ARBEITEN
AUS DEM STAATLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE UND DEM FORSCHUNGSINSTITUT FÜR CHEMOTHERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

DR. **RICHARD OTTO**
GEH. MED.-RAT
DIREKTOR DES STAATLICHEN INSTITUTS FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE
UND DES FORSCHUNGSINSTITUTS FÜR CHEMOTHERAPIE ZU FRANKFURT A. M.
HONORARPROFESSOR AN DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT

Heft 40

1. Otto, R. und Wohlrab, R. Ueber neuere Impfstoffe gegen Flecktyphus. Mit 4 Abbildungen im Text und 1 Tafel. (S. 1—14.)
2. Wohlrab, R. Experimentelle Chemotherapie des Fleckfiebers. Mit 6 Kurven im Text. (S. 15—37.)
3. Kudicke, R. und Steuer, W. Die Verwendung getrockneter Blutstropfen für Zwecke der klinischen Probeagglutination. (S. 38—49.)
4. Albrecht, B., Zur Frage der Pathogenität und Infektiosität von Kulturspirochäten des Pallida-Typus. Mit 1 Abbildung im Text. (S. 50—80.)

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1940

Alle Rechte vorbehalten
Printed in Germany

Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie und dem Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto).

I.

Über neuere Impfstoffe gegen Flecktyphus.

(Rickettsien-Impfstoffe aus dem Dottersack bebrüteter Hühnerembryonen.)

Von

R. Otto und R. Wohlrab.

Mit 4 Abbildungen im Text und 1 Tafel.

Unsere Versuche, brauchbare Fleckfieberimpfstoffe zu gewinnen, waren auf der Erkenntnis begründet, daß bei der Fleckfieberbekämpfung, besonders in Europa, die Schutzimpfung mit abgetöteten Erregern die gegebene Methode ist [vgl. R. Otto u. R. Wohlrab (1)], wie dies auch Weigl (2) betont hat. Ebenso hat Zinsser (3) mit Nachdruck bereits auf diesen Punkt hingewiesen. Zur Herstellung solcher Impfstoffe müssen genügende Mengen von Rickettsien gewonnen werden. Dies geschah bisher meist durch Züchtung in der Laus. Zur Herstellung des Impfstoffes wurde der Darminhalt infizierter Läuse verwandt.

Ein solches Verfahren wurde zuerst von Rocha-Lima versucht, dann aber systematisch im großen Umfange von Weigl und seinen Mitarbeitern ausgebaut. Mit dem Weigl-Impfstoff sind bereits in größerem Umfange erfolgreiche Schutzimpfungen gegen Flecktyphus in Polen, China und Abessinien durchgeführt worden.

Neben der Züchtung der Rickettsien in der Laus, die immerhin nur unter gewissen Voraussetzungen möglich und mit erheblichen technischen Schwierigkeiten verbunden ist, hat man später auch andere Methoden zur Rickettsiengewinnung angewandt, und zwar wurden von uns [vgl. R. Otto (4)] versucht:

I. die Rickettsienzüchtung im Tierkörper (in Mäusen und Ratten),
II. die Rickettsienzüchtung in Gewebezellen in vitro (besonders in der sogenannten Maitlandkultur) und
III. die Methode der Hühnerembryokultur nach Goodpasture bzw. Cox.

Über das Ergebnis mit den nach den ersten beiden Verfahren im hiesigen Institut hergestellten Impfstoffen haben Otto und

Wohlrab (5) vor längerer Zeit berichtet. Sie gewannen dabei die Impfstoffe einmal nach der Technik von Zinsser aus röntgengeschädigten, intraperitoneal infizierten Mäusen und andererseits durch Züchtung in vitro nach der Methode von Nigg und Landsteiner, die von Zinsser und Macchiavello der Züchtung im großen angepaßt worden war. Mit diesen Methoden erhielten wir ein regelmäßiges Wachstum nur beim murinen Fleckfiebervirus. Nähere Angaben über die Herstellung unserer Impfstoffe finden sich in der oben erwähnten Arbeit. Die Prüfung der Immunisierungswirkung der gewonnenen Impfstoffe wurde an Mäusen und Meerschweinchen vorgenommen. Allerdings konnten die Prüfungen in den Versuchen an Meerschweinchen seinerzeit nur an einer geringen Zahl von Tieren durchgeführt werden. Aus den Versuchszusammenstellungen ging aber hervor, daß bei den angewandten Impfstoffmengen und der Immunisierungsart (3malige sk. Applikation in je 5 Tagen Abstand) mit den Mäuseperitonealimpfstoffen eine sehr gute Immunisierungswirkung gegen das homologe murine Virus bei den Mäusen zu erzielen war; sie war auch an Meerschweinchen noch deutlich nachweisbar, wenn sie auch dem Anschein nach nicht in gleichem Ausmaß auftrat. Impfstoffe aus den in Maitlandkulturen gezüchteten Rickettsien (muriner Typ) entwickelten gleichfalls eine genügend sicher nachweisbare Immunität, die auch hier in den Mäuseversuchen überzeugender als bei denen mit Meerschweinchen hervortrat.

Da einerseits bei dem Maitlandverfahren die Gewinnung größerer Mengen der Rickettsia mooseri doch unsicher war, und andererseits die Anpassung der Ri. prowazeki an beide Methoden nicht möglich war, haben wir diese Verfahren aufgegeben und uns zur Gewinnung der Rickettsien der Hühnerembryokultur, und zwar der Dottersackmethode von Cox zugewandt.

Die Methode der Hühnerembryokulturen zur Viruszüchtung, wobei die Chorion-Allantoismembran beimpft wird, haben zuerst Goodpasture, Woodruff und Buddingh angewandt. Sie ist später auch für die Rickettsienzüchtung von Zinsser und Zia, dann von Wenckebach, Bruynoghe und Jadin, Kimura und Miyazawa, sowie (mit gewissen Abänderungen) von Barykin, Kompanetz und Botscharowa benutzt worden. Eine genügende Ausbeute an Rickettsienmaterial, wie es bei Impfstoffen benötigt wird, war indessen mit diesen Methoden nicht erreichbar. Aus diesem Grunde gingen wir zu der Hühnereikultur nach dem Verfahren von Cox über. Cox beimpft den Dottersack des bebrüteten Hühnerembryos (6).

Bei seiner Methode konnte er die verschiedenen Rickettsienarten in Serienpassagen weiterführen, so die des Felsengebirgsfiebers, des endemischen und epidemischen Fleckfiebers, des fièvre boutonneuse, des brasilianischen Fleckfiebers und einer neuen nicht identifizierten Rickettsienart, die aus Amblyomma maculatum isoliert worden war. Er fand die Dottersackaufschwemmung von Felsengebirgsfieber und endemischem Fleckfieber 100—1000mal so infektiös als das Gewebe des sich entwickelnden Hühnerembryos bzw. das der Tunica vaginalis des Meerschweinchens und

annähernd so infektiös wie das Zeckengewebe. Mit Ausnahme des europäischen Fleckfiebervirus wurden bei allen untersuchten Krankheiten Rickettsien leicht und regelmäßig im Dottersack gefunden.

Auch uns gelang eine Vermehrung des murinen Virus (Ri. mooseri) auf diese Weise leicht. Im Gegensatz zu obigen Mitteilungen von Cox ließ sich aber von Wohlrab zeigen, daß sich auch gewisse Rickettsia prowazeki-Stämme in reichlicher Menge im Dottersack vermehren können und nachweisen lassen. Wie wir erst aus einer späteren Arbeit von Cox (7) ersehen, ist ihm gleichfalls die reichliche Vermehrung der Ri. prowazeki im Dottersack gelungen, und zwar mit einer Regelmäßigkeit, wie wir sie nicht beobachten konnten. Auch Cox hat aus derartigem Rickettsienmaterial wirksame Impfstoffe gewonnen. Die verschiedenen, von uns hergestellten Dottersackimpfstoffe sind in den folgenden Ausführungen mit I_1 bis I_8 bezeichnet, wenn es sich um Impfstoffe handelt, die mit der Ri. prowazeki gewonnen wurden. Die mit der Ri. mooseri gewonnenen Impfstoffe tragen die Bezeichnung IIa, IIb, II_{1a} und II_{1b}.

Die Infektion des Dottersacks erfolgte am 5. bis 6. Tag nach der Bebrütung des Eies. In der Regel fanden sich dann bei einer Serie von etwa 20 infizierten Eiern bei 4—6 nach etwa 15—16 Tagen reichliche Rickettsien im Dottersack (vgl. die am Schlusse der Arbeit folgenden photographischen Aufnahmen). Für die Impfstoffgewinnung wurde der bei mikroskopischer Durchmusterung rickettsienreich befundene Dottersack aus der Eischale vorsichtig in physiologische Kochsalzlösung gebracht und nach Zerkleinern mit so viel Formalin versetzt, daß zunächst ein Formalingehalt von 0,5 % entstand. Nach einigen Tagen wurde dann durch Zufügen physiologischer Kochsalzlösung die Konzentration auf etwa 0,25 % Formalin eingestellt. Die ersten Ri. prowazeki-Formalinimpfstoffe I_1 und I_2 und der murine II_{1b} wurden außerdem nach Abfüllung einmal 30 Minuten bei 56° im Wasserbad gehalten, während der Impfstoff II_{1a} überhaupt nicht inaktiviert wurde. Da der Formolzusatz beim Impfen stärkere vorübergehende Schmerzen setzt, die allerdings schon nach 5 Min. völlig nachlassen, wurde später von Formalinzusatz abgesehen und die Impfstoffe von I_3 ab mit 0,5 % Phenolgehalt bereitet. Nur beim Impfstoff I_4 wurde außer 0,4 % Phenol noch 0,1 % Formalin zugesetzt. Eine Wärmeinaktivierung fand bei den Impfstoffen I_3 und I_4 einmal für 60 Minuten bei 56° nach der Abfüllung in Fläschchen statt. Bei dem Impfstoff I_5, I_{6a} und $_b$, I_7 und allen weiteren wurde zweizeitig inaktiviert, das erste Mal vor Abfüllung 60 Minuten bei 56—60° im Wasserbad, das zweite Mal nach Abfüllung und Verschluß der Fläschchen wieder bei 56° im Trockenschrank. Nach Sterilitäts- und Virulenzprüfung erfolgte die Abgabe der Impfstoffe, die alle vorher bereits bei Impfungen im Institut erprobt werden konnten.

Die Sterilitätsprüfung erfolgte durch Verimpfen des frisch bereiteten Impfstoffes nach der ersten Inaktivierung. Dabei wurden die

bei der staatlichen Prüfung der Sera usw. gebräuchlichen bakteriologischen Methoden angewandt. Eine zweite Sterilitätsprüfung nahmen wir nach der Abfüllung des Impfstoffes an Stichproben vor. Die Avirulenzprüfung geschah durch ip. Injektion des frisch bereiteten Impfstoffes bei Meerschweinchen nach der ersten Inaktivierung.

Ob eine weitgehende Reinigung des Impfstoffs von Eigelb und von Eihautgeweben notwendig ist, mag bislang in bezug auf Verträglichkeit und Wirkung des Impfstoffes unnötig erscheinen. Die Verträglichkeit des Phenolimpfstoffs ist sehr gut, bis auf eine mäßige Lokalreaktion blieben Allgemeinerscheinungen bisher aus. Da Eigelb mit sehr geringem Ri.-Gehalt ebenfalls immunisiert und wie aus der Kurve 1 zu ersehen ist, sogar noch besser als das Ri.-reiche entsprechende Dottersackmaterial (was allerdings ein einmaliger, aber sehr beachtlicher Befund sein dürfte), so ist auch von dieser Seite kein Anlaß geboten, weitgehende Reinigungen durchzuführen.

Trotzdem wurde, als die Nachfrage nach Impfstoff geringer wurde, versucht, bei den neueren Impfstoffen möglichst die Zellbestandteile der Eihäute durch Zentrifugieren bei sehr geringer Tourenzahl im Sediment bzw. das Eigelb bei sehr hoher Tourenzahl im Abguß zu entfernen.

Die Reinigung bei geringer Tourenzahl wurde aufgegeben, weil bei der Konsistenz des Materials zu viel Rickettsien mit niedergeschlagen wurden. Beim Ausschleudern des 8000 Tourenabgusses bei 15000 Touren Umdrehung gehen in das Sediment noch Rickettsien über. Aus äußeren Gründen mußten wir es bei der Durchschleuderung mit 8000 Touren bewenden lassen.

Bei den Impfstoffen I_8 und den weiteren Ri. prowazeki-Impfstoffen sowie bei dem Rickettsia mooseri-Impfstoff II_3 verfuhren wir also in folgender Weise bei der Verarbeitung des rickettsienhaltig befundenen Dottersacks:

Der in physiologischer Kochsalzlösung, die 0,5 % Phenol enthält, aufgenommene Dottersack wird 24 Stunden mit Glasperlen in einer Schüttelflasche geschüttelt, durch eine Doppellage Gaze filtriert und dann eine Stunde lang bei 8000 Touren zur Entfernung des Eigelbes zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Sediment erneut mit frischer 0,5 % phenolhaltiger physiologischer Kochsalzlösung versetzt und wieder durchgeschüttelt. Danach wird nochmals 1 Stunde bei 8000 Touren zentrifugiert und der verbleibende Überstand wiederum abgegossen; das Sediment wird dann in 0,5 % phenolhaltiger Kochsalzlösung aufgenommen, und zwar jeweils ein Dottersack in 25 ccm. Nach Auffüllung des Impfstoffes auf die Endkonzentration und nochmaliger Durchschüttelung wird der Impfstoff 1 Stunde bei 56—60° gehalten und dann in Fläschchen abgefüllt, die nochmals 1 Stunde auf 56° erhitzt werden.

Über unsere Erfahrungen mit den ersten aus Dottersäcken gewonnenen Ri. mooseri-Impfstoffen ist kurz an anderer Stelle (R. Otto)

schon berichtet worden. In der Tabelle I sind die Ergebnisse der bisher vorliegenden Meerschweinchenversuche zusammengefaßt. Die Versuchsreihen a und b zeigen die Ergebnisse mit den Ri. mooseri-Impfstoffen auf, und zwar wurde einmal ihre Wirksamkeit gegenüber dem homologen Virus (a) und in einer zweiten Versuchsreihe (b) gegenüber dem heterologen Virus geprüft. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, hatten die immunisierten Tiere eine gute Immunität gegenüber dem homologen Virus (Tab. Ia). Die große Mehrzahl der immunisierten

Übersichtstabelle I.

Ergebnis der Immunisierungsversuche an Meerschweinchen.

Versuchsreihe	Immunisierte Tiere				Kontrolltiere				Bemerkungen
a)	Meerschweinchen mit Rickettsia mooseri immunisiert				nicht immunisierte Meerschweinchen				Infektionen mit Rickettsia mooseri:
	Anzahl der Tiere	+	+/—	—	Anzahl der Tiere	+	+/—	—	
1.	13 (Impfstoff II_1)	5	—	8	15	12	—	3	0,5 ccm 1/500 Meerschweinchengehirn ip.
2.	14 („ IIa)	2	7	5	15	14	—	1	0,5 ccm 1/300 Meerschweinchengehirn ip.
3.	15 („ IIb)	1	7	7					
	42	8	14	20	30	26	—	4	
			34				4		
b)	Meerschweinchen mit Rickettsia mooseri immunisiert				nicht immunisierte Meerschweinchen				Infektionen mit Rickettsia prowazeki:
1.	12 (Impfstoff II_1)	—	—	12	15	11	1	3	0,5 ccm 1/500 Meerschweinchengehirn ip.
2.	14 („ IIa)	5	8	1	20	16	4	—	
	26	5	8	13	35	27	5	3	
			21				8		
c)	Meerschweinchen mit Rickettsia prowazeki immunisiert				nicht immunisierte Meerschweinchen				Infektionen mit Rikettsia prowazeki:
1.	19 (Impfstoff I_1)	1	14	4	20	16	4	—	0,5 ccm 1/500 Meerschweinchengehirn ip.
2.	19 („ I_2—I_8)	8	6	5	13	11	1	1	0,5 ccm 1/15—1/20 Meerschweinchengehirn ip.
	38	9	20	9	33	27	5	1	
			29				6		

Zeichenerklärung:

+ = Meerschweinchen mit positiven Fleckfiebertemperaturkurven nach typischer Inkubationszeit.

+/— = Meerschweinchen mit schwach positiven Fleckfiebertemperaturkurven in typischer Zeit oder mit positiven Temperaturkurven nach verlängerter Inkubationszeit.

— = Meerschweinchen mit regelrechten Temperaturkurven (kein Fieber).

Tiere (34 von 42) erwies sich, nach dem Verlauf der Fieberkurve beurteilt, mehr oder weniger immun. Nur 8 Tiere zeigten eine deutliche Fieberkurve, während von 30 Kontrolltieren 26 prompt mit typischen Kurven auf die gleiche Infektion (0,5 ccm 1/500 Meerschweinchengehirn ip.) reagierten.

Sehr deutlich geht die mit Ri. mooseri-Impfstoffen erzielte Immunität gegen das homologe (murine) Virus auch aus den nachstehenden Sammelkurven der täglichen Temperaturmittel der immunisierten und der Kontrolltiere hervor. Aus dem Kurvenverlauf auf Textabb. 1 ist ersichtlich, daß im Gegensatz zu den Kontrolltieren sowohl bei den Tieren, welche mit Eihäute-Impfstoffen als auch denen, die mit Eigelb-Impfstoffen immunisiert waren, die Temperaturkurven im Mittel deutlich niedriger blieben als bei den Kontrolltieren. Dabei ist nach dem Kurven-

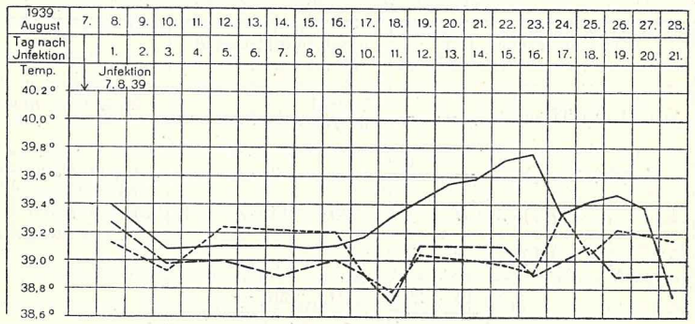


Abb. 1. Sammelkurven der täglichen Temperaturmittel der gegen murines Fleckfiebervirus immunisierten Meerschweinchen und der Kontrolltiere. a) ..... 14 mit Rickettsia mooseri-Eihäute-Impfstoff IIa immunisierte Meerschweinchen (s. Tab. I, a 2). b) — — — 15 mit Rickettsia mooseri-Eigelb-Impfstoff IIb immunisierte Meerschweinchen (s. Tab. I, a 3). c) ———— 15 Kontrolltiere.

verlauf mit dem Ri. mooseri-Eigelb-Impfstoff IIb ein besseres Resultat erzielt worden als mit dem Ri. mooseri-Eihäute-Impfstoff IIa.

Der Unterschied zwischen beiden Eierimpfstoffen IIa und IIb bestand darin, daß zur Herstellung des Impfstoffes IIa hauptsächlich die rickettsienreichen Eihäute (Dottersack) benutzt waren, während der Impfstoff IIb aus einem Teil des rickettsienarmen Eigelbs der Dottersäcke von IIa gewonnen wurde.

Von 14 mit Ri. mooseri-Eihäute-Impfstoff IIa immunisierten Tieren zeigten 5 kein Fieber und von den übrigen 9 zeigten 7 Spätkurven. Von 15 mit dem Ri. mooseri-Eigelb-Impfstoff IIb immunisierten Tieren zeigten hingegen 7 fieberfreien Verlauf, während 8 positive Fleckfieberkurven zeigten, von denen aber 7 Spätkurven waren. Von den 15 mit der gleichen Virusmenge infizierten Kontrolltieren zeigten 14 eine typische Fleckfieberkurve, nur ein Tier blieb ohne Fieber (inapparente Infektion?).

Auch gegenüber dem heterologen Virus (Ri. prowazeki) erwies sich die große Mehrzahl der in gleicher Weise und mit dem gleichen

Ri. mooseri-Impfstoff immunisierten Tiere (vgl. Tab. Ia) mehr oder weniger immun (Tab. Ib). Von 26 Tieren zeigten nur 5 eine typische Fleckfieberkurve, während von 35 Kontrolltieren 27 typisch positiv reagierten. Das murine Virus immunisierte also bei mehrmaliger Applikation (2mal 0,5, 1mal 1 ccm subkutan) nicht nur gegen die Infektion mit homologem, sondern auch recht gut gegen die mit heterologem, klassischem Virus. Deutlich geht dies wiederum auch aus der später näher zu besprechenden Kurventafel 2 hervor. Dort hat der Ri. mooseri-Impfstoff IIa nur 5 Tieren keinen Schutz gewährt; von 14 Tieren blieben auf Ri. prowazeki-Infektion 1 fieberfrei und 8 hatten Spätkurven. Die 20 Kontrolltiere brachten 16 typische und 4 Spätkurven. Dies erscheint für praktische Schutzimpfungen mit murinem Virus gegen Flecktyphus recht bemerkenswert.

Von anderen Autoren wurde auch eine kreuzweise Immunität festgestellt, dabei aber immer betont, daß die Immunität durch murines Virus eine erheblich schwächere Kreuzimmunität erzeugt als umgekehrt.

So fanden Zinsser und seine Mitarbeiter und später auch Veintemillas, daß die mit murinem Ri.-Impfstoff (aus der Ratte) erzeugte Immunität gegen heterologes Virus zwar deutlich, aber schwächer war, wie die gegen homologes Virus. Immerhin möchten wir, ebenso wie Veintemillas, aus unseren Versuchen schließen, daß es eine beachtenswerte Kreuzimmunität gibt, und daß daher auch die Vakzinierung mit Rickettsia mooseri-Impfstoffen gegen Flecktyphus nach den tierexperimentellen Befunden in Frage kommt. Wir beabsichtigen, dieser Frage noch weiter nachzugehen, da ja die Züchtung der Ri. mooseri im Dottersack in reichlichen Mengen gelingt und selbst im Zellkulturverfahren und in Maitlandkulturen gut möglich ist.

Als sich im vergangenen Sommer bei unseren Versuchen ergab, daß für die Fleckfieberimpfstoffe auch genügende Mengen der Ri. prowazeki im Hühnerdottersack zu gewinnen sind, gingen wir hauptsächlich zur Herstellung von Impfstoffen mit der Ri. prowazeki über. Die Brauchbarkeit dieser Impfstoffe ließ sich sowohl tierexperimentell als auch klinisch erbringen, in letzterer Beziehung insofern, als der Impfstoff bei mehreren Impflingen (s. Tab. III) eine deutliche Steigerung der Weil-Felix-Reaktion ergab und bei der Injektion keine besonderen Reaktionen veranlaßte.

Nach Tabelle Ic blieben von 38 immunisierten Meerschweinchen 29 ohne typisches Fieber, davon waren 9 völlig fieberfrei, 20 hatten sog. Spätkurven und 9 zeigten regelrechte Temperatursteigerungen, während von 33 Kontrolltieren 27 regelrecht fieberten.

Die Wirkung des Ri. prowazeki-Impfstoffs gegen das klassische Virus im Tierexperiment ist sehr gut auch aus dem Kurvenverlauf, wie ihn die Textabb. 2 darstellt, zu ersehen. Auf dieser Tafel sind die Sammelkurven der täglichen Temperaturmittel der gegen Flecktyphus homolog bzw. heterolog immunisierten Meerschweinchen in Vergleich gesetzt mit der Sammelkurve der mit dem gleichen Virus infizierten Kontrolltiere. Aus dem Kurvenverlauf läßt sich deutlich erkennen, daß beide Impfstoffe,

der homologe und der heterologe, bei den Meerschweinchen Immunität erzeugt hatten. Es zeigt sich hier wiederum, daß mit dem homologen Ri. prowazeki-Impfstoff die stärkeren Immunitätsgrade erzielt wurden.

Von 19 mit Ri. prowazeki-Impfstoff I_1 (vgl. Tab. Ic 1) immunisierten Tieren blieben 4 ganz fieberfrei, 15 zeigten positive Kurven, aber darunter waren 14 Spätkurven. Von 14 mit Ri. mooseri-Eierimpfstoff IIa immunisierten Tieren (vgl. Tab. Ib 2) blieb eins fieberfrei, während 13 positive Temperaturkurven zeigten, darunter wiederum 8 Spätkurven. Alle 20 Kontrolltiere zeigten bei der gleichen Infektion typische Fieberkurven, 4 Spätkurven. Deutlicher treten die Unterschiede in der Sammelkurve 2 hervor.

Über die Art der beiden Impfstoffe ist folgendes zu bemerken: Der Eierimpfstoff I_1 ist ein aus Ri. prowazeki-reichen Eihäuten (Dottersack)

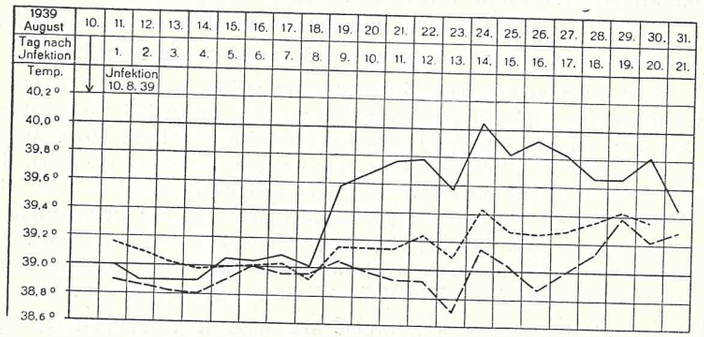


Abb. 2. Sammelkurven der täglichen Temperaturmittel der gegen Flecktyphus homolog bzw. heterolog immunisierten Meerschweinchen und der Kontrolltiere. a) ——— 19 mit Rickettsia prowazeki-Impfstoff I_1 immunisierte Meerschweinchen (s. Tab. I, c 1). b) ..... 14 mit Rickettsia mooseri-Impfstoff II_a immunisierte Meerschweinchen (s. Tab. I, b 2). c) ——— 20 Kontrolltiere.

hergestellter, ungereinigter Impfstoff, während der Impfstoff IIa dem oben beschriebenen (s. Abb. 1) entspricht und einen aus Ri. mooseri-reichen Eihäuten gewonnenen Impfstoff betrifft.

Leider waren unsere Arbeiten im vergangenen Herbst und Winter durch eine Meerschweinchenstallseuche sehr gestört. Ein großer Teil der Tiere litt an Pneumonien; durch diese Infektion wurde der Verlauf der für die Beurteilung der Fleckfieberinfektion so wichtigen Temperaturkurve stark beeinträchtigt. Wir mußten daher bei einem Teil unserer Versuche die Fieberkurve für die Beurteilung der Brauchbarkeit der Ri. prowazeki-Impfstoffe ausschalten. Immerhin bleiben noch die in der Tabelle I c 2 aufgeführten Tiere übrig, welche ihrerseits die Wirksamkeit des Impfstoffs klar erkennen lassen. Bei den übrigen Impfstoffen waren wir damals zeitweise gezwungen, den Hauptwert bei der Beurteilung ihrer Brauchbarkeit auf den mikroskopischen Rickettsienbefund des Dottersackmaterials zu legen.

Bemerken möchten wir bei dieser Gelegenheit noch, daß die Ergebnisse der in der Tabelle Ic aufgeführten Versuche nicht schlechter waren, als die Ergebnisse, welche wir bei der Immunisierung mit Weigl-Impfstoffen

erhielten. Auch diese Versuche müssen wir noch wiederholen, da die damals uns zur Verfügung stehenden Weigl-Impfstoffe wohl schon älteren Datums waren und die Zahl der Versuchstiere noch zu gering ist. Unsere ersten Impfstoffe sowie einige, welche wir in letzter Zeit herstellen konnten, ergaben einwandfrei gute Resultate, wie aus einigen beigefügten Kurven

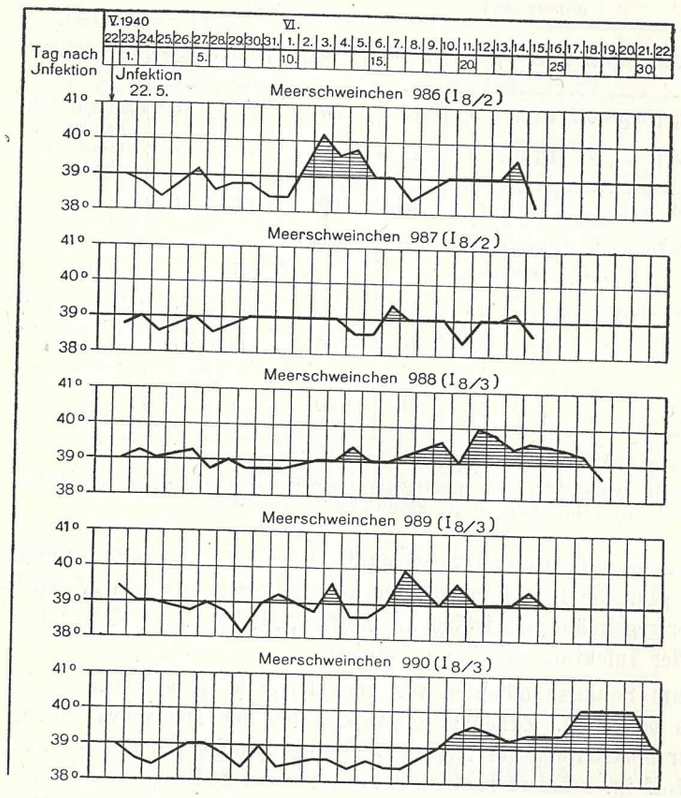


Abb. 3. Versuch vom 22. 5. 40. I). Immunisierte Tiere 986—990. Infektion mit 0,5 ccm 1/22 Gehirn Meerschweinchen Nr. 18 sc. Rickettsia prowazeki-Virus ZW_4. $I_{8/2}$ und $I_{8/3}$ sind die Nummern der geprüften Impfstoffe.

ersichtlich ist. Sie dürften guten Weigl-Impfstoffen nicht nachstehen (Fieberkurven auf Textabb. 3 u. 4).

In Tabelle II sind die Ergebnisse der Immunisierungsversuche an Mäusen zusammengestellt. Die Mäuse wurden teils mit der Ri. mooseri, teils mit der Ri. prowazeki immunisiert, und zwar erhielten die Tiere 2mal 0,1 und bei der 3. Injektion 0,2 ccm Impfstoff subkutan. Die Mäuseversuche ergaben ebenso wie die Meerschweinchenversuche eine deutliche Immunität sowohl gegen das homologe wie gegen das heterologe Virus,

Übersichtstabelle II.
Ergebnis der Immunisierungsversuche an Mäusen.

Versuchsreihe	Immunisierte Tiere			Kontrolltiere			Bemerkungen
a)	Mäuse mit Rickettsia mooseri immunisiert			nicht immunisierte Mäuse			Infektionen mit Rickettsia mooseri:
	Anzahl der Tiere	†/skr.	lkr./—	Anzahl der Tiere	†/skr.	lkr./—	
1.	29 (Impfstoff II 1a)	5	24	30	12	18	0,25 ccm 1/1000 Mäusegehirn ip. = 1000-fache Grenzinfektionsdosis
2.	30 („ II 1b)	9	21				
	59	14	45	30	12	18	
b)	Mäuse mit Rickettsia prowazeki immunisiert			nicht immunisierte Mäuse			
1.	30 (Impfstoff I_1)	16	14	30	25	5	0,25 ccm 1/1000 Mäusegehirn ip.
2.	20 („ I_3)	8	12	20	10	10	0,25 ccm 1/120 Mäusegehirn ip.
	50	24	26	50	35	15	

Zeichenerklärung:
†/skr. = In typischer Zeit eingegangene bzw. schwerkrank gewordene Mäuse,
lkr./— = leichtkranke oder völlig gesund gebliebene Mäuse.

doch war hier die Immunität gegen das homologe Virus stärker ausgeprägt. Leider ging die Infektion bei den Kontrolltieren in diesen Versuchsreihen weniger regelmäßig als früher an insofern, als bei ihnen nicht immer 70 % nach der Infektion sichtbar erkrankten.

Zum Schlusse möchten wir noch folgende bemerkenswerte Beobachtungen berichten. Zunächst zeigte sich bei den Meerschweinchen, welche wir zur Feststellung der Avirulenz des Impfstoffes mit 1 ccm inaktivierten Impfstoff ip. infiziert hatten, daß diese einmalige Dosis von 1 ccm keine erkennbare (allgemeine oder lokale) Immunität hinterließ. Diese Meerschweinchen erkrankten bei der späteren Infektion ebenso wie die Kontrolltiere. Dieser Befund kann nicht überraschen, denn wir wissen ja, daß im Tierversuch und auch beim Menschen selbst nach überstandener Infektion keine absolute Immunität zurückbleiben kann und daß auch sonst die Schutzimpfungen mit abgetöteten Erregern immer nur einen experimentell nachweisbaren Schutz im Tierversuch hinterlassen, wenn mehrfache Injektionen zur Schutzimpfung benutzt werden. Auch beim Menschen wird es sich nicht anders verhalten.

Auch über die Impfstoffherstellung müssen noch weitere Erfahrungen gesammelt werden. 1). Es zeigte sich daß das mehrmalige Erhitzen auf 56° bzw. 60° (und bei dem formalinisierten Impfstoff selbst

die einmalige Erhitzung) eine gewisse Abschwächung der immunisierenden Wirkung verursachte. Wenn wir trotzdem die Inaktivierung des (später phenolisierten) Impfstoffes bei 56 bzw. 60° beibehalten haben, so geschah dies, um bei unklarem Ausfall des Tierversuchs Infektionen sicher ausschließen zu können, und um nach dem Umfüllen sterile Impfstoffe zu behalten.

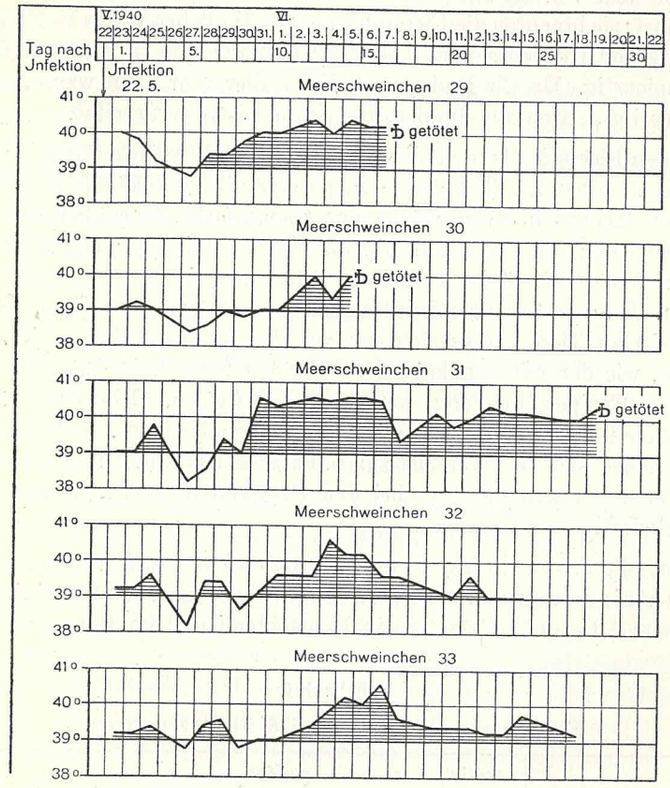


Abb. 4. Versuch vom 22. 5. 40. II) Kontrolltiere 29—33. Infektion mit 0,5 ccm 1/22 Gehirn Meerschweinchen Nr. 18 sc. Rickettsia prowazeki-Virus ZW_4.

2). In einem Fall konnten wir beobachten, daß bei den Dottersackimpfstoffen die aus dem Eigelb hergestellten deutlich besser wirkten als die aus den Eihäuten gewonnenen. Im ersten Falle wirken anscheinend neben den Rickettsien noch irgendwelche in das Eigelb in Lösung gegangene oder abgesonderte Ri.-Bestandteile als Antigen mit. Wir haben bereits früher darauf hingewiesen, daß die Wirksamkeit rickettsienarmer Impfstoffe kaum anders zu erklären ist als durch Mitwirkung gelöster Rickettsienteile (Endotoxine?) oder Toxine.

Die günstigsten Resultate erhielten wir mit den Impfstoffen I_1, $I_8/_2$ und $I_8/_3$. I_1 war ein Impfstoff, der nur 30 Minuten bei 56° inaktiviert war und $I_8/_2$ ein solcher, der aus atypischen Formen (viel Diplostäbchen) hergestellt war, die aus Eiern stammten, zu deren Beimpfung eine Ri. prow. aus Maitlandkultur verwandt war. In einer Reihe von Eiersubpassagen wurden diese für Rickettsien nach Giemsa zu rot sich färbenden, in ihrer Morphologie sich aber von der Ri. prow. kaum zu unterscheidenden Diplostäbchen fortgeführt; sie brachten die Eierembryonen in ähnlicher Weise wie Rickettsia mooseri schon frühzeitig zum Absterben und wuchsen in großer Zahl und oft kolonieartig. Da die Embryonen dieser Eier sehr klein waren, wurden sie daher im ganzen zur Impfstoffbereitung ($I_8/_2$) verarbeitet.

In den Eierserien fanden sich oft neben typischen Rickettsien in einigen Eiern, in anderen für Rickettsien zu plumpe, kleine kokkoide Formen, die sich auch färberisch etwas gröber der Giemsafarbe gegenüber verhielten. Aus diesen entstand Impfstoff $I_8/_3$, während die mit typischen Rickettsien bewachsenen Dottersäcke derselben Züchtungsreihen den Impfstoff I_4 lieferten. Bei den Immunitätsprüfungen der mit $I_8/_2$- und $I_8/_3$-Impfstoffen immunisierten Tiere erwies sich der mit den Diplostäbchen ($I_8/_2$) ebenso wirksam, wie der mit den kokkoiden Formen hergestellte $I_8/_3$. Die nachfolgenden Temperaturkurven sollen dies aufzeigen. Die Diplostäbchen enthaltenden Dottersäcke waren im übrigen vollvirulent. Die Stäbchenformen ließen sich in Eiern bis zur 6. Passage fortführen und vermehren. Leider erwiesen sich die Eier bei den Passagen in der 7. Generation als mischinfiziert.

Fast alle unsere im Tierversuch erprobten Impfstoffe wurden von uns zu Schutzimpfungen beim Menschen abgegeben. Außer einigen Instituten und Gesundheitsämtern in Deutschland und im Generalgouvernement Polen gaben wir Impfstoffe an die Wehrmacht, die Auslandabteilung der Reichsärztekammer (Umsiedlung) und an Arbeitslager ab. Im ganzen wurden von uns bisher für 800 Personen Impfstoff geliefert. Nach den uns bisher zugegangenen Berichten wurden die Injektionen gut vertragen. Es wurde bei der ersten und der zweiten Injektion 0,5, bei der dritten 1,0 ccm subkutan gegeben. Mit dem Blut eines Teils der Geimpften konnten wir später die Weil-Felix-Reaktion anstellen. Wir fanden vielfach erhöhte Titer gegenüber Normalserumkontrollen (s. Tab. III) und konnten bei verschiedenen Personen deutliche Steigerungen der Titer gegenüber dem Proteus X 19 vor der Impfung feststellen. Einige Beispiele sind in der nebenstehenden Liste aufgeführt. Bei 13 vor und in der Regel 2—3 Wochen nach der Schutzimpfung ausgeführten Weil-Felix-Reaktionen ergaben sich folgende Titersteigerungen:

1mal keine Steigerung,
7mal um 1 Stufe,
3mal um 2 Stufen,
1mal um 4 Stufen, also in diesem Falle von 1 : 25 — auf 1 : 200 +.

Für die Beurteilung der Wirksamkeit der Impfung haben wir noch keine genügenden Grundlagen. Wir hoffen, später darüber berichten zu können.

Tabelle III.

Ergebnisse der W.F.R. bei Schutzgeimpften.

Bezeichnung der Sera	Anzahl	negativ	positiv							Bemerkungen
		1/25	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
Normale Kontrollsera	12	1	5	6	.	.	.	.	.	Im Institut ausgeführte Untersuchungen, gegen OX_{19}, Ablesung nach zweistünd. Aufenthalt im Brutschrank 37°
Sera von Schutzgeimpften (Impfstoffe I_1—I_4)	30	—	3	7	13	7	.	.	.	
Sera von Schutzgeimpften in Hamburg (Impfstoffe I_2 und II_2)	14	2	1	1	4	6	.	.	.	Im Hamburger Tropeninstitut angestellte Reaktionen (gegen OX_{19} u. OX_2)

Zusammenfassung.

Es wird über neuere Versuche zur Gewinnung von Impfstoffen gegen Flecktyphus berichtet, zu deren Herstellung in der Hauptsache im Dottersack bebrüteter Hühnerembryonen gezüchtete Rickettsien benutzt wurden. Die Impfstoffe ergaben im Tierversuch gute, immunisierende Eigenschaften. Soweit bisher festgestellt werden konnte, wurden die Injektionen des Impfstoffes bei Schutzimpfungen gut vertragen und hinterließen bei vielen Personen eine deutlich nachweisbare Steigerung des Bluttiters gegen die Proteus X 19-Bazillen (W.-F.-R.). Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Impfstoffe sind im Gange.

Für ihre aufopfernde und sachverständige technische Hilfeleistung bei den Fleckfieberarbeiten haben wir Fräulein Leni Herz besonders zu danken.

Schrifttum.

1) Otto, R., und Wohlrab, R., Fleckfiebergruppe im Handb. d. Viruskrankheiten **2**, 557.
2) Weigl, R., Med. Dośvi adcz i spot **23**, Ref. Zbl. f. d. ges. Hyg. **43**, 208 (1939).
3) Zinsser, H., Amer. J. of Hyg. **25**, 455 (1937).
4) Otto, R., Z. f. ärztl. Fortbildg. **1940**, Nr 5.
5) — und Wohlrab, R., Arbeiten aus dem Institut, H. 38 (1939).
6) Cox, H., Public Health Reports **53**, Nr 51 (1938).
7) — ibid. **55**, Nr 3 (1940).

Tafelerklärung.

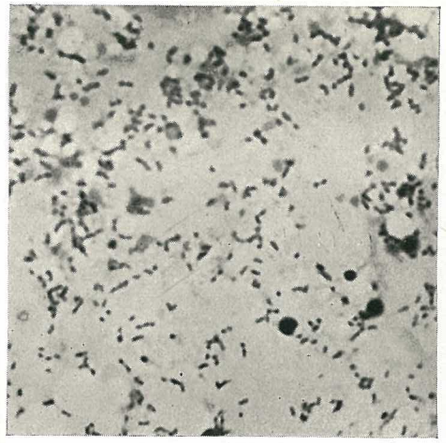
Abb. 1 u. 2. Rickettsia mooseri im 18 Tage lang bebrüteten Hühnereidottersack.

Abb. 3 u. 4. Rickettsia prowazeki im 20 Tage lang bebrüteten Hühnereidottersack. 6. Eierpassage.

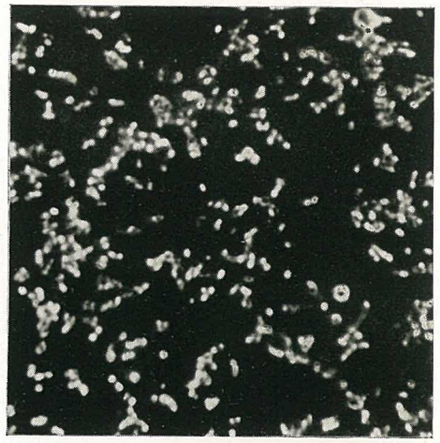
Abb. 5 u. 6. Sediment des Rickettsia prowazeki-Impfstoffes $I_{8/2}$. Züchtung der Rickettsien im Hühnereidottersack.

Bild 1, 3 u. 5: Giemsafärbung. Bild: 2, 4 u. 6: Dunkelfeld. Vergr. 1900fach. Phot.: H. Maas, Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt a. M.

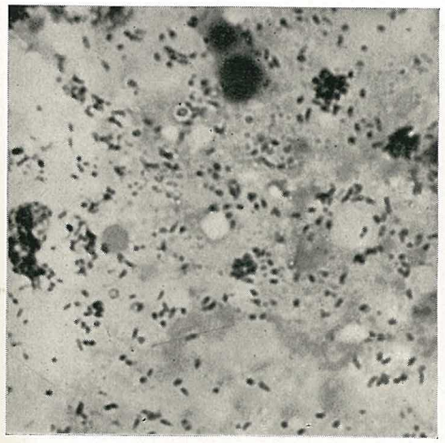
Der hohe Gehalt an Rickettsien in den einzelnen Präparaten läßt sich an den Bildern nicht erkennen, weil zur photographischen Aufnahme absichtlich dünnste Stellen der Ausstriche gewählt werden mußten.



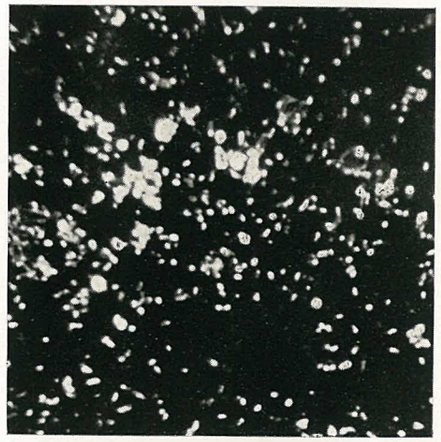
1



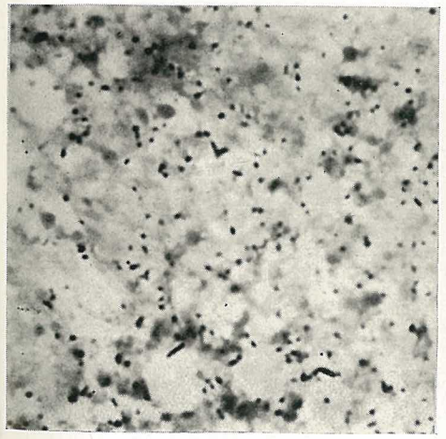
2



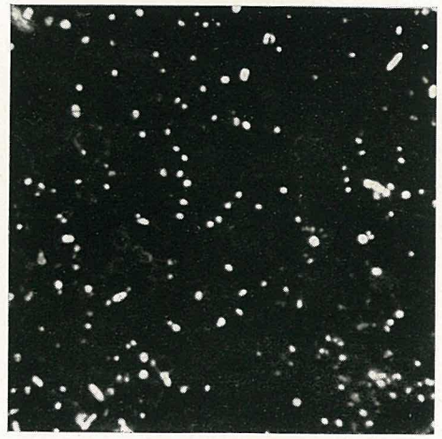
3



4



5



6

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie und dem Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt/Main (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto).

II.

Experimentelle Chemotherapie des Fleckfiebers.

Von

R. Wohlrab.

Mit 6 Kurven im Text.

Für die Einrichtung eines Laboratoriums für Fleckfieberforschung im Frankfurter Forschungsinstitut für Chemotherapie zur Fortführung der von R. Otto im Institut „Robert Koch" in Berlin begonnenen Arbeiten waren verschiedene Momente maßgebend. In der Hauptsache sollten neben reinen Forschungszwecken, wobei die Rickettsien als Virusmodell angesprochen wurden, die Arbeiten dazu dienen, chemotherapeutisch wirksame Präparate zu finden und andererseits einen brauchbaren Impfstoff als Ersatz für den umständlich aus Läusen zu gewinnenden Impfstoff (26).

Als mir 1935 der Auftrag zuteil wurde, an den chemotherapeutischen Arbeiten experimentell mitzuarbeiten, lag nach einer kritischen Prüfung der bis dahin vorliegenden chemotherapeutischen Tierexperimente der Gedanke nahe, die neuen Ergebnisse der Fleckfieberforschung für unsere Zwecke nutzbar zu machen. War man früher allein bei experimentellem Arbeiten mit Fleckfieber auf Affen und besonders, weil leicht erreichbar und billiger, auf Meerschweinchen angewiesen, so traten mit Entdeckung und Abtrennung einer murinen Fleckfiebergruppe von dem klassischen Flecktyphus die Muriden als gut empfängliche Versuchstiere hinzu. Was speziell die Maus als Versuchstier betrifft, so hatten Laigret und Jadin 1932 (15) über erfolgreiche Passagen des murinen Virus bei der weißen Maus berichtet. Auf die Schwere der Infektion haben hierbei zuerst verschiedene japanische Autoren, später dann auch Otto und Schäfer, Wohlrab und Otto und Wohlrab (31, 51, 32) hingewiesen.

In dem Anfangsstadium, in dem sich die chemotherapeutische Forschung bei den Rickettsiosen und den verwandten Viruskrankheiten befindet, in welchem die Aufgabe darin besteht, rein orientierende Versuche ohne die Möglichkeit gezielten Vorgehens anzustellen — es ist außer dem Neosalvarsan

bei der Pferdebrustseuche und neuerdings dem Prontosil beim Lymphogranuloma inguinale, keine Substanz bekannt, die irgendeinen noch so geringen spezifischen Einfluß hat —, ist es unwesentlich, ob zur Testinfektion der uns naheliegende Flecktyphus oder aber eine diesem nahe verwandte Krankheit, das murine Fleckfieber, verwendet wird. Das murine Fleckfiebervirus aus verschiedenen Teilen der Welt verursacht bei den weißen Laboratoriumsmäusen eine heftige Erkrankung mit einem in hohem Prozentsatz tödlichem Ausgang, während es die Meerschweinchen, wie auch das Flecktyphusvirus, durch das im übrigen Mäuse nur inapparent zu infizieren sind, nur mit einer typischen Fieberreaktion erkranken läßt.

Die bestechende Exaktheit des chemotherapeutischen Versuchsmodelles bei den Trypanosomeninfektionen der weißen Mäuse besteht vor allem in der Tatsache, 100 %ig auf tot auswerten zu können. Diesen Vorteil bietet nicht voll in diesem Ausmaß, aber doch in genügendem Grade, die Fleckfieberinfektion der weißen Maus. So wurde begonnen, eine den Besonderheiten der Fleckfieberinfektion der Mäuse gerecht werdende chemotherapeutische Technik zu entwickeln, die durch Beachtung variationsstatistischer Überlegungen eine gute Sicherheit der Versuchsergebnisse besitzt. Leider hat mich im Jahre 1936 eine viele Monate lange Unterbrechung durch eine Laborinfektion an der Arbeit verhindert; in dieser Zeit wurden die Versuche von W. Schäfer teilweise fortgeführt. Über die erzielten Ergebnisse haben R. Otto und W. Schäfer berichtet (31). Geprüft wurden eine Reihe von Präparaten, von denen genannt seien: Cerisulfat, Viktoriablau, Methylenblau usw.

Aus der Volksheilkunde ist kein Heilmittel für das Fleckfieber bekannt geworden. Die moderne Entwicklung der Chemotherapie hat dann verursacht, daß sowohl von klinischer als auch von experimentell-therapeutischer Seite heterogene Präparate empfohlen worden sind.

Die Auswahl der zu prüfenden Substanzen erstreckte sich zunächst auf solche, denen in der Literatur irgendein Einfluß nachgesagt wurde, dann zum Teil auf deren Verwandte (z. B. Chinosol und andere Chinolin-Abkömmlinge), ferner auf sonst in der Praxis benutzte Chemotherapeutika und auf neue im Forschungsinstitut hergestellte Verbindungen, die zum Teil für das Fleckfieber speziell synthetisiert wurden, wie Viktoriablau-Abkömmlinge, oder für andere Infektionskrankheiten hergestellt wurden, wie z. B. Chaulmoograpräparate, Goldverbindungen usw.

Die bei verschiedenen Infektionskrankheiten als wirksam befundenen Substanzen sind an kranken Menschen vor allem in den Fleckfieberepidemien des Weltkrieges und Nachkrieges versucht worden, ohne daß eine allgemein anerkannte Wirkung mit irgendeinem der benutzten Therapeutika erzielt wurde. Es sind auf diese Weise damals und schon früher z. B. verschiedene Proteine, wie Pferdeserum, Eigenserum, Besredkas sensibilisierte Typhusvakzine und sterile Milch (4, 16, 21, 37, 22, 39), Jod mit Serum (2), ferner Chinin (34, 42), Optochin (14), Optochin und

Kampfer (20), Atophan und Kalziumchlorat (43), Chinosol (33), Urotropin (6), Neohexal, eine Verbindung von Urotropin und Sulfosalizylsäure (6), Nukleohexal, eine Verbindung von Nukleinsäure und Hexamethylentetramin (17, 23) und verschiedene kolloidale Ag-Präparate wie Kollargol, Fulmargin und Methylenblausilber (5, 11, 44, 46)) empfohlen worden.

Die therapeutischen Erfolge waren nie so überzeugend, daß nicht bis heute auch von erfahrenen Fleckfieberärzten weitere Chemikalien erprobt werden. Allerdings berichtet Veintemillas (49), der Urotropin, Hg-bichlorid, -cyanat und -chromat sowie ammoniakalisches $CuSO_4$ ohne

Tabelle 1.
Bei Meerschweinchen und Affen geprüfte Chemotherapeutika gegen Flecktyphus.

Präparat	Autor	Tierart	Therapeutische Wirkung
Atoxyl Salvarsan Trypanblau	Gavino und Girard (1911)	Affen	ohne Erfolg " " " "
Argoflavin Sublimat Chininhydrochlorid Optochin Trypaflavin	Otto u. Papamarku (1920)	Meerschweinchen	ohne Erfolg " " " " " " " "
Gold- und Silberpräparate	Otto (1927)	Meerschweinchen	ohne Erfolg
Trypaflavin	Otto u. Winkler (1928)	Meerschweinchen	ohne Erfolg
Kollargol Trypanblau Na-Chaulmoograt Chinesische Tusche	Reimann (1930)	Meerschweinchen	gut } R.E.S.-Blokkade " } " } " }
Die Salze fast aller Metalle, darunter Rubidiumnitrat Cäsiumsulfat	Breinl u. John (1932)	Meerschweinchen	wechselnd gut "
Tryphal Tryparsamid Methapen Germanin	Fisher (1932)	Meerschweinchen	ohne Erfolg (bei Rocky Mountain spottedfever)
Sdt. 386 B (Antimon + Arsen) Solganal B	Ronse (1935)	Meerschweinchen	unsicher ohne Erfolg
Cäsiumnitrat Rubidiumsulfat	Wohlrab (1939)	Meerschweinchen	ohne Erfolg " "
Prontosil Sulfapyridine	Topping (1939)	Meerschweinchen	ohne Erfolg (bei R.M.S.F. und murinem Fleckfieber)

Erfolg anwandte, daß eine Behandlung mit Brechweinstein und Jodkali von bestem Erfolg seien. Piston und Bucco (35) geben ein Gemisch von Quecksilberoxyzyanid und Kongorot und Teuent (45) Atebrin als gut an.

Die von verschiedenen Autoren im Tierversuch geprüften Präparate sind mit ihrem therapeutischen Erfolg in Tabelle 1 aufgeführt. Auch darunter ist eigentlich kein Präparat, dessen Einwirkung so deutlich ist, daß man sich Günstiges für die Therapie beim Menschen versprechen könnte. Bei den Versuchen von Reimann handelt es sich um in der menschlichen Therapie wohl kaum anwendbare Blockaden des Retikulo-Endothelial-Systems (R.E.S.), während die Erfolge von Breinl und John mit den Salzen der seltenen Alkalimetalle, Rubidiumsulfat und Cäsiumnitrat, an Meerschweinchen nicht wiederholt werden konnten, und im übrigen ebenfalls nicht, wie weiter unten ausgeführt werden wird (52) an Mäusen.

Der Mäuseversuch als Modellversuch für chemotherapeutische Untersuchungen.

In einer früheren Arbeit wurden die Nachteile dargestellt, die der Meerschweinchenversuch chemotherapeutischem Arbeiten bietet, und es wurde seine Versuchssicherheit festgestellt. Zusammenfassend ließ sich sagen, daß die Versuchssicherheit des Einzeltieres beim Arbeiten mit Meerschweinchen zumindest nicht größer ist als die beim Benutzen von Mäusen. Dabei fällt die Wahl natürlich auf die Mäuseinfektion, einmal wegen der Möglichkeit einer objektiveren Bewertung (klinischer Krankheitszustand bzw. Tod oder gesund bzw. Leben beim Mäusemodell gegenüber einer einfachen Fiebererhebung oder Normaltemperatur beim Meerschweinchenmodell), zum andern wegen der Möglichkeit mit Mäusen in großen Reihenkollektiven zu arbeiten.

Der Ablauf der experimentellen Infektion weißer Mäuse mit murinem Fleckfieber (51) verläuft so gleichartig, daß bei erfüllter Voraussetzung genügend großer Tierreihen und eines gut virulenten Rickettsia mooseri-Stammes Zweifel in der Infektionsbeurteilung nicht entstehen.

Das von uns benutzte Virus, eine Rickettsia mooseri aus Mexiko[1]), wird in Peritonealpassagen (Infektion mit Gehirn) weitergeführt. Das Gehirn einer Maus, am 1. Tage ihres schweren Krankheitszustandes getötet, wird mit Glasperlen in einer Pulverflasche zerschüttelt und kann dann (häufig bis zu 8000000fach) verdünnt werden, ehe die Grenzinfektionsdosis erreicht ist. Als hinsichtlich des Infektionserfolges beständigste Verdünnung hat sich uns die 2000fache bewährt, von der 0,25 ccm ip. gegeben werden, also 1/8000 Mäusegehirn. Um eine grobe überschlagsmäßige Kontrolle des Infektionstiters zu haben, lassen wir die 10-, 100- und 1000fache Verdünnung hiervon in kleiner Tierreihe mitlaufen.

1) s. R. Otto u. R. Wohlrab „Fleckfiebergruppe" in Hdbch. d. Viruskrankheiten, G. Fischer, Jena.

Das Einzeltierkollektiv zählt 25 Mäuse. Kleinere Reihen von 5 und 10 Tieren, wie sie anfangs benutzt wurden, haben sich als unbrauchbar erwiesen. Bei so kleiner Tierzahl kommen zu häufig Scheinerfolge vor, die sich dann in der Wiederholung als zufällig erweisen. Umgekehrt kann aber eine geringe, positive Wirkung eines Präparates durch eine zufällige Schwankung der Krankenzahlen in entgegengesetzter Richtung verdeckt werden, und da eine Wiederholung nicht nötig erscheint, dem Beobachter entgehen. Es werden 200—250 Tiere in einem Versuchsansatz infiziert. Dazu werden 35—45 Minuten Zeit gebraucht. Das ist die längste Zeit, in der die Verdünnungen in den eisgekühlten Fläschchen sich ungefähr in ihrer Virulenz konstant erhalten. Allzu häufiger Spritzenwechsel oder Abbrennen der Kanüle zwischen den einzelnen Injektionen sind dabei natürlich nicht möglich. Mischinfektionen durch die Injektionstechnik sind vorgekommen, aber sie sind nicht häufig. Auf 200 Mäuse kamen erfahrungsgemäß 0 bis höchstens 5 Ausfälle. Bei größeren Ausfällen war mit einer Mischinfektion des Infektionsmaterials zu rechnen.

Die Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung, wie auch ich sie vornahm, ist jedenfalls wohl nicht die günstigste Art, wie aus den Resistenzuntersuchungen von Otto und Chou (27) hervorgeht, und mit verbesserten Aufschwemmungsflüssigkeiten, wie einem geringen Serumzusatz, mag das Virus länger haltbar sein. Jedoch genügten 8—10 Versuchskollektive in einem Ansatz völlig für unsere Zwecke, da mehr als 200 Mäuse täglich (und zum Teil sogar mehrmals täglich) mit verschiedenen Applikationsarten, mit manchmal schlecht emulgierbaren oder lösbaren Substanzen nicht gut zu verarbeiten sind. Damit aber auftretende Schwankungen der Infektionskraft sich gleichmäßig auf die einzelnen Kollektive verteilen, werden diese 8—10 Kollektive alternierend in ihren einzelnen Tieren infiziert. Nach der ersten Maus in jedem Kollektiv in aufsteigender Reihenfolge, rückwärts jede zweite, in aufsteigender Reihenfolge wieder jede 3. Maus, rückwärts jede 4. usw.

In jeder Versuchsreihe wird ein Kollektiv zu 25 Mäusen als Infektionskontrolle unbehandelt gelassen. An diesen Kontrollen sei der Verlauf der Infektion und die Beurteilung des Infektionsmodelles nach meinen Beobachtungen dargestellt.

Nach der Infektion und einer Inkubationszeit von 6—8 Tagen, die Länge richtet sich nach der Stärke der Infektion, werden die Mäuse krank. Die Krankheit zeigt sich klinisch am deutlichsten am gesträubten Fell und an der Lichtscheu der Tiere; es entwickelt sich eine seröse, später teilweise eitrige Konjunktivitis und zugleich auch eine diarrhoische Darmentzündung, anfangs hervorgerufen durch eine schwere, seröse Rickettsienperitonitis (51). Das Krankheitsbild entwickelt sich sehr schnell weiter, 24—48 Stunden, selten 72 Stunden nach dem letzten Tage der Inkubationszeit, ist der Höhepunkt der Erkrankung mit dem Abgang von $^2/_3$ der Mäuse in den Tierreihen erreicht, um ebenso schnell wieder bei dem Rest der Tiere abzuklingen.

Die Beurteilung des Infektionserfolges wurde vor Abschluß der Inkubationszeit, also am 6. Tag post infectionem (p.i.) begonnen und täglich bis zum 14. Tage p.i. protokolliert.

Sie unterscheidet 4 Stufen der Erkrankung, nämlich:

1. { — = glatt oder nicht krank.
   + = leicht krank oder Zustand unsicherer Gesundheitsbeurteilung (hat nur Wert als Hilfsbeobachtung, um den großen Unterschied zwischen glatt und krank der nächsten Stufe zu überbrücken); dieses +-Stadium der Mäuse zeigt das Ende der Inkubationszeit an.
2. ++ = krank, unverkennbar gesträubtes Fell und dadurch aufgetrieben erscheinendes Abdomen, Freßunlust, beginnende Konjunktivitis.
3. +++ = schwerkrank; dabei treten zum vorbeschriebenen Zustand noch tonisch-klonische Krämpfe (Zittern), Bewegungsarmut oder -unmöglichkeit, Aszites, ausgebildete Konjunktivitis mit Verklebung der Augen und Durchfälle hinzu.
4. † = tot.

In Tabelle 2 sind aus 15 Reihenversuchen die Infektionskontrollkollektive mit ihrem täglichen Anfall von † und +++ aufgeführt.

Tabelle 2.

15 Infektionskontrollkollektive zu je 25 Mäusen, infiziert mit 0,25 ccm 1/2000 Mäusegehirnemulsion (Rickettsia mooseri) ip. Täglicher Anfall der † und +++ (Schwerkranken). (Insgesamt 375 Mäuse.)

Tag nach der Infektion	Kollektivnummer																%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
6.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	9	0	0	12	3,20
7.	1	1	1	0	2	5	0	0	0	8	0	3	4	2	1	28	7,47
8.	8	2	8	4	1	8	3	3	2	8	4	10	5	14	16	96	25,60
9.	9	10	5	6	4	4	8	15	15	5	9	9	1	4	6	110	29,33
10.	0	5	3	4	5	1	4	3	6	2	5	0	0	1	1	40	10,67
11.	2	0	0	4	1	1	1	2	1	0	1	0	3	0	0	16	4,27
12.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1,07
Summe	21	18	17	19	16	19	16	23	24	23	19	24	22	21	24	306	81,60

Bei einer Gesamterkrankungsziffer († und +++) von 306 von 375 Tieren oder 81,60 % beträgt die einfache mittlere Fehlerabweichung ± 2 %, die 3fache ± 6 %. Bezieht man nicht auf 375, sondern auf die Kollektivstärke von 25 Tieren, so folgt nach der Formel

$$m_{(n)} = \sqrt{\frac{p\,(100 - p)}{n}},$$

wobei $p = 100\,\frac{305}{375} = 81{,}6\,\%$ die durchschnittliche Erkrankung († und +++) und n die benutzte Tierzahl darstellen,

$$m_{(25)} = \sqrt{\frac{81{,}6 \cdot 18{,}4}{25}} = 7{,}75\,\%$$ oder tabellarisch:

	1 m	2 m	3 m
Mäuse	± 1,9	± 3,9	± 5,8
Tierzahl = 25, p = 81,6 % = 20,4 Mäuse ↗ von / ↘ bis	18,5 / 22,3	16,5 / 24,3	14,6 / 25

Tabelle 3.

15 Infektionskontrollkollektive zu je 25 Mäusen. Auswertung auf „Tot" (†). Infektionsdosis: 0,25 ccm Mäusegehirnemulsion 1/2000 ip.

Versuch	†/25[1])
I 146	12
152	16
160	16
170	14
182	12
188	18
II 2	13
12	21
24	16
44	21
54	18
54	22
70	19
80	17
118	23
Summe	259/375

1) †/25 = Anzahl der eingegangenen Tiere des Kollektives zu 25 Tieren.

Berücksichtigt man nur die †, wie sie für die gleichen Kollektive in Tabelle 3 aufgeführt sind, so ergibt sich bei 259 † von 375 Mäusen oder 69,06 % eine mittlere Fehlerabweichung von 9,24 %; auf 25 Mäuse bezogen wieder tabellarisch:

	1 m	2 m	3 m
Mäuse	± 2,3	± 4,6	± 6,9
Tierzahl = 25, p = 69,06 % = 17,3 Mäuse ↗ von / ↘ bis	15,0 / 19,6	12,7 / 21,9	10,4 / 24,2

An Hand dieser 2 Zahlenreihen ist sofort eine allgemeine Übersicht möglich, in welchem wahren Ausmaß in einem Reihenversuch Unterschiede im Infektionsbefall der einzelnen Kollektive auftreten. Diese Beurteilung ist aber nur grob zusammenfassend. Ein Bezug auf die zeitlich verschiedene Entwicklung des Infektionsbefalles in den Kollektiven ist nicht darin enthalten. Um auch in dieser Richtung ein Urteil zu gewinnen, werden die Befunde in eine Punktwertung verändert und diese als Durchschnitts-

wertung der Kollektive umgerechnet und kurvenmäßig niedergeschrieben, so daß in der Abszissenachse die Tage und in der Ordinatenachse die Durchschnittsbewertungen: glatt und leicht krank oder $+ = 1$, krank oder $++ = 2$, schwerkrank oder $+++ = 3$ und tot oder $\dagger = 4$ zu stehen kommen.

Die Möglichkeit, daß ein Therapeutikum die Inkubationszeit hinausschiebt, ohne im Endeffekt auf den Ablauf der Schwere der Krankheit einen Einfluß zu haben, ist nicht nur denkbar, sondern tritt in anderen chemotherapeutischen Modellversuchen häufig auf (Kanarienvogeltest, Tbc.-, Ca.-Versuche). Schon die Kenntnis einer solchen Wirkung kann für die menschliche Therapie von Wichtigkeit sein. Die Zuständigkeit der tierexperimentellen Chemotherapie geht im allgemeinen nicht über eine mehr oder weniger gute Orientierung für die Wirkung am Menschen hinaus, so daß von vornherein nicht vom Tierversuch auf die menschliche Therapie geschlossen werden darf.

Tabelle 4.

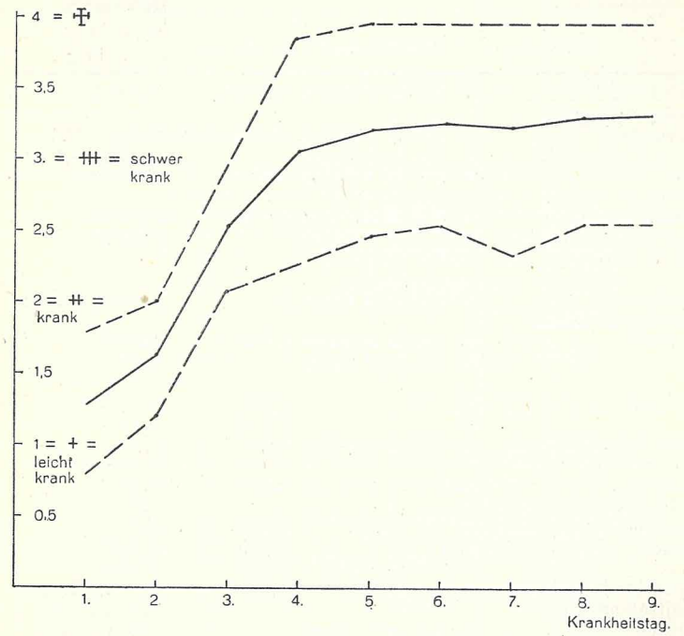
Erkrankungsindizes von 15 Infektionskontrollkollektiven zu je 25 Mäusen. Tagesmittelwerte und ihre Standardabweichungen.

Krankheitstage	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Punktwertung der 15 Infektionskontrollkollektive zu je 25 Mäusen = a	164	152	228	384	296	292	284	—	264
	152	176	256	304	312	308	—	300	—
	104	176	216	284	308	304	—	292	304
	160	—	280	304	300	300	288	—	—
	136	196	244	272	252	—	252	—	—
	—	184	268	308	324	344	344	—	336
	104	144	224	252	264	276	—	268	—
	100	172	284	—	376	368	364	368	—
	116	148	260	316	348	—	—	—	336
	—	148	264	328	364	356	—	340	368
	100	136	256	316	316	324	—	324	—
	160	192	252	360	380	376	—	372	—
	—	—	216	224	308	—	352	344	348
	122	161	252	308	330	—	334	326	321
	120	128	292	344	364	376	380	380	384
	1538	2113	3792	4304	4842	3624	2598	3314	2661
Tagesmittelwert = M	1,28	1,63	2,53	3,07	3,23	3,29	3,25	3,31	3,33
Standardabweichung desselben									
$1\,\sigma = \pm$	0,25	0,21	0,23	0,40	0,38	0,36	0,45	0,37	0,37
$2\,\sigma = \pm$	0,50	0,42	0,46	0,8	0,76	0,72	0,9	0,74	0,74
$M - 2\,\sigma$	0,78	1,21	2,07	2,27	2,47	2,57	2,35	2,57	2,59
$M + 2\,\sigma$	1,78	2,05	2,99	3,87	3,99	4,00	4,00	4,00	4,00

In Tabelle 4 und Kurve 1 ist eine Punktwertung für die Infektionskontrollen durchgeführt. Bei den zwischen 6—8 Tagen schwankenden Inkubationszeiten ist es unangebracht, schematisch nach dem Tag der Infektion zu ordnen. Als Stichtag wird vielmehr der Tag, an dem das Einzelkollektiv zuerst den Mittelwert 2 (++ oder krank) und mehr er-

reicht, gewählt, und alle 15 Infektionskontrollkollektive so zurechtgerückt, daß dieser Stichtag den 3. Krankheitstag ergibt.

Tabelle 4 enthält die zurechtgerückten Tageswerte der einzelnen Kollektive (a), die Mittelwerte der einzelnen Tage (M), ihre einfache und zweifache Standardabweichung (σ). Auf der Kurve 1 sind mit gestrichelten Linien die 2fachen Standardabweichungen



Kurve 1. Zeitlicher Verlauf der Fleckfiebererkrankung bei 15 Infektionskontrollkollektiven zu je 25 Mäusen (vgl. Tab. 4). ——— Kurve der Mittelwerte der Fleckfiebererkrankung. Der 3. Krankheitstag ist der Tag, an dem als Mittelwert des Einzelkollektives zuerst 2 oder mehr erreicht wird. — — — Kurven der 2fachen Standardabweichung der Mittelwerte ($\pm 2\,\sigma$).

der Mittelwertkurve (ausgezogene Linie) eingezeichnet. Hierzu ist für Tabelle 4 nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma\,(a - M)^2}{n - 1}}$$

die mittlere Abweichung vom Mittelwert errechnet, wobei a die Werte der Tabelle 4, M den Mittelwert des jeweiligen Tages und n die Zahl der Kollektive darstellen.

In den Kurventafeln, in denen die einzelnen Chemotherapieversuche aufgezeichnet werden, wird mit gestrichelten Kurven dieser Bereich der 2fachen mittleren Abweichung vom Mittelwert aller Infektionskontrollkollektive begrenzt und als unmittelbarer Bezug die Mittelwertkurve des den jeweiligen Therapieversuchen entsprechenden Infektionskontrollkollek-

Tabelle 5.

Geprüfte Substanzen, deren Toxizitätsdosen und chemotherapeutische Wirkung.

Substanz	Darreichung	Dos. toxica minima in g	Dos. tolerata maxima bzw. gebrauchte Dosis in g	Bemerkungen: — = ohne Erfolg. +? = besser als entsprechende Infektionskontrollen, wohl ebenfalls ohne Erfolg, da ungesichert
1. Acaprin	iv. 2× in 3 Tagen	0,00006	0,00005	—
2. Kal. antimonyltartrat (Brechweinstein)	iv. 2× in 3 Tagen	0,0015—0,001	0,001—0,003	+?
3. wie vor + Kaliumjodid	iv. 3× in 5 Tagen		0,0003+0,0003	—
4. Kollargol	iv. 5× in 6 Tagen	0,0001	0,00005	—
5. Argochrom (Methylenblau-Silber)	iv. 3× in 5 Tagen	0,0003	0,00025	—
6. Arsen-Antimon-Verbindung Sdt. 386 B (I.G.)	sc. 3× in 3 Tagen +1× ½ Dosis am 5. Tag	—	0,00133	+?
7. Azoarsinsäure	iv. 2× in 3 Tagen	—	gesättigte Lösung	—
8. 4-Cetylamino-azobenzol-4′-arsinsäure	sc. 4× in 5 Tagen	0,002	0,0013	—
9. Solarson	iv. 2× in 3 Tagen	—	0,0005	—
10. Neosalvarsan	iv.	0,004	0,0035	—
	sc.	0,0025	0,002	
11. Atophanyl intravenosum	iv.	0,1	0,0667	—
12. β-Auro-mercapho-α-amino-propionsäure	iv.	0,004	0,002	—
13. p-Acetylamino-rhodanbenzol	sc.	—	0,001—0,0004	—
14. Hydrochlorid des 2-Amino-benzthiazols	sc.	0,1—0,02	0,02	+?
	p.os	0,005	0,0033	+?
	iv.	0,005	0,0033	—
15. 2-Acetylamino-benzthiazol	sc.	0,02	0,013 Spätnekros.	—
16. Cäsiumnitrat an Meerschweinchen	sc. 6× in 6 Tagen	—	0,05 g pro 350 g Meerschweinch.	—
17. Cäsiumsulfat	iv.	—	0,01	—
18. Cerisulfat	iv.	0,001	0,0008	—
19. Ceronitrat	iv.	0,01	0,001	—
20. Chaulmoograsaures Na	iv.	—	0,002 leichte Krämpfe	—
21. Mercuriazetat-chaulmoogryl-thiolat in Ol. oliv.	sc. 4× in 6 Tagen	0,005	0,001	—
	p.os 4× in 6 Tagen	0,001	0,0005	
22. Dimethyl-benzyl-chaulmoogryl-ammonium-bromid (Zephirol-Verbindung)	sc.		0,0002	—
	iv.	0,00015	0,0001	
23. Chaulmoogroyl-cholin-jodid	sc.	0,005	0,002	+?
24. Trimethyl-chaulmoogryl-ammonium-jodid	sc.	0,0001	0,00005	—
	p.os		0,001	
25. Chaulmoogroyl-cholin-rhodanid	sc.	0,01	0,005	+?
	iv.	0,005	0,001	
26. Triäthyl-chaulmoogroyl-äthyl-ammonium-rhodanid	sc.	0,01	0,005	—
	iv.	0,001	0,0005	+?
	3×		0,0004	
27. Chininhydrochlorid	iv.	0,002	0,0001	—
29. Chinosol in ol. oliv.	sc.	0,001	0,0008—0,0006	—
	iv.	0,0012	0,0008	—
Atophanyl, Plasmochin, Yatren	s. dort			
30. Eucupin	iv.	0,001—0,0006	0,0005	—

Tabelle 5 (Fortsetzung).

Substanz	Darreichung	Dos. toxica minima in g	Dos. tolerata maxima bzw. gebrauchte Dosis in g	Bemerkungen: — = ohne Erfolg. +? = besser als entsprechende Infektionskontrollen, wohl ebenfalls ohne Erfolg, da ungesichert
31. α-oxy-cinnamyl-phosphorsaures Na	iv. 2× in 3 Tagen	0,0033	0,002	—
32. Triäthyl-cinnamoyl-oxy-äthyl-ammonium-jodid	sc. 5× in 7 Tagen	0,0005	0,00033—0,0002	—
33. Triäthyl-cinnamoyl-oxy-äthyl-ammonium-rhodanid	iv. 2× in 3 Tagen	0,0002	0,00014	+?
34. N-Cinnamyl-thiocarbamidsäure-S-cinnamylester in ol. oliv.	p.os 5× in 6 Tagen	0,02	0,01	—
35. Clupein	iv.	0,005	0,002	—
36. Colchicin	iv. 2× in 3 Tagen	0,00001	0,000005	—
	sc.	0,00002	0,00001	
37. Cu kolloidales	iv. 3× in 4 Tagen	—	0,00006	—
38. Emetin	iv.	0,00028	0,00025	+?
	sc.		0,0005	
39. Na-Salz der Cyclohexyl-nonyl-essigsäure	sc.	—	0,002	—
andere Fettsäuren s. Chaulmoograverbindungen und Cinnamylverbindungen				
40. Germanin	iv. 2× in 3 Tagen	0,0067	0,005—0,004	—
41. Hydrargyrum oxycyanat.	iv. 3× in 5 Tagen	0,00002—0,0001	0,00002	—
42. Hydrargyrum + Kongorot	iv. 2× in 3 Tagen	0,00002+0,005	0,00002-0,000005 +0,0005	—
43. Formicin	iv. 2× in 3 Tagen	0,00002	0,0000167	—
44. β-Indolcarbonsäure	iv.	—	0,016	—
45. Kaliumjodid	iv. 3× in 4 Tagen	0,01	0,005	+?
46. Kaliumpermanganat	iv. 3× in 5 Tagen	—	0,0004	—
47. Kongorot	iv.	0,0075	0,005	—
	sc.		0,010—0,005	—
48. Methylenblau s. a. Argochrom	iv. 3× in 5 Tagen	—	0,001	—
49. Nucleotrat (Nordmark) Originallösung	sc.	0,05	0,02—0,0133	—
50. Osmiumsäure-diester des Pinakons	sc.	0,0005	0,00025	+?
51. Tetramethyläthylen — OsO_4	sc.	0,002	0,001	—
	iv.	0,00025	0,0002	—
Oxydationsmittel s. Kaliumpermanganat, Porphyrexid				
52. β-Octylphenol	p.os.	0,00004	0,00002	—
	sc. 4× in 8 Tagen	0,00067—0,00033	0,00067—0,00033	—
53. Plasmochin	iv.	0,0003	0,00015	—
54. Porphyrexid	iv.	0,001	0,0005	—
	sc.		0,040	—
55. Prontosile s. Tab. 6				
56. Rhodanverbindungen s. Chaulmogra- + Cinnamylverbindungen				
57. Rubidiumsulfat	iv. 2× in 3 Tagen	0,01	0,001	+?
58. Sdt. 386 B s. Arsen-Antimon				
59. Strontium jodatum	iv.	0,0166	0,0133	—
60. Tryparosan	iv.	0,0005	0,0004	—
	sc.	0,004	0,0028	+?
61. Undecylensaures Na	iv. 2× in 3 Tagen	0,001	0,00067	+?

Tabelle 5 (Fortsetzung).

Substanz	Darreichung	Dos. toxica minima in g	Dos. tolerata maxima bzw. gebrauchte Dosis in g	Bemerkungen: — = ohne Erfolg. + ? = besser als entsprechende Infektionskontrollen, wohl ebenfalls ohne Erfolg, da ungesichert
62. Undecylensäureester	sc.	0,05	0,05	—
63. Uranylnitrat	iv.	—	0,001	—
64. Uliron s. Tab. 6				
65. Viktoriablau	iv. 3× in 5 Tagen	0,02	0,0167	—
66. Viktoriablau + Plasmochinrest	iv.	0,00004	0,00003	—
67. Nitroso-Viktoriablau gesättigte Lösung	iv.	0,2	0,1	—
68. Vitamin C	iv. 5× in 10 Tagen	—	0,005	—
	sc. 2×	—	0,01	
69. Yatren	iv.	—	0,015	—
70. Zephirol (s. a. Chaulmoogra- u. Cinnamylverbindungen) .	sc. 5× in 9 Tagen	0,01	0,0067	—
71. p-Amino-Zimtsäure	iv.	—	0,01	—

tives eingezeichnet, so daß in dem Ausmaß der Kurvenabweichung von beiden sofort die Bedeutung etwaiger therapeutischer Erfolge übersehen werden kann. Eine Auswahl dieser Protokollkurven sind im Anhang gegeben.

Geprüfte Substanzen und ihre Toxizitätsdosen.

Eine wichtige Vorarbeit bei chemotherapeutischen Versuchen ist die Feststellung der Dosis toxica minima und Dosis tolerata maxima und danach die Festsetzung der Dosis therapeutica der einzelnen Präparate und die der möglichen Applikationsarten. Um gewisse Grundsätze in der Darreichung und Dosierung einzuhalten, war eine Beschränkung notwendig; so wurde als Dosis therapeutica immer die Dosis tolerata maxima bei mehrmaliger Applikation gegeben; ferner wurde später möglichst danach gestrebt, sowohl iv., wie sc., wie auch per os zu applizieren. Da keine Substanz die Fleckfieberinfektion der Maus eindeutig beeinflußte, ist die Angabe einer kurativen Dosis und eines therapeutischen Index natürlich unmöglich.

In Tabelle 5 seien alle geprüften Substanzen hinsichtlich ihrer Dos. tox. min. und Dos. tol. max. nach mehrmaliger Darreichung aufgeführt, und zwar immer für die weiße Laboratoriumsmaus, berechnet auf 1 ccm für das 20 g-Tier, wobei bemerkt sei, daß das Gewicht unserer Mäuse immer zwischen 12 und 16 g schwankte, diese also einen recht gleichartigen Alterszustand aufwiesen.

Bei der Eigenart des Infektionsablaufes des Mäusefleckfiebers, 6—8 Tage Inkubation, Tod nach 1—3tägiger Krankheit (5 Tage Kranksein bei den durchkommenden Tieren), ist es notwendig, die Therapie in die Inkubationszeit zu legen. Nicht nur die Kürze und Schwere der akuten Krankheit,

sondern auch die hohe Gefahr der Laboratoriumsinfektion legen dies nahe. Teilweise wurde die Behandlung sogar vor der Infektion begonnen, immer aber am 1. oder 2. Krankheitstag des Kollektives beendet.

Chemotherapeutische Untersuchungen.

Bei der Durchsicht der Literatur nach therapeutischen Hinweisen, die wenigen sind weiter vorn zusammen aufgeführt, fiel als ältester eine Mitteilung von A. Penafiel (33) an, der Chinosol in 1—2 g-Dosen pro die als bestes Antipyretikum angibt. W. Priewe (36) fand diese Substanz bei einer anderen Viruskrankheit, der Pferdebrustseuche, in späteren Krankheitsstadien als dem Neosalvarsan überlegen, von Trautwein (48) werden Chinoline bei Maul- und Klauenseuche als wirksam bezeichnet. Zum Chinosol (Oxychinolin) gehören als nahe Verwandte die Chinoline und bekannten Therapeutika Atophan, Yatren und Plasmochin. Vom Atophan wird von Starkenstein und Zitterbart (43) eine gut therapeutische Wirkung bei Flecktyphus behauptet. Bei der Chinolingruppe haben W. Heubner und seine Mitarbeiter eine protrahierte Steigerung des Stickstoffwechsels, besonders beim kranken Tier (9, 10), und schließlich auch eine 2—3fache Agglutinintitersteigerung (50) festgestellt. Chinosol, Yatren, Plasmochin und Atophan bleiben beim Fleckfieber ohne jede therapeutische Wirkung, ebenso auch Chininsulfat und Hydrochlorid, das auch schon von Otto und Papamarku (30) an Meerschweinchen als unwirksam befunden wurde. Hier seien noch die Angaben einer therapeutischen Wirkung des Optochins erwähnt (20, 14, s. dagegen Otto u. Papamarku im Meerschweinchenversuch).

Während des Weltkrieges hatten einige praktische Therapeuten festgestellt, daß Silberpräparate zumindest die Temperatur und den typhösen Zustand, dann aber auch den Krankheitsausgang günstig beeinflußten, dagegen sahen einige Autoren von kolloidalem Silber keine Vorteile, oder Ärzte, die Silber empfohlen hatten, sahen später anderes als günstig an (5, 11, 42, 44, 46). Auch im Tierversuch beim Meerschweinchen waren die Meinungen geteilt. Reimann (38) blockierte erfolgreich das R.E.S. gegen Flecktyphus, das gelang ihm allerdings auch mit Na-Chaulmoograt und Trypanblau. Chinesische Tusche wirkte sogar am besten. Breinl und John (3) behandelten mit $AgNO_3$ erfolgreich, während Otto und Papamarku (30) mit Argoflavin nichts erreichten. Nun, auch im Mäuseversuch waren Kollargol und Argochrom (Methylenblau-Silber) ohne jeden Einfluß.

Von neueren Angaben guter therapeutischer Effekte verdienen besonders Erwähnung die von F. Veintemillas (La Paz) (49), der über für Flecktyphusarbeiten recht große Krankenzahlen berichtet. Die in Argentinien üblichen Behandlungen mit Urotropin, Hg-bijodid, Hg-cyanid, Hg-chromat und Kupfersulfat gaben ihm keinen Erfolg. Er hatte bei 827 Kranken 26 % Todesfälle. 5—10 ccm 1%ige Brechweinstein- und

Jodkalilösung iv. gegeben, drückte die Todesfälle bei 176 Kranken (nach einer ersten Veröffentlichung) auf 16 %, bei weiteren 500 so behandelten Erkrankungen auf 10 %. Die Infektion wird 10—12 Tage verkürzt und das Fieber zum Teil sofort kritisch oder zum Teil nach mehrmaligem Behandeln lytisch gesenkt. Zu berücksichtigen ist aber dabei die rassische Zusammensetzung der Kranken, da Indianer sowieso nur 10 % Todesfälle gegen 50 % der Weißen haben. Weder Brechweinstein oder Jodkali allein, noch beides in Kombination gegeben, hatten irgendeinen Einfluß in unseren Prüfungen. Schon Nicolle und Conseil (25) gaben Brechweinstein ohne Erfolg beim Flecktyphus in Tunis.

Auch die nach Piston und Bucco (1936) wirksame Mischung von 1%igem Hg-oxycyanat mit 0,5%iger Kongorotlösung im Verhältnis von 2 : 1 ist im Mäuseversuch ohne jeden Erfolg gewesen — Mühlens (24) erschien Sublimat und Novasurol von gewissem Einfluß —, und schließlich ist auch das von Teuent (1936) (45) empfohlene Atebrin, das die Z.N.S.-Symptome günstig beeinflussen soll, ohne Wirkung geblieben.

Von in Tierversuchen als wirksam befundenen Chemikalien ist von mir in einer früheren Arbeit bereits berichtet worden, daß die von Breinl und John empfohlenen Rubidium- und Cäsiumsalze unwirksam sind. Auch im Mäuseversuch gaben sie keinen Erfolg. In der Tabelle 5 sind im einzelnen Cäsiumnitrat und -sulfat, Cerinitrat und Cerosulfat, Strontiumjodid und Rubidiumsulfat, das die Inkubationszeit um 1 Tag verlängerte, aufgeführt.

Die Prüfung der therapeutischen Eignung bei unserer Krankheit erstreckte sich auch allgemein auf wohlbekannte Chemotherapeutika, und besonders auf bei Viruskrankheiten empfohlene Substanzen. Arsenikalien, von denen im Anfang der Salvarsanära Gutes erhofft und zum Teil auch gesehen wurde, haben sich als völlig unwirksam erwiesen. An Mäusen wurden Neosalvarsan, einige Arsinsäure-Verbindungen[1]) und eine von der I.G.-Farben Elberfeld freundlichst zur Verfügung gestellte Arsen-Antimon-Verbindung Sdt. 386 B, deren gute Wirkung bei Bartonellenerkrankung der Ratten von Kikuth (12) festgestellt wurde, als völlig unwirksam befunden. Ebensowenig vermochten Acabrin, Auro-Verbindungen, Clupein, Colchicin, Emetin, Germanin, Tryparosan etwas auszurichten.

Außer der Salvarsanwirkung bei der Pferdebrustseuche ist uns von einer Substanzengruppe eine Wirkung auf Viruskrankheiten als zum Teil sicher, zum Teil als wahrscheinlich bekannt, von den Prontosilen[2]). Als sicher gilt die Heilwirkung von Prontosilen (vor allem Prontosil album) bei dem Lymphogranuloma inguinale, sowohl im Tierversuch als auch in der klinischen Behandlung (1), bei dem Herzwasser einer tierischen

1) Von Herrn Dr. Burschkies (Forschungsinstitut für Chemotherapie) mir überlassen.

2) Diese Prontosile wurden Herrn Geheimrat Otto von Herrn Professor Kikuth zur Verfügung gestellt.

Rickettsiose (13) und bei dem Trachom, während die günstigen Ergebnisse bei Choriomeningitis der Mäuse und bei der Hundestaupe nicht zu wiederholen waren (Zusammenstellung s. bei Bär). Eine von McKinley, Meck und Acree (19) gefolgerte Unwirksamkeit von Prontosil bei Kaninchenfibrom wird durch ihre Protokolle nicht nur nicht belegt, sondern die Ergebnisse 5/11 positive Tumoren bei mit Prontosil behandelten Kaninchen gegen 16/18 bei den Kontrollen legen sogar das Gegenteil, eine günstige Beeinflussung nahe.

Die positiven Ergebnisse einer Prontosiltherapie bei dem Herzwasser sowie neuerdings bei den von einigen Autoren den Rickettsiosen zugerechneten Trachom und Lymphogranuloma inguinale ließen für das Fleckfieber auch eine Wirkung erhoffen. Leider waren von 24 verschiedenen Prontosilen der I.G.-Farben Elberfeld in meinen Prüfungen (s. Tabelle 6 und Kurven) 23 ohne Wirkung. Auch Topping (47) hatte 1939 mit Prontosil und Sulfapyridine bei R.M.S.F. und Rickettsia mooseri-Infektionen bei Meerschweinchen keinen Erfolg.

Von den 6 geprüften Azoprontosilen war aber eines in einem Versuch von ausgesprochener, statistisch gesicherter Wirkung; s. Tab. 6, 3; 7, 2 und Kurve 4, 5, 6. Von 25 Mäusen des Kollektives der Infektionskontrolltiere gingen 22 ein, von 24 Mäusen des Kollektives 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure 1/50 (Dos. tol. max.) per os hingegen nur 6; bemerkenswerterweise nutzte im gleichen Reihenversuch das gleiche Präparat 1/200 (Dos. tol. max.) sc. nichts. Die Infektion war ausgesprochen stark. In den Kontrollreihen mit fallenden Infektionsdosen gingen sämtliche 3 Mäuse mit 0,25 ccm 1/20000 und 1/200000 Gehirn und eine der 3 mit 0,25 ccm 1/2000000 ip. infizierten an dem Fleckfieber ein, und es ließen sich Rickettsien nachweisen. Entsprechend dem hohen Titer des Infektionsmaterials liegt die Kurve ihrer Mittelwerte und die der übrigen in diesem Reihenversuch erfolglos behandelten Kollektive mit einer Ausnahme in dem oberen Teil des Bereiches der 2fachen Standardabweichung vom Mittelwert aller Infektionskontrollen. Die Mittelwertkurve des Kollektives mit der günstigen Behandlung befindet sich trotzdem noch zum Teil außerhalb der 3fachen Standardabweichung aller Infektionskontrollen. Die Sicherung des Versuchsergebnisses aufgezeigt an der Häufigkeit, mit welcher der mittlere Fehler der Differenz zwischen den †-Zahlen des Infektionskontrollkollektives (22/25) und des in Frage stehenden Kollektives (6/24) in dieser Differenz enthalten ist, beträgt:

$$\frac{\text{Differenz}}{m_{\text{Diff.}}} = 4{,}455$$

$$\left(m_{\text{Diff.}} = \sqrt{\frac{p(100-p)\,(n_1+n_2)}{n_1 \cdot n_2}}\right.$$, die bekannte Formel für diese Zwecke[1])).

1) Neuerdings hat H. v. Schelling eine verbesserte mathematisch völlig einwandfreie Formel für derartige Berechnungen angegeben. Die von mir benutzte Formel nach Erna Weber gibt aber auch nach seinen Untersuchungen zuverlässige Werte; er berechnet im vorliegenden Falle 4,455 statt 4,409.

Tabelle 6.
Chemotherapeutische Wirkung prontosilartiger Verbindungen.

Substanzen	Darreichung	Dosis tolerata max. bzw. gebrauchte Dosis in g	Behandlungserfolg *)
A. Sulfonamid-Azo-Verbindungen			
1. Prontosil rubrum . .	sc.	0,0125	+ ?
	per os 3× in 4 Tagen	0,015	+ ?
2. Prontosil solubile . .	iv.	1/100	—
	sc.	1/10	—
	per os	1/5	—
3. 4′-Sulfonamid-2,4-diamino-azobenzol-6-carbonsäure	sc. 4× in 5 Tagen	0,005	—
	per os 5× in 6 Tagen	0,02	+
4. Kl 695	sc. 4× in 5 Tagen	0,0033	+ ?
5. Kl 848	per os 4× in 5 Tagen	0,1	—
6. Kl 1229	sc. 3× in 3 Tagen	0,0033	+ ?
	per os 4× in 5 Tagen	0,01	+ ?
B. Sulfanilamid-Verbindungen			
7. Prontosil album . . .	sc.	0,04	+ ?
8. Benzylsulfanilamid . .	sc. 2× in 4 Tagen	0,03	—
9. γ-Phenylpropyl-sulfanilamid—α,γ-disulfosaures Natrium	per os 2× in 3 Tagen	0,2	—
10. Sulfanilsäure-p-aminoanilid	per os 2× in 3 Tagen	0,075	—
11. p-Aminobenzyl-sulfanilamid	sc. 2× in 4 Tagen	0,03	—
12. Astrosol	sc. 2× in 4 Tagen	0,1	+(?)
13. Sulfanilsäure-p-diäthyl-aminoanilid . .	sc. 2× in 3 Tagen	0,1	—
14. Be 365	sc.	0,04	+ ?
	per os	0,02	+ ?
15. Be 451	sc. 2× in 4 Tagen	0,04	—
16. Be 701	sc.	0,033	—
	per os	0,033	—
17. Be 704	sc. 2× in 4 Tagen	0,04	—
18. M 965	sc. 2× in 4 Tagen	0,005	—
19. M 1152	per os 2× in 2 Tagen	0,066	—
20. M 1182	iv.	0,02	—
	sc.	0,033	—
	per os	0,2	—
21. M 1187	sc.	0,05	+ ?
C. Disulfanilamid-Verbindungen			
22. Uliron	sc.	0,02	+ ?
	per os 3× in 4 Tagen	0,05—0,025	—
23. Neo-Uliron	sc.	0,01	+ ?
	per os	0,04	+ ?
D. Sulfon-Verbindung			
24. P 992	per os	0,1	—

*) + = gesicherter Behandlungserfolg.
+ ? = ungesicherter Behandlungserfolg, behandeltes Tierkollektiv hat geringere Absterbe- und Erkrankungszahlen als das Infektionskontrollkollektiv.
— = gleiches oder schlechteres Erkrankungsverhältnis als bei den Infektionskontrollen.

Da bei der Durchführung des Versuches eine gleichmäßige Infizierung gewährleistet war, muß in diesem Versuch eine therapeutische Beeinflussung

erfolgt sein. Leider ließ sich die Eindeutigkeit dieses Ergebnisses in insgesamt noch 15 Wiederholungen nie reproduzieren, immerhin gaben aber 9 mehr oder weniger genaue Wiederholungen in einer Zusammenfassung noch eine Sicherung des positiven Befundes.

In Tabelle 7 sind die Versuche mit 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure zusammengefaßt. Nur Versuch 2 spricht eindeutig für eine therapeutische Wirkung. Von den 9 als Wiederholungen zu wertenden Versuchen (3—11) verhalten sich 6 mehr oder weniger besser als die jeweiligen Infektionskontrollen, 2 verhalten sich gleich und nur einer (9) bringt ein um 1—2 Tiere schlechteres Verhältnis von † und schwerkrank zur Gesamttierzahl als die zugehörigen Kontrollen. Bei einer völligen Nutzlosigkeit des Präparates müßte man erwarten, daß in 10 Versuchen ebenso viele Kollektive sich schlechter wie besser als das jeweilige Infektionskontrollkollektiv verhalten.

Eine rechnerische Zusammenfassung der 10 mit dem Präparat per os behandelten Tierreihen ergibt, daß von 239 Mäusen 107 schwerkrank waren, davon gingen 88 ein, und daß von den 240 Infektionskontrollen 139 schwerkrank waren, wovon 122 eingingen. Bei einer Errechnung der Versuchssicherheit der Differenzen ergibt sich, daß die Unterschiede zwischen † und schwerkrank bei behandelten und nicht behandelten Mäusen 2,88mal und bei den † allein 3,09mal den einfachen mittleren Fehler übersteigen.

Die Zusammenfassung ist nicht völlig einwandfrei, weil verschiedene Infizierungsstärken (0,25 ccm 1/2000 bis 1/200000 Gehirn ip.) und entsprechend besonders stark verschiedene Krankheitsbefallprozente zusammenkommen. Jedoch ist einer unreellen Verbesserung der Ergebnisse dadurch abgeholfen, daß für jedes behandelte Kollektiv sein entsprechendes Infektionskontrollkollektiv aufgeführt ist, auch dann, wenn dasselbe mehrmals erscheint. Eine Zusammenfassung scheint durchaus erlaubt, wenn beiden zu vergleichenden Seiten in gleichem Maße Vor- und Nachteile durch die Art der Zusammenfassung zugeführt werden.

Es läßt sich im ganzen mit einiger Sicherheit sagen, daß das Azoprontosil 4′-Sulfonamid-2,4-diamino-azobenzol-6-carbonsäure in peroraler Darreichung das Mäusefleckfieber in geringem Ausmaß günstig beeinflußt, und daß eine Anwendung bei der menschlichen Krankheit wohl zu versuchen wäre.

Um die geringe Wirkung zu verstärken, und um doch vielleicht die Wirkung des ersten Versuches zu erreichen, wurde eine Kombinationsbehandlung mit spezifischen Immunsera und mit Nucleotrat, einem Präparat, welches auf das leukopoetische System einwirkt, durchgeführt. Auch in dieser Kombination war der therapeutische Einfluß des Präparates nicht zu verbessern.

Da in unserem Institut für die Chemotherapie der Lepra vor allem Chaulmoogra- und Cinnamylverbindungen synthetisiert werden, standen eine große Reihe derartiger neuer Substanzen zur Verfügung, die

Tabelle 7. Die Wirkung von 4′-Sulfonamid-2,4-diamino-azobenzol-6-carbonsäure beim murinen Fleckfieber der weißen Maus.

Dosis	Anwendung: Art	Anwendung: am (— = Tag vor, 0 = „ der, + = „ nach) Infektion	Infektion mit Mäusegehirn und Inf.-Stärke	Schwerkrank und † Kollektivzahl	† Kollektivzahl	Erfolg [1])	Infektionskontrollen: Schwerkrank und † Kollektivzahl	Infektionskontrollen: † Kollektivzahl
1. 1/200	sc.	—1±0+1+3	0,25 ccm 1/2000 mehr als 1000fache Dosis inf. min.	22/24	21/24	—	22/25	22/25
2. 1/50	per os	—1±0+1+3	„	11/24	6/24	+	22/25	22/25
3. 1/50	„ „	—1±0+1+3+7	0,25 ccm 1/2000 = 100fache Dosis inf. min.	20/25	20/25	—	20/23	17/23
4. 1/100	„ „	—1±0+1+3	0,25 ccm 1/200000 Grenzinf.-Dosis!	6/25	4/25	+?	9/23	9/23
5. 1/100	„ „	—1±0	dgl.	9/25	9/25	+?	9/23	9/23
6. 1/500	„ „	—1±0+1+3	„	7/23	7/23	+?	9/23	9/23
7. 1/50	„ „	—1±0+1+3+6	0,25 ccm 1/20000 Grenzinf.-Dosis	11/25	8/25	+?	13/25	12/25
8. 1/50 wie vor, aber in NaOH gelöst	„ „	—1±0+1+3+6	dgl.	14/24	11/24	—	13/25	12/25
9. 1/50	„ „	+1+2+4	0,25 ccm 1/2000 Grenzinfektion (große Hitze!)	13/25	13/25	—	12/25	11/25
10. 1/100	„ „	+6+7+9	0,25 ccm 1/200000 Grenzinf.-Dosis	7/24	4/24	+?	9/23	9/23
11. 1/50	„ „	+5+6+7+8+10	0,25 ccm 1/20000 Grenzinf.-Dosis	9/19	6/19	+?	13/25	12/25
1/100	„ „	+7½+8½						
12. 1/50	„ „	+1+2+3+5+6	dgl.	16/23	5/23	(+)	15/25	13/25
+ Mee.-Serum sc.[2])		+1+2+3+5+6						
Mee.-Serum allein[2])		+1+2+3+5+6	dgl.	9/13	4/13	(+)	15/25	13/25
13. 1/50	per os	+1+2+3+5	0,25 ccm 1/2000 100—1000fache Dosis inf. min.	10/25	9/23	(+)	24/25	23/25
+ Mee.-Serum sc.[2])		+1+2+3+5						
Mee.-Serum allein[2])		+1+2+3+5	dgl.	5/25	5/25	(+)	24/25	23/25
14. 1/50	per os	+1+2+4	0,25 ccm 1/2000 Grenzinf.-Dosis (Große Hitze!)	11/25	9/25	(—?)	12/25	11/25
+ Mee.-Serum sc.[2])		+1+2+4						
15. 1/50	per os	+1+2+4	dgl.	12/25	6/25	(—?)	12/25	11/25
+ Mee.-Serum sc.[3])								
16. 1/50	per os	+2+3+4+5+6+7	0,25 ccm 1/20000 Grenzinf.-Dosis	18/18	15/18	(—)	15/25	13/25
+ Nucleotrat sc.		+2+3+4+5+6+7						
Nucleotrat allein		+2+3+4+5+6+7	dgl.	15/17	9/17	(—)	15/25	13/25
17. 1/50	per os	+2+3+4+5+7	0,25 ccm 1/2000 100—1000fache Dosis inf. min.	25/25	25/25	(—)	24/25	23/25
+ Nucleotrat sc.								
Nucleotrat allein		+2+3+4+5+7	dgl.	24/25	24/25	(—)	24/25	23/25

1) — = ohne Erfolg, + = erfolgreich, +? = ungesicherter Erfolg, ( ) = Kombinationsbