

II. Aus dem Institut für Serumforschung und Serumprüfung in Steglitz b. Berlin.

(Director: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. Ehrlich.)

Ueber das Antitoxin des Tetanus.

Von Prof. W. Dönitz.

A. Kann den Körpergeweben schon gebundenes Tetanusgift durch das Antitoxin wieder entzogen werden?

Als jüngst das von den Höchster Farbwerken hergestellte Tetanusheilserum der staatlichen Controlle unterzogen werden sollte, stellte sich für das mit dieser Controlle beauftragte Institut für Serumforschung und Serumprüfung von selbst die Frage, ob dieses Serum ein wirkliches Heilmittel sei. Dass das Serum imstande ist, im Blute kreisendes Tetanusgift zu neutralisiren, war ja hinlänglich bekannt. Dass es experimentell erzeugten Tetanus unter gewissen Bedingungen zu heilen imstande sei, hatte Behring, und neuerdings Knorr in seiner Habilitationsschrift nachgewiesen. Es sind diese Heilerfolge aber von manchen Seiten so gedeutet worden, dass sie auf einer Hinderung des Fortschreitens des Krankheitsprocesses beruhen und daher in den Bereich des Begriffes der Immunisirung fallen. Bei dieser Sachlage stellte sich für uns die Aufgabe, zu untersuchen, ob das im Nervensystem schon gebundene Tetanusgift demselben wieder durch das Heilserum entzogen werden kann. Nur in diesem Falle würde es als wirkliches Heilmittel zu betrachten sein.

Um diese principiell wichtige Frage zu entscheiden, habe ich Versuche angestellt, über die ich hier berichten will.

Zunächst wurde der absolute Werth eines trockenen Tetanusgiftes bestimmt, welches von Herrn Dr. Knorr in Marburg in lebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt war. Ein Cubikcentimeter einer Lösung von 1 : 350, einem grossen Kaninchen intravenös beigebracht, machte überhaupt keine tetanischen Erscheinungen. Zwei Thiere, welche die etwas stärkere Lösung von 1 : 300 erhielten, starben an Tetanus am 7. und 9. Tage. Die einfach tödtliche Dosis stellte sich demnach für 2 kg schwere Kaninchen auf $\frac{1}{300} = 0,0033$ g.

Darauf wurde der Neutralisationswerth eines Serums, welches wir dem freundlichen Entgegenkommen der Höchster Farbwerke verdanken, in der Weise bestimmt, dass ein vielfaches Multiplum der einfach tödtlichen Giftdosis reihenmässig mit einer wechselnden Menge Serumlösung gemischt und den Kaninchen intravenös eingespritzt wurde. Die Giftmenge betrug immer 1 ccm einer vierprocentigen Lösung, entsprechend ungefähr der zwölfwachen Menge der einfach tödtlichen Dosis. Von dem Serum genügte 1 ccm einer Verdünnung von 1 : 2000 zur vollkommenen Neutralisation. Bei einer Verdünnung von 1 : 2200 und 1 : 2400 starben die Kaninchen am 6. und am 3. Tage. Wurden dagegen stärkere Concentrationen angewandt, so erkrankte keines der Thiere.

Nachdem diese auf das in Anwendung gezogene Gift und Serum bezüglichen Constanten gefunden waren, konnte mit den Versuchen über die Bindung des Giftes im Thierkörper begonnen werden. Sie wurden in der Weise angestellt, dass nach Einverleibung von 1 ccm vierprocentiger Giftlösung eine gewisse Zeit mit der Injection des Antitoxins gewartet wurde. Selbstverständlich wurden Kaninchen von annähernd gleichem Gewichte genommen, etwa zwischen 1800 und 2000 g, und bei allen Versuchen die intravenöse Injection gewählt, weil nur auf diese Weise der Zeitpunkt, wo die Wirkung des Antitoxins beginnt, mit Sicherheit festgestellt werden kann, denn er fällt mit dem Zeitpunkte der Einspritzung zusammen. Dabei tritt auch die gesammte Menge

des Antitoxins mit einem Male in Wirksamkeit, was bei subcutaner Anwendung vollkommen ausgeschlossen und bei intraperitonealer Injection kaum annähernd zu erreichen ist.

