakte der Bakterienleiber, von denen man verlangt, daß sie in Mengen von 0,1, mindestens aber von 0,3 für Meerschweinchen von 150 g Gewicht in 24 Stunden tödlich sind. Die Tiere erhalten je 0,1 ccm Toxin gemischt mit steigenden Mengen antitoxischen Serums in die Bauchhöhle injiziert, nachdem man zweckmäßig das Giftserumgemenge vor der Injektion eine halbe Stunde der Bindung überlassen hat. Außer dieser Bemessung der antitoxischen Quote des Serums kann man aber den Wertgehalt noch in anderer Weise bestimmen, indem man die Prüfung auf die Feststellung der wirksamen sog. bakteriotropen Substanzen erstreckt. Unter diesen Bakteriotropinen verstehen wir spezifische Substanzen im Genickstarreheilserum, die die Meningokokken zur Aufnahme und Vernichtung durch die weißen Blutkörperchen, die sog. Leukozyten vorbereiten sollen. Diese Art der Wertbestimmung können wir aber nicht am Tierkörper vornehmen, sondern wir bedienen uns dazu des Reagensglasversuches, indem wir das Meningokokkenserum in fallenden Mengen mit weißen Blutkörperchen und Meningokokken vermischen und nach einer gewissen Zeit im mikroskopischen Präparat untersuchen, inwiefern die Anwesenheit größerer Dosen des Meningokokkenserums die Aufnahme der Meningokokken durch die Leukozyten verursacht hat.

Hatten wir es nun im vorhergehenden mit Seris rein oder vorwiegend antitoxischen Charakters zu tun, so müssen wir uns jetzt noch kurz befassen mit der Wertbemessung der antibakteriellen Sera, d. h. solcher Sera, die nicht auf das Bakteriengift, sondern auf den Bakterienkörper selbst wirken, indem sie durch ihre spezifische Wirksamkeit den Bakterienleib abtöten oder zur Auflösung bringen. Es gibt eine ganze Reihe von Methoden, um die Wirksamkeit dieser Sera recht genau im Reagensglas messen zu können. Die Verwendung dieser Methoden in der Prüfungstechnik gibt aber, abgesehen von ihren vielfachen praktischen Schwierigkeiten, auch theoretisch insofern zu schweren Bedenken Anlaß, als wir im Reagensglasversuch sicherlich eine Reihe von Körpern unberücksichtigt lassen müssen, welche zweifelsohne bei der Schutzwirkung der Sera in vivo eine große Rolle spielen. Wir ver-

4) Endotoxine = im Innern der Zelle eingeschlossene, erst beim Zerfall des Zelleibes frei werdende Gifte, im Gegensatz zu den echten Toxinen (Filtratgiften).

zichten daher, besonders in der amtlichen Prüfungs-technik auf alle Reagensglasversuche und ver-suchen, ausschließlich im Tierversuch eine Entscheidung über die antiinfektiöse Wirksamkeit eines Serums zu fällen, da hier alle Faktoren, welche die Bakterien bekämpfen und vernichten, in Aktion treten und gleichzeitig zur Wirkung gelangen, während bei den Reagensglasversuchen eine bestimmte, vielleicht gerade wichtige Quote un-gemessen bleiben kann. Dadurch, daß wir aber allein auf den Tierversuch angewiesen sind, ent-steht eine Reihe prüfungstechnischer Schwierigkeiten, auf die näher einzugehen hier zu weit führen würde. Ich möchte nur folgendes erwähnen: Wäh-rend wir bei den antitoxischen Seris den Tier-körper nur dazu benutzen, um uns durch sein Ver-halten von einer vorher im Reagensglas erfolgten mehr oder minder gelungenen Absättigung eines Toxins durch sein Antitoxin Gewißheit zu ver-sehaffen, muß der Tierkörper bei der Prüfung der antibakteriellen Sera diesen zu ihrer Wirksamkeit überhaupt erst verhelfen, indem er gewisse spezi-fische Substanzen, die sog. Amboceptorien des Immunserums durch einen in seinem Blutserum vor-handenen wirksamen Körper, das sog. Komple-ment, wie wir sagen, komplettiert und dadurch die bakterienfeindlichen Kräfte des Serums auslöst. Da aber nun nicht jedes Immunserum durch das Komplement eines beliebigen Tieres komplettiert wird, so erwächst für die Prüfungstechnik zunächst hieraus die Aufgabe, geeignetes Tiermaterial zu finden, welches das in der Regel von Pferden ge-wonnene Serum, das in der Praxis bei irgendeiner anderen Tierart verwendet werden soll, genügend gleichmäßig komplettiert, wie dies z. B. die Maus bei im Rotlaufserum tut. Dieses Serum wird be-kanntlich von Pferden gewonnen, an der Maus ge-prüft und beim Schwein angewandt. Eine weitere Schwierigkeit bei der Prüfung der antibakteriellen Sera besteht darin, die zur Verwendung gelangen-den Bakterienkulturen in konstanter Viru-len-zu erhalten, was jedem, der sich einmal bak-teriologisch beschäftigt hat, noch in bester Erin-ne-rung sein dürfte. Diese Schwierigkeiten umgehen wir durch Verwendung eines Standard-serums von bekanntem Titer als Maßstab für die Kultur. Als Wertgehalt der baktericiden Sera bestimmen wir nur ihren Schutzgehalt, da bei fast allen eine eigentliche kurative Wirkung ex-perimentell sich kaum feststellen läßt. Auch hier drücken wir den Wirkungswert nach I.E. aus, und zwar hat sich in der staatlichen Kontrolle der Usus eingebürgert, ein Serum, das in der Dosis von $1/100$ ccm gegen die nachfolgende tödliche Dosis lebender Bakterien schützt, kurz als hundert-fach zu bezeichnen. Als Prüfungstiere par excellence für die antibakteriellen Sera haben sich die weißen Mäuse gezeigt. Alle der staatlichen Prüfung unterliegenden antibakteriellen Sera, wie das Antistreptokokkenserum, das Rotlaufserum, das Geflügelcholera- und das Schweinegeschweserum werden an ihnen geprüft. Stets wird zuerst eine Versuchsreihe mit unserem Standardserum in fallen-den Mengen gegen eine stets gleichbleibende Kul-turdosis angelegt und zweitens ein Parallelversuch mit dem zu prüfenden Serum. Aus dem Vergleich der Resultate beider Versuchsreihen ergibt sich

ohne weiteres, ob das zu prüfende Serum die Wirk-samkeit des Standardserums erreicht und damit vollwertig ist oder aber in seiner Wirksamkeit sich als schwächer und damit minderwertig zeigt. Da wir, wie bereits gesagt, nur den Schutzwert fest-stellen, so wird zuerst das Serum und erst eine Weile, meist eine Stunde später, beim Rotlauf-serum sogar erst 24 Stunden später die Kulturdosis den Versuchstieren einverlebt.

Die Kontrolle all dieser antibakteriellen Sera ist, wie das aus ihrer zurzeit noch viel umstrittenen wirklichen Wertigkeit, ohnehin resultiert, für die Fabrikanten bis auf weiteres keine obligatorische, sondern vorläufig eine fakultative, mit dem End-zweck, den Ärzten bei diesen zum Teil noch in der Erprobung begriffenen Seris wenigstens völlig unschädliche und möglichst gleichmäßige Präparate in die Hand zu geben.

Damit mit meinen Ausführungen zu Ende, können diese bei der Kürze der zur Verfügung stehenden Zeit natürlich nicht Anspruch machen auf eine erschöpfende Darstellung, sondern sie sollten nur eine allgemein orientierende Übersicht bedeuten für den Nichtfachmann über ein fremderes Wissensgebiet. Wenn dabei auch Einzelheiten bis-weilen nicht vermieden sind, so geschah dies in der Absicht, einen Begriff zu geben von den Schwierigkeiten, wie sie gerade auf prüfungstechnischem Ge-biete in der Überwindung anscheinend belangloser, in praxi aber sehr zu berücksichtigender Kleinigkeiten sich oft häufen. [A. 25.]

Die Fettanalyse und die Fettchemie im Jahre 1911¹⁾.

Von Dr. W. FAHRION.

(Eingeg. 17.2. 1912.)

Die allgemeine Fettknappheit hat zwar im Laufe des letzten Jahres nachgelassen, normale Verhältnisse sind aber noch nicht zurückgekehrt, und für die meisten Zweige der Fettindustrie bildet die unsichere Lage des Fettmarktes eine ständige Quelle der Beunruhigung. Die Vermehrung der Fachliteratur hat im Jahre 1911 weitere Fortschritte gemacht, wogegen es auf dem Gebiete der experi-mentell-wissenschaftlichen Arbeiten ziemlich ruhig war.

Ein Spezialkomitee der American Chemical So-ciety hat Vorschläge für die einheitliche Unter-suchung der Fette und Öle gemacht²⁾, gegen die sich aber verschiedenes einwen-den läßt. Dagegen bedeutet es einen erfreulichen Fortschritt, daß amerikanische, englische, franzö-sische und deutsche Chemiker eine internatio-nale Methode zur Analyse des Roh-glycerins in allen Einzelheiten festgelegt haben (s. später).

J. Klimont³⁾ betont mit Recht, daß auch

¹⁾ Eine eingeklammerte Jahreszahl im Text bedeutet den betreffenden Jahresbericht; wenn in den Fußnoten keine Jahreszahl genannt ist, ist 1911 gemeint.

²⁾ Chem.-Ztg. 35, 265.

³⁾ Diese Z. 24, 255.