

Die Reinigung und Konzentration des Tetanustoxoids.

Von

F. Modern, G. Ruff und A. Gatti.

Instituto Bacteriológico Malbrán, Buenos Aires.

(Eingelangt am 15. Juli 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 13. Okt. 1949.)

In einer früheren Arbeit¹ über Tetanustoxin untersuchten wir dessen antigene Wirkung, den isoelektrischen Punkt, die Verhältnisse bei der Dialyse und die optimalsten Bedingungen bei der Toxoidbildung bezüglich Formaldehydmenge und Inkubationszeit.

Außerdem versuchten wir mit gutem Erfolg die Adsorption des Toxoids an Aluminiumhydroxyd γ , dessen chemische Konstitution *Pauli* und *Adolf*² zuerst untersucht hatten.

Wir konnten damals feststellen, daß das Toxoid als Vaccine beim Menschen Immunität ergibt und wir verglichen die Wirkung einer Dosis des aktivierten Impfstoffes mit der doppelten Dosis des üblichen Toxoids, wobei sich das erste als wirksamer erwies.

Wegen seiner hohen antigenen Wirkung und seiner Unschädlichkeit war das mit Säure und durch Adsorption an Aluminiumgel gereinigte Toxoid ein ausgezeichneter Impfstoff für humanmedizinische Verwendung. Trotzdem war die Gewinnungstechnik des Impfstoffes umständlich und schwierig und die Verluste erreichten ohne eine der Säuerung vorhergehenden Dialyse vielfach eine Höhe von 70% und mehr. Deshalb ist das Vaccine für den menschlichen Gebrauch bisher nicht systematisch hergestellt worden.

Zur Fortsetzung dieser Versuche begannen wir die Suche nach einem praktischen Verfahren, das uns gestattete, ohne größere Verluste ein reines, konzentriertes Toxoid zu erhalten, das frei von anaphylaktisch wirkenden Stoffen zur Herstellung des Impfstoffes dienen könnte. Wir begannen mit dem Verfahren von *Pillemer*, *Grosberg* und *Wittler*³, die

¹ A. Sordelli, F. Modern und J. Ferrari, Rev. Inst. Bacter. 7, 622 (1936).

² Wo. Pauli und M. Adolf, Kolloid-Z. 29, 281 (1921).

³ L. Pillemer, D. B. Grosberg und R. Wittler, J. Immunol. 54, 213 (1946).

das Tetanustoxoid bei gestimmten pH und tiefer Temperatur mit Methanol reinigten. Sie erhielten es wasserfrei durch Lyophilisieren des gefrorenen Toxoids. Dieses Verfahren gibt ausgezeichnete Werte, wie später gezeigt wird, ist aber wegen der erforderlichen Hilfsmittel und des hohen Methanolpreises in unserem Lande schwer durchführbar. Unter den gegebenen Verhältnissen könnten wir das Verfahren wegen des großen Bedarfes an Impfstoff, vor allem seitens der Militärmedizin, nicht anwenden.

*Pillemer*⁴ untersucht in einer anderen Arbeit den optimalen Fällungspunkt des Toxoids in einer Mischung von Methanol-Wasser und bei festgelegten pH- und Temperaturwerten. *H. Müller* und *P. Miller*⁵ benutzten einen Stamm von *Cl. tetani*, welcher sich in Gegenwart verhältnismäßig großer Eisenmengen durch besonders hohe Toxinproduktion auszeichnet. Sie verwenden eine ähnliche Nährlösung, wie unser Institut: ein Autolysat von Schweinemägen.

*E. Taylor*⁶ erhält mit einer ähnlichen Nährlösung ein gutes Toxin, das nach Umwandlung in das Toxoid befriedigende Ergebnisse bei der Impfung des Menschen lieferte. — Mittels digeriertem Kasein gelang *Pickett, Hoeprich* und *Germain*⁷ die Herstellung eines hochwirksamen, leicht zu reinigenden Toxins. — *Eaton* und *Gronau*⁸ reinigten das Toxin mittels Fällung mit Cadmiumchlorid und Elution mit Natriumphosphat bei pH 7,8.

Versuche.

Bei Beginn der Arbeit konzentrierten wir das Tetanustoxin im Vakuum nach der Methode, die wir zur Konzentration des Diphtherietoxins anwenden⁹. Es wurde im Vakuum auf ein Zehntel eingeeengt, dann dialysiert und untersucht. Dabei zeigte es sich, daß das Toxin den größten Teil seiner ursprünglichen Wirkung verlor. Dagegen kann man das Tetanustoxoid in dieser Form konzentrieren, ohne daß sein Ausgangstiter verschlechtert wird. Aber von diesem so konzentrierten Toxoid fällt — auch nach Dialyse — nur ein Teil des wirksamen Anteils aus, wenn man Schwefel- oder Essigsäure verwendet. Auch die Fällung mittels Ammonsulfat versuchten wir mit schlechtem Erfolg. Ebensowenig fallen Methyl- und Äthylalkohol (in der Kälte) aus den 10fach konzentrierten Toxoiden den wirksamen Anteil aus. Das ursprüngliche Toxoid konnte ohne Konzentration mittels saurer Fällung auch nicht gereinigt werden, weil der Verlust noch größer ist.

Die Technik von *Pillemer* — mit Methanol — verursacht bei unserem Toxoid nach Konzentration im Vakuum große Verluste, wie die Tabelle 1 zeigt.

⁴ *L. Pillemer*, *J. Immunol.* **53**, 377 (1946).

⁵ *J. H. Müller* und *P. A. Miller*, *J. Immunol.* **50**, 377 (1945).

⁶ *E. Taylor*, *J. Immunol.* **50**, 385 (1945).

⁷ *J. Pickett*, *P. D. Hoeprich* und *R. O. Germain*, *J. Bacter.* **49**, 515 (1945).

⁸ *Eaton* und *Gronau*, *J. Bacter.* **46**, 423 (1945).

⁹ *F. Modern*, *G. Ruff* und *A. Gatti*, *An. Asoc. quim. argent.* **35**, 178 (1947).

Tabelle 1. Fällung des Toxoids 504,
10fach im Vakuum konzentriert.

pH	Stickstoff mg/ml	D. T./ml	Verlust Prozent
4,9	0,101	165	67
4,5	0,126	100	80
4,0	0,196	165	67
3,7	0,353	100	80
3,4	0,448	100	80
Toxoid 504,	30,9	500	—

Nur beim ursprünglichen Toxoid erhielten wir bei Fällung mit 40%igem Methylalkohol bei pH 4 bis 5 den Ausgangswert, wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 2. Fällung des Toxoids 504 mit Methylalkohol.

pH	N mg/ml	D. T./ml	Verlust Prozent	γ N/D. T.	Reinigungs- faktor (Wirksamkeit)
4,9	0,028	50	0	0,56	123
4,5	0,063	50	0	1,26	55
4,0	0,087	50	0	1,75	39
3,7	0,119	33	34	3,60	19
3,4	0,115	25	50	4,60	15
3,1	0,084	20	60	4,20	16
Toxoid 504 ..	3,45	50	—	69,0	—

Die beste Reinigung erfolgt bei pH 4,9; sie ergibt einen Reinigungsfaktor von 123, wie Tabelle 2 zeigt. Je mehr man ansäuert, um so schlechter wird die Reinigung. In dem untersuchten Medium ergibt die Methode *Pillemer* bei einem Gehalt des Ausgangstoxoids von 15 D. T. des Toxoids (Dosis Test: stammt von einer Dosis des Toxins, die in Gegenwirkung zu 0,1 amerikanischen Antitoxineinheiten bei intramuskulärer Injektion ein Meer-schweinchen nach 45 Stdn. durch Tetanus tötet) pro Milligramm Stickstoff 1800 D. T., das heißt eine Reinigungswirkung von 123.

Fällt man das ursprüngliche Toxoid bei Zimmertemperatur mit Methyl- oder Äthylalkohol und bei einem pH von 4,75, so sind die Verluste noch größer. Dieser Verlust sinkt bei 0° auf 10 bis 20% und wird Null, wenn man unter 0° arbeitet.

Auch die Fällung des ursprünglichen konzentrierten Toxoids bei bestimmten pH-Werten mit Aceton in der Kälte ergab nur einen mäßigen Erfolg. Da uns die Ursache der schlechten Wiedergewinnung des konzentrierten Toxoids interessierte, dialysierten wir es. Auch dann war die Wiedergewinnung schlecht, so daß der Grund dafür in kolloiden Substanzen und nicht in Salzen zu suchen ist, die durch die Dialyse entfernt worden wären.

Wemgleich die Ergebnisse zur Fällung des ursprünglichen Toxoids mit Methanol nach *Pillemer* in Anbetracht einer Reinigungswirkung von 123 gut waren, machten sie die oben angeführten Gründe für unser Milieu ungeeignet. Andererseits erhält man mit diesem und der früher beschriebenen

Methode keine größere Reinigung. Unter den günstigsten Verhältnissen erhielten wir 0,55 γ N/D. T.

Auf Anregung von Dr. *Savino* begannen wir die Konzentration und Reinigung mit Äthylalkohol und erhielten mit zwei aufeinanderfolgenden Fällungen eine 200fache Reinigungswirkung gegenüber dem ursprünglichen Toxoid bei einem N-Gehalt je Dosis Test, der geringer als nach der früheren Methode war.

Im folgenden beschreiben wir das im Institut angewendete Verfahren sowie andere Versuche, die uns ausgezeichnete Ergebnisse geliefert haben, sowohl was den endgültigen Reinheitsgrad als auch die Ausbeute betrifft. Bei den letzteren, die der jetzt praktisch angewendeten Verarbeitung entsprechen, haben wir keine Verluste. Man benötigt dazu nur Äthylalkohol und eine entsprechende Abkühlung.

Herstellung des Nährbodens. Dazu wird Pepton *Martin* verwendet, das aus angesäuertem und digeriertem Schweinemagen erhalten wird; dabei folgen wir im allgemeinen der Vorschrift des Autors dieser Methode. Von diesem Pepton wird nur die überstehende Flüssigkeit verwendet. — Gesondert wird Fleischbrühe (agua de carne) bereitet. Zu einem Kilogramm reinem gehacktem Kalbfleisch werden 2 Liter destilliertes Wasser gegeben, man kocht 30 Min. und filtriert durch ein Papierfilter. Gleiche Mengen der Fleischbrühe und des Peptons *Martin* werden vermischt, auf ein pH von 7,2 (mit 20%igem Natriumhydroxyd) gebracht und 3 Min. lang gekocht. Dazu kommt 1% Glykose, darnach wird filtriert und in gleiche Portionen geteilt, die 2mal bei 100° C sterilisiert werden. Die Bouillon wird mit *Clostridium tetani* beimpft und nach der Inkubationszeit die gebildete Toxinmenge bestimmt.

Entgiftung durch Formaldehyd. Das Toxoid wird durch Formaldehydzusatz bereitet. Bis 1934 wurde 1,5% Formalin und 20 Tage Inkubationszeit bei 37° C eingehalten. Aber in Verfolg der Versuche, die der eine von uns (*Sordelli, Modern und Ferrari*, l. c., veröffentlicht auch in der Revista des Institutes vom Jahre 1936) durchgeführt hatte, wurde später 6% Formaldehyd bei pH 7 und nur 5 Tagen Inkubationszeit bei 37° C angewendet. So wurde die vollkommene Entgiftung des Tetanustoxins erreicht; die bei der Immunisierung von Pferden erhaltenen Sera hatten einen wesentlich höheren antitoxischen Wert.

Reinigung der Toxoiden und ihre Konzentration. Es werden Mengen konzentriert, die 22,4 Litern des ursprünglichen Toxoids entsprechen. Das Toxoid wird auf pH 4,7 bis 4,8 mit 5 n H₂SO₄ gebracht. Man stellt die Flaschen in ein Kühlbad bei — 14° C. Nach 1 Std., wenn das Toxoid teilweise gefroren ist, werden 16 Liter Äthylalkohol von 96% bei — 10° C unter fortwährendem Rühren zugesetzt. Man läßt bis zum folgenden Tag im Kühlbad und filtriert dann durch ein Faltenfilter in einem Kühlraum. Der Niederschlag löst sich quantitativ in Natriumhydroxyd auf und beträgt 2240 ml bei pH 7,0 bis 7,2. Man fällt daraufhin wiederum mit 40% Äthylalkohol bei pH 4,7 bis 4,8 unter Kühlung wie bei der ersten Fällung. Man läßt im Kühlbad bei — 14° C über Nacht und filtriert in einem Kühlraum. Der Niederschlag wird bei pH 7,0 bis 7,2 gelöst, filtriert und mit 1/5000 Merthiolat (Quecksilberthiosalicylat von Natriumäthylat) als Konservierungsmittel versetzt. Wenn das Toxoid einmal analysiert ist, wird es durch ein *Seitz*-Filter filtriert und Aluminiumhydroxydsuspension in der nachfolgend beschriebenen Weise zugesetzt.

Herstellung und Filtration des Vaccins (Impfstoffes). Die Vaccine enthält 60 D. T./ccm und entsprechende Mengen Gel. Wir verwenden als Konservierungsmittel Merthiolat in einer Konzentration von 1/5000. Die Verdünnung des Toxoids erfolgt mit steriler Natriumchloridlösung (5⁰/₁₀₀). Das verdünnte Toxoid soll pH 5,5 haben; eine leichte Fluoreszenz tritt auf und entspricht dem Maximum der Absorption durch das betreffende Gel. Man fügt die nötige Säuremenge zur Erreichung dieses pH zu, nachdem man durch ein *Seitz*-Filter filtriert hat. Z. B. sollten 15,8 Liter (60 D. T./ccm)¹⁰ 820 ccm Gel (10 mg Aluminiumhydroxyd/ccm) enthalten. Dieses Gel wird nach der von uns in den Arbeiten über Diphtherietoxin beschriebenen Methode (l. c.) hergestellt. Nach Abfüllung der Vaccine werden die Sterilität, die Unschädlichkeit und die Wirksamkeit geprüft.

Aktivitätsbestimmung des Toxoids. Zur Aktivitätsbestimmung des Toxoids verwenden wir folgende Verfahren: 1. Steigerung der antitoxischen Wirkung des Serums von Meerschweinchen, die mit dem Toxoid geimpft wurden. 2. Neutralisation des Antitoxins durch das Toxoid („in vivo“). 3. Schutz der Meerschweinchen, die mit der Vaccine geimpft wurden, wenn sie nach einiger Zeit mit 1 D. T. des Tetanustoxins geimpft werden (subkutan).

Das erste Verfahren besteht in der Injektion von mindestens 4 Meerschweinchen mit einer Dosis des Toxoids zusammen mit der entsprechenden Menge Al(OH₃)-Gel und folgende Bestimmung des antitoxischen Wertes im Serum der Meerschweinchen (500 g jedes) nach 6 Wochen. Sie sollten im Durchschnitt eine antitoxische (amerikanische) Einheit ergeben.

Das zweite Verfahren, das laufend im Institut angewendet wird, besteht darin, wechselnde Mengen des Toxoids in Anwesenheit von 0,1 amerikanischer Einheit Antitetanusserums zu sammeln und mit physiologischer (Kochsalz)-lösung auf gleiche Volumina zu bringen. Nach einer halben Stunde gibt man jedem Röhrchen eine halbe Dosis Testmenge des Tetanustoxins zu. Man läßt eine weitere halbe Stunde stehen und injiziert dann die Meerschweinchen intramuskulär. Man nimmt als Wert jenes Meerschweinchen, das am 4. Tage an Tetanus stirbt. Obwohl dieses Verfahren laufend angewendet wird, geben wir ein Beispiel unserer Berechnungsart der Testdosis (D. T.) unserer Toxide in dieser Arbeit, so daß die Bedingungen genau klar gestellt werden. Wenn das Meerschweinchen mit 0,1 ccm eines 1/10 verdünnten Toxoids stirbt, ist die doppelte Menge (halbe Testdosis) 0,2 der 1/10 verdünnten Lösung. Das heißt, daß in 0,02 ccm des Toxoids eine Testdosis ist, die einem Wert von 50 Dosen/ccm entspricht. Diese Methode gibt ausgezeichnete Ergebnisse und wir bevorzugen sie solange, bis wir alle Toxide durch Flockung messen, was schon auf dem Wege der Verwirklichung ist.

Das dritte Verfahren wurde angewendet, um die Schutzwirkung des abgefüllten Vaccins kennenzulernen. Wir verwenden 10 Meerschweinchen von 500 g, denen wir eine Dosis Vaccine injizieren. Nach 6 Wochen wird 1 D. T. Toxin injiziert, wobei alle Meerschweinchen am Leben bleiben müssen. Sogar bei Injektion von 2 D. T. überlebten bei subkutaner Injektion alle Tiere. Die Kontrolltiere ohne Vaccine mit 0,1 D. T. müssen vor 48 Stdn. sterben. Nach dem „Dispensatory“ braucht man nur 10 d. m. m. Toxin injizieren und betrachtet es als gutes Vaccine, wenn 80% der Tiere überleben. Man verwendet also nur 10 d. m. m. Toxin im Gegensatz zu uns, die mit 1 und 2 D. T. einen 100%igen Schutz erreichen.

¹⁰ Spätere Versuche werden die für die menschliche Impfung zuträgliche Dosis angeben.

Die Unschädlichkeitsversuche wurden mit 5 ccm Toxoid bei jedem Meerschweinchen durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens 4 Meerschweinchen verwendet, deren Gewicht während 4 Wochen kontrolliert wurde. Diese Versuche wurden mit dem Toxoid vor der Konzentration und mit dem fertigen Vaccine gemacht.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt, wodurch auch der erreichte Reinheitsgrad errechnet werden konnte. — Die pH-Bestimmungen wurden mit Glaselektroden potentiometrisch durchgeführt.

Reinigung der Toxoide. Wir begannen die Versuche mit Toxin 512 nach der anderwärts beschriebenen Technik. Dabei stieg aber die Temperatur während der Nacht wegen einer Störung des Kühlschranks und war die Reinigung trotz guter Abscheidung des Toxoids schlechter. Nach der Fällung mit Alkohol enthielt das Toxoid 0,72 mg N/ccm. Da ursprünglich 3,33 mg N/ccm enthalten waren, betrug der Reinigungsfaktor 46. Mit einer zweiten Alkoholfällung ebenfalls bei niedriger Temperatur erreichte man 0,39 mg N/ccm, so daß die gesamte Reinigungswirkung mit diesem Toxoid das 86fache erreichte.

Tabelle 3. Wiederfällung des gereinigten und mit Alkohol konzentrierten Toxoids.

Stoff	mg N/ccm	D. T. /ccm	γ N/D. T.	Verlust	Reinigungswirkung, bezogen auf die alkoholische Fällung	Insgesamt
Ursprüngliches Toxoid ..	3,508	50	70,1	—	—	—
Erste Fällung mit Äthanol	0,435	500	0,87	0	—	80
Erste Fällung mit Äthanol und Fällung mit H ₂ SO ₄	0,056	250	0,224	50	3,8	312
Erste Fällung mit Äthanol und Fällung mit Essigsäure	0,070	200	0,35	60	2,5	200
Zweite alkoholische Fällung	0,119	450	0,264	10	3,3	269
Zweite alkoholische Fällung und Fällung mit H ₂ SO ₄	0,063	200	0,315	60	0,84	222
Zweite alkoholische Fällung mit Essigsäure...	0,056	200	0,28	60	0,94	250

Bei einem anderen Versuch, ausgehend von 11,2 Liter Toxoid (509), wurde bei genauer Einhaltung der Temperatur schon bei der ersten Alkoholfällung eine 80fache Reinigung erzielt. — Das ursprüngliche Toxoid enthielt 50 D. T./ccm. — Durch eine zweite Fällung mit Äthylalkohol erreicht man eine Reinigung auf das 269fache mit nur 10% Verlust, bezogen auf den Ausgangswert. Das nur einmal mit Äthylalkohol gereinigte Toxoid wurde bei einer folgenden Fällung mit Methylalkohol auf einen N-Wert von 0,168 mg N/ccm gebracht, das heißt eine Reinigung auf das 209fache. Die Verwendung der beiden Alkohole zusammen ist also nicht besser. Bei einer

einzigsten Fällung mit Methylalkohol wurde das ursprüngliche Toxoid auf das 66fache gereinigt. Unsere mit einem bestimmten Nährboden erhaltenen Toxoiden lassen sich also besser mit Äthyl- als mit Methylalkohol reinigen. In der Tabelle 3 stellen wir die Versuchsergebnisse mit zwei Äthylalkoholkonzentrationen und andere Kombinationen mit Säuren zusammen.

Wenn wir das mit Äthylalkohol gereinigte Toxoid ein zweites Mal reinigen, indem wir es mit H_2SO_4 auf den isoelektrischen Punkt bringen, erreichen wir eine Reinigung auf das 312fache mit einem Verlust von 50% des Ausgangswertes; die Reinigung ist die beste, der Verlust aber verhältnismäßig hoch. — Mit Essigsäure wird die Reinigung nicht besser. Man erreicht das 200fache bei 60% Verlust. Mit diesen Säuren wird die Reinigung auch nicht besser, wenn man vom gereinigten Toxoid ausgeht (mit 2 Konzentrationen mit Äthylalkohol). Man erhält Werte, die denen der H_2SO_4 (222fach) sehr naheliegen, nämlich das 250fache mit Essigsäure (Tabelle 3).

Mit 2 Äthylalkoholfällungen erhalten wir ein Toxoid, das 0,26 γ N/D. T. enthält, mit H_2SO_4 eine etwas bessere Reinigung (0,22 γ /D. T.), aber 50% Verlust. Geht man von der zweiten Konzentration mit Alkohol aus, so kann man auch nicht das Reinigungsverhältnis durch Säuren verbessern (N/D. T.). Gegenwärtig versuchen wir den Verlust durch die Säurefällung zu verringern.

Wir haben weiter die Reinigung in größerem Maßstab versucht, wobei wir das Verfahren der Konzentration des Toxoids durch 2 Alkoholfällungen anwendeten. Unter guten Bedingungen erlaubt dies bei genauer Temperatureinhaltung eine Reinigung auf das 200fache bei weniger als 10% Verlust. Natürlich muß man dazu von einem guten Toxoid ausgehen, das wenigstens 50 D. T. je ccm enthält. — Das so erhaltene gereinigte Toxoid wird schon zur Herstellung von Antitetanustoxin mit Erfolg verwendet; jede Operation wird mit 22,4 Litern des ursprünglichen Toxoids durchgeführt, und ergibt etwa 15000 Dosen aktivierten Vaccins mit Aluminiumgel (Vaccin im Versuchsstadium, en ensayo).

In Tabelle 4 geben wir die Werte, die wir bei verschiedenen Konzentrationen mit 2 Alkoholfällungen erhielten, und die Reinigungswerte. Nur in einem Falle waren die Ergebnisse mäßig, als ein ein Jahr altes Toxoid mit weniger als 25 D. T./ccm verwendet wurde. — Wie man in der Tabelle 4 sieht, erreicht die endgültige Reinigung nach der zweiten Alkoholfällung fast stets das 200fache. Nur ein schon gealtertes Toxoid, das sicher schon teilweise seinen Wert verloren hatte, ergab einen Reinigungswert von 177fach und einen N-Gehalt von 0,90 γ pro D. T. Die guten Toxoiden enthalten nach der ersten Alkoholfällung 0,60 bis 0,70 γ N/D. T. — Nach der zweiten Äthylalkoholfällung erreichen sie einen Wert, der zwischen 0,25 und 0,33 γ N/D. T. schwankt.

Die Tetanustoxoide enthalten ursprünglich etwa 65 γ N/D. T. Meist erreicht die Reinigung den 200fachen Wert. Bei allen diesen systematisch durchgeführten Konzentrationen traten keine Verluste auf. Das Toxoid mit einem niederen Ausgangswert, das 160 γ N/D. T. enthielt, ergab bei der zweiten Alkoholfällung 0,90 γ N. Eine dritte Fällung ergab 0,65 γ N/D. T. Sie enthielt 415 D. T./ccm und die Flockungsanalyse ergab 41,7 Lf (proj)ccm. In diesem Falle ergaben 2 Liter der zweiten Fällung nur 1 Liter bei der dritten.

Dies zeigt, daß man immer von guten Toxoiden ausgehen muß, um endlich ein Toxoidkonzentrat zu erhalten, das etwa 0,3 γ N/D. T. enthält. Auch eine dritte Alkoholfällung ergibt bei einem Toxoid mit niederen Ausgangswert keine besseren Ergebnisse, als jene der zweifachen Fällung von Toxoiden mit 50 D. T./ccm.

Tabelle 4. Zweifache Reinigung mit Äthylalkohol.

Toxoid	mg N/ccm	D. T. /ccm	γ N/D. T.	Reinigungs- wert (Faktor)	Verlust
515 ursprünglich	2,83	50	56,5	—	—
Erste Alkoholreinigung	0,294	500	0,59	95	0
Zweite Alkoholreinigung	0,124	500	0,25	226	0
518 ursprünglich	3,29	50	65,8	—	—
Erste Alkoholfällung	0,38	500	0,76	86	0
Zweite Alkoholfällung	0,164	500	0,328	200	0
Altes Toxoid (mehr als 1 Jahr)	3,36	21	160	—	—
Erste Alkoholreinigung	0,65	208	3,1	51	0
Zweite Alkoholreinigung	0,19	208	0,9	177	0
Dritte Alkoholreinigung	0,27	415	0,65	246	0
519 ursprünglich	3,31	50	67	—	—
Erste Alkoholreinigung	0,325	500	0,65	103	0
Zweite Alkoholreinigung	0,168	600 ¹¹	0,28	239	0
520 ursprünglich	3,39	50	67,7	—	—
Erste Alkoholreinigung	0,357	450	0,79	85	10
Zweite Alkoholreinigung	0,164	450	0,36	188	10

Wenn auch im letzten Falle ein Reinigungsfaktor von 246 erreicht wurde, war doch der N-Gehalt 0,65 γ N/D. T. Bei guten Toxoiden ist der N-Gehalt bei einer Reinigung von 200fach nicht größer als 0,30 bis 0,35 γ /D. T.

Das mit diesen Toxoiden hergestellte Vaccine ergibt mit Aluminiumgel zusammen ausgezeichnete Ergebnisse bei Meerschweinchen. Mit 30 D. T. erhielten wir im Serum der Meerschweinchen innerhalb von 6 Wochen 0,5 amerikanische Einheiten. Mit 60 D. T. und 120 D. T. schwankt dieser Wert zwischen 0,5 und 1 amerikanische Einheit. Die mit 30 bis 60 D. T. und 120 D. T. geimpften Meerschweinchen besitzen eine gute Immunität, da sie der Injektion von 2 D. T. Tetanustoxin widerstehen, ohne Tetanus-symptome zu zeigen. Die Kontrolltiere ohne Vaccine starben innerhalb von 48 Std. nach (subkutaner) Injektion von 0,1 D. T. des Toxins.

Zusammenfassung.

Es wurde die Konzentrierung des Tetanustoxoids im Vakuum untersucht und gezeigt, daß es dabei seinen ursprünglichen Wert behält. Das so erhaltene und dialysierte konzentrierte Toxoid fällt aber wegen der darin enthaltenen kolloiden Stoffe weder mit Säuren noch mit den untersuchten Alkoholen aus. — Auch eine Reinigung des ursprünglichen Toxoids durch Säure-Fällung ohne Konzentrierung ist infolge der hohen Verluste (70% des Ausgangswertes) nicht durchführbar. Wenn man das ursprüngliche Toxoid vorher nur dialysiert, verringert sich der Verlust auf 50% des Ausgangswertes.

Das Verfahren von *Pillemer* mit Methanol gab bei unseren, im Vakuum konzentrierten Toxoiden, hohe Verluste (60 bis 80%).

¹¹ Zwölfmal konzentriert.

Mit dem ursprünglichen Toxoid liefert dieses Verfahren gute Ergebnisse, da ein Reinheitsgrad von 123 erreicht wird. Trotzdem ist es für den von uns angewendeten Nährboden nicht anwendbar. Wir konnten mit einem anderen Verfahren eine bessere Reinigung erzielen, indem wir zweimal nacheinander mit Äthylalkohol fällten oder auch unter bestimmten Bedingungen eine Alkohol- und eine Säurefällung kombinierten. Es wird auch der Nährboden beschrieben sowie die Entgiftung mit Formaldehyd, die Reinigung des Toxoids und die Herstellung des Vaccins. Auch werden die Verfahren zur Aktivitätsbestimmung des Toxoids angegeben.

Wenn das mit Äthylalkohol gereinigte Toxoid ein zweites Mal bei Einstellung des pH mit H_2SO_4 auf den isoelektrischen Punkt gereinigt wird, erhielten wir einen Reinigungswert von 312 (Tabelle 3) bei einem Verlust von 50% des ursprünglichen. Auch die Verwendung einer organischen Säure zur Fällung verringert diesen Verlust nicht.

Abschließend geben wir die Resultate der Konzentrierung und Reinigung des Toxoids durch zweifache Fällung mit Äthylalkohol bei niedriger Temperatur.

Auf diese Weise konzentrieren wir die Toxoide ohne Wertverlust und mit einem Reinigungsfaktor, der in den meisten Fällen 200 übersteigt. Das Toxoid ist gut zur Herstellung von Vaccine geeignet.