Wenn nun das Serum sofort nach dem Gifte in die Randvene des andern Ohres eingespritzt wurde, so reichte die versuchsmässig festgestellte neutralisirende Menge von 1 : 2000 nicht aus, den Ausbruch des Tetanus zu verhindern und den Tod abzuwenden. Auch bei einer Verdünnung von 1 : 1300 starb das Thier, und selbst die Verdünnung von 1 : 1200, innerhalb der ersten 2 Minuten gegeben, war noch nicht sicher, denn von 2 Kaninchen starb das eine an Tetanus am 6. Tage, während das andere mit vorübergehenden Krankheitserscheinungen davonkam.¹⁾ Da nun diese ganze Versuchsreihe darauf hinausläuft, die zur Neutralisation des Giftes nöthigen Serumengen zu ermitteln, je nachdem man zwischen der Einverleibung des Giftes und des Serums verschieden lange Zeit vergehen lässt, so kann man immerhin als Ausgangspunkt das Verhältniss von 1 : 1200 annehmen, d. h. zur Neutralisation im Körper bedurfte es 1 cem der Verdünnung des Serums von 1 : 1200, bei sofortiger Anwendung, wobei unter sofort ein möglichst kurzer Zeitraum zu verstehen ist, der sich aber bis auf 2 Minuten ausdehnen kann.

Bei vier Minuten Zwischenzeit erwies sich die Verdünnung von 1 : 1000 eben noch ausreichend, denn das Kaninchen bot nur vom vierten bis sechsten Tage leichte Krankheitserscheinungen dar; 1 : 600 schützte vollkommen. — Bei acht Minuten wurde ein Thier eben noch krank, welches 1 : 200 bekommen hatte, doch waren die Krankheitserscheinungen am neunten Tage geschwunden. Nach $\frac{1}{4}$ Stunde reichte wieder 1 : 200 nicht mehr aus: das Thier starb am vierten Tage an Tetanus; dagegen schützte die doppelte Serummenge, 1 : 100, vollkommen. Eine halbe Stunde nach dem Gifte genügte 1 : 100 nicht mehr, denn der Tetanus brach schon am nächsten Tage aus. Allerdings besserten sich die tetanischen Erscheinungen vom siebenten Tage an, aber das Kaninchen ging doch am zehnten Tage ein, eine Erscheinung, auf die ich noch zurückkomme. — Ein Thier, welches nach einer vollen Stunde die gleiche Serummenge, 1 : 100, erhalten hatte, erlag schon am dritten Tage; aber bei 1 : 50 kam ein Thier mit vier bis fünf Tage dauernden bedrohlichen Krankheitserscheinungen davon.

Diese Versuchsreihe zeigt zunächst, dass bei schwerer Vergiftung die zum Schutz gegen den Ausbruch des Tetanus nöthige Serummenge in auffallender Weise mit der Zeit wächst, welche zwischen Vergiftung und Serumbehandlung belassen wird. Während bei vier Minuten ein geringer Ueberschuss des Serums ausreichte, brauchte man bei acht Minuten schon die sechsfache Menge, bei fünfzehn Minuten die zwölfwache, bei einer Stunde die vierundzwanzigfache Menge.

Daraus lässt sich weiter schliessen, dass bei einer intravenösen schweren Vergiftung (mit dem zwölfwachen der einfach tödtlichen Dosis) nach vier Minuten die Bindung grösserer Giftmengen beginnt und dass nach acht Minuten wenigstens schon die einfache tödtliche Minimaldosis gebunden sein muss, denn wäre weniger gebunden, so würde ja das ganze noch freie Gift durch das in genügender Menge vorhandene Serum neutralisirt werden, und der geringe, schon gebundene Theil des Giftes würde nicht ausreichen, den Tod an Tetanus herbeizuführen.

Die hier gewonnene Zahlenreihe lässt sich kurz dahin zusammenfassen, dass man sagt: „Die zur Abwendung des Tetanus nöthige Serummenge erhebt sich binnen einer Stunde von $\frac{1}{1200}$ auf $\frac{1}{50}$ cem,“ oder mit anderen Worten: „nach einer Stunde ist 24 Mal so viel Serum nöthig als zu Anfang“. Das ist gewiss eine höchst auffallende Erscheinung, zu deren Erklärung man augenscheinlich nur den Begriff der Massenwirkung heranziehen kann. Man muss eben annehmen, dass das Antitoxin zum Toxin eine so grosse Affinität besitzt, dass es dieses aus lockeren Verbindungen auszutreiben vermag, wenn es in reichlichem Ueberschuss vorhanden ist. Das den Geweben entrissene Gift wird dann zugleich durch das Serum neutralisirt und somit unschädlich gemacht.

Dass die hierzu nöthige Serummenge von Minute zu Minute zunimmt, beruht jedenfalls darauf, dass die Bindung des Giftes durch die Gewebe des thierischen Körpers allmählich eine immer festere wird. Es muss demgemäss auch einmal ein Zeitpunkt eintreten, wo das Gift so fest gebunden ist, dass eine Lockerung desselben nicht mehr gelingt. Durch eine zweite Versuchsreihe sollte nun dieser Zeitpunkt ermittelt werden, und zwar unter Anwendung einer so grossen Serumdosis, wie sie praktisch eben noch leicht anwendbar erscheint.

Zu diesem Zwecke wurden also 5 cem einer 10 $\frac{0}{0}$ igen Serum-

lösung = dem 600fachen der neutralisirenden Dosis gewählt, da die Vergiftung wieder mit 1 cem einer 4 $\frac{0}{0}$ igen Lösung vorgenommen wurde. Die Versuche ergaben, dass bei einer Zwischenzeit von $2\frac{3}{4}$ Stunden überhaupt keine Krankheitserscheinungen auftraten. Bei $3\frac{1}{4}$ Stunde zeigten sich solche, gingen aber zurück. Dagegen kam bei 4 Stunden vereinzelt ein Thier ohne Krankheitserscheinungen davon. Bei $4\frac{1}{2}$ Stunde starb ein Thier am zweiten Tage tetanisch, während wiederum bei 5 Stunden ein Thier nur vorübergehende Krankheitserscheinungen zeigte. Sämmtliche Kaninchen, bei welchen länger gewartet wurde, gingen an Tetanus ein, meist sehr acut schon im Laufe von 1—3 Tagen. Nur wenige zeigten sich widerstandsfähiger; so starb bei $6\frac{1}{2}$ Stunde ein allerdings 2400 g schweres Thier erst am 9. Tage.

Andere und viel günstigere Zahlen wurden erhalten bei schwächeren Vergiftungen. So wurden beispielsweise einem Kaninchen von 2300 g Körpergewicht 2 cem einer Giftlösung von 1 : 300 = der doppelten tödtlichen Menge, in die Ohrvene gespritzt. Nach 20 Stunden erhielt es die üblichen 5 cem der 10 $\frac{0}{0}$ igen Serumlösung. Das Thier kam mit dem Leben davon, doch zeigten sich vom 4. bis zum 6. Tage leichte Krankheitserscheinungen. Ein Controllthier starb am 7. Tage. — Wurde etwas länger mit dem Serum gewartet, 24, 25, 30 Stunden, oder wurde bei 20 Stunden Zwischenzeit etwas mehr Gift genommen, nämlich 3 cem derselben Lösung, so waren die Thiere nicht mehr zu retten.

Das Ergebniss der hier mitgetheilten Versuche ist demnach folgendes:

1. Von dem Augenblick an, wo Tetanusgift in das Blut gelangt, wird es von den Körpergeweben gebunden.
2. Bei schwerer Vergiftung ist nach 4—8 Minuten wenigstens schon die einfache tödtliche Dosis gebunden.
3. Das gebundene Gift lässt sich durch Tetanusheilserum den Geweben wieder entreissen und neutralisiren, also unschädlich machen.
4. Diese Sprengung der Giftverbindung gelingt um so schwieriger, je schwerer die Vergiftung ist und je längere Zeit bis zur Anwendung des Serums verstrich.

Die Hauptsache aber, auf deren Ermittlung es hier ankam, ist die, dass das Tetanusheilserum ein echtes Heilmittel ist, weil es das Gift dem Körper selbst dann noch zu entziehen vermag, wenn dieses schon Verbindungen eingegangen ist, die sonst unfähig zum Tode führen.

B. Heilversuche an inficirten Thieren.

Wenn die Versuche, über die ich im Vorstehenden berichtet habe, beweiskräftig sein sollten, so musste einmal mit bekannten Grössen gearbeitet werden, also mit Gift und Antitoxin, deren Werthe gegen einander abgemessen waren; und ferner musste den Heilversuchen eine schwere Vergiftung zugrunde gelegt werden, um sie dem Bereiche des Zufälligen weit zu entrücken. Nachdem aber einmal erkannt war, dass das Antitoxin einen Heilwerth im strengsten Sinne des Wortes besitzt, erschien es mir von praktischem Interesse, mich durch eigene Versuche davon zu überzeugen, dass es auch bei manifestem Tetanus seine Wirksamkeit zu entfalten vermag. Ich ging dabei von der wohl allgemein angenommenen Voraussetzung aus, dass der in der Praxis vorkommende Tetanus häufig auf einer verhältnissmässig leichten Vergiftung beruht, indem die wenigen, aus gekeimten Sporen hervorgegangenen Tetanusbacillen, die sich in der Wunde meist nur spärlich vermehren, nur äusserst geringe Mengen Gift auf einmal absondern, Mengen, die nur durch ihre ständige Summation gefährlich werden. Es wurden demgemäss Heilversuche an Meerschweinchen und Mäusen angestellt, bei welchen nach Einbringung eines Sporenträgers schon deutliche Spuren von Tetanus aufgetreten waren.

Diese Splitterversuche bringen zwar nichts neues, sie bestätigen vielmehr lediglich die günstigen Erfahrungen, von welchen Behring, Kitasato, Knorr und andere berichtet haben; aber bei den neuerdings wieder auffälliger hervortretenden Bestrebungen, den Heilwerth der Antitoxine im Princip zu leugnen, dürfte es jetzt gerade geboten sein, mit eigenen positiven Erfahrungen nicht zurückzuhalten, sondern sie der Oeffentlichkeit zu übergeben.

Um eine möglichst gleichmässige Infection zu erzielen, wurden als Splitter die Zinken von kleinen Holz- oder Hornkämmen verwendet. Um die Sporen von anhaftendem Gifte zu befreien, wurde die Cultur nach den Angaben Knorr's nach Zusatz von 10 $\frac{0}{0}$ Kochsalz eine Stunde lang auf 65 $^{\circ}$ erhitzt. Die Kämmen wurden danach in die Sporenaufschwemmung getaucht, und nach dem Trocknen die Zinken abgebrochen und mit einer Schicht Collodium überzogen. In dieser Weise erhielten wir Sporensplitter von sehr gleichmässiger Grösse, welche ziemlich gleichmässig verlaufende Erkrankungen hervorriefen. Die Meerschweinchen und Mäuse zeigten deutliche tetanische Erscheinungen, meist noch vor Ablauf von 48 Stunden, nachdem ihnen der Splitter unter die Haut des Oberschenkels eines Hinterbeines geschoben war, und sie erlagen

¹⁾ Diese Beobachtungen entsprechen der schon vielfach auch mit den Producten anderer Bacterienarten gemachten Erfahrung, wonach zur Neutralisation des Giftes weniger Antitoxin gebraucht wird, wenn die Mischung im Glase, als wenn sie im Thierkörper geschieht.

dem Tetanus gewöhnlich zwischen dem dritten und sechsten Tage. Mit dem Leben kam keines der sehr zahlreichen Controllthiere davon, die Infection war also eine durchaus sichere.

Sechs Meerschweinchen von 300—340 g erhielten nach dem Auftreten deutlicher tetanischer Erscheinungen eine intraperitoneale Einspritzung von 5 ccm einer 10 %igen Lösung Heilserum, und zwar vier Thiere 45 Stunden, zwei Thiere 53 Stunden nach Einführung des Splitters.

No. 1 bewegt nach 45 Stunden das linke Hinterbein ruderförmig, ein für beginnenden Tetanus charakteristisches Zeichen. Jetzt wird das Serum gegeben. Am dritten Tage ist das Bein halb gestreckt, supinirt und steif; der Tetanus hat also zugenommen. Vom siebenten Tage an beginnen die Krankheitserscheinungen zurückzugehen, das Thier wird gesund.

No. 2. Nach 45 Stunden Bein halb gestreckt. Einspritzung des Serums. Tod am dritten Tage.

No. 3. Wie No. 2.

No. 4. Wie No. 2 und 3, aber Tod erst am fünften Tage.

No. 5 und 6. Nach 53 Stunden rutschen die Thiere mit dem Hinterbeine aus. Einspritzung des Serums. Am nächsten Tage Zunahme des Tetanus: das Bein ist ganz gestreckt. Am sechsten Tage beginnt die Beweglichkeit derselben wiederzukehren, die Thiere werden gesund.

Von diesen sechs tetanischen Meerschweinchen ist also die Hälfte geheilt worden. Allerdings waren das die am leichtesten Erkrankten, aber bei ihnen war doch schon so viel Gift vom Nervensystem gebunden, dass nachträglich noch eine Streckung des Beines auftrat, und das bedeutet eine so schwere Erkrankung bei Meerschweinchen, wie sie sonst nach meinen Erfahrungen immer mit dem Tode endet.

In derselben Weise verliefen Versuche, welche an einer Anzahl weisser Mäuse von 20—22 g Gewicht angestellt wurden. Wenn das Serum, von dem hier nur 0,5 ccm der zehnpromcentigen Lösung subcutan gegeben wurden, zu einer Zeit zur Anwendung kam, wo erst leichte Vergiftungserscheinungen aufgetreten waren, wenn also das betreffende Bein ruderförmig bewegt wurde und der Schwanz erst anfang sich quer zu stellen, so hatte das Serum Erfolg. Wenn auch die tetanischen Erscheinungen in den nächsten Tagen zunahmen, so gingen sie doch bald wieder zurück. War dagegen die anfängliche Erkrankung zur Zeit der Serumeinspritzung eine schwerere, wurde das Bein krampfartig bewegt und stand der Schwanz quer, so blieb die Heilung aus.

Diese Resultate stehen in Einklang mit den günstigen Erfahrungen, welche man neuerdings bei der Behandlung tetanuskranker Pferde gewonnen hat; ja es scheinen beim Pferde die Aussichten auf Heilung noch viel günstiger zu liegen als bei unseren kleinen Laboratoriumsthieren.

C. Tetanusvergiftung ohne Tetanus.

Im Laufe meiner Untersuchungen, von denen ich hier einen Theil besprochen habe, fiel mir eine Erscheinung auf, die, soweit mir bekannt, bisher nicht beachtet wurde.

Wenn man Kaninchen eine geringe Menge reines Gift oder ein nicht genau neutralisirtes Gift-Heilserumgemenge intravenös einspritzt, so kommt es vor, dass die Thiere stark abmagern, ohne dass sich bei ihnen eine Spur von Tetanus zeigt. Bei anderen treten geringe tetanische Erscheinungen, z. B. leichte Nackenstarre, intercurrent auf. Selten erholen sich solche Thiere wieder, meist gehen sie unter starker Abmagerung zugrunde.¹⁾ Wer dieses Krankheitsbild, gewissermaassen einen Tetanus sine Tetano, zum ersten Male sieht, wird nie darauf verfallen, dass es durch Tetanusgift veranlasst sein könnte. Diese Erscheinung schliesst sich dem an, was man bei einer Reihe anderer Bacteriengifte, z. B. Pyocyaneus und Diphtherie, beobachtet hat; es handelt sich um eine auf parenchymatösen Veränderungen beruhende Kachexie.

Da das Tetanusgift bei anderen Thieren, Meerschweinchen und Mäusen, soweit die bisherigen sehr zahlreichen Erfahrungen reichen, derartige Erscheinungen nicht hervorruft, werden wir annehmen müssen, dass sich der Kaninchenorganismus von demjenigen dieser tetanusempfindlichen Thiere dadurch unterscheidet, dass die in den Körpergeweben vorhandenen, das Tetanusgift bindenden Atomgruppen beim Kaninchen eine weite Verbreitung im Körper haben, während sie bei jenen ausschliesslich oder fast ausschliesslich im Centralnervensystem localisirt sind. Injicirt man daher einem Kaninchen Tetanusgift, so wird dieses von allen Seiten her in Anspruch genommen und daher dem Blute in so starkem Maasse entzogen, dass sehr bald nur noch

geringe Reste davon übrig bleiben. Das erklärt auch die zuerst so überraschend erscheinenden Mittheilungen Knorr's und Behring's über die Vertheilung des Tetanusgiftes im Thierkörper; denn während Knorr gefunden hatte, dass das Gift ausserordentlich schnell aus dem Blute der Kaninchen verschwindet, zeigte Behring unter Bestätigung dieser Thatsache und im Gegensatze dazu, dass bei Meerschweinchen und Mäusen unverhältnissmässig grosse Mengen davon sich im Blute vorfinden.

Untersuchungen über die hier angenommenen parenchymatösen Veränderungen werden uns hoffentlich bald eine nähere Einsicht in diese Vorgänge gewähren.

¹⁾ Dass solche kachectischen Thiere Stallinfectionen ganz besonders zugänglich sind, dürfte nicht überraschen. Die obigen Besprechungen beziehen sich aber auf Thiere, bei welchen Stallinfectionen nicht hinzutreten waren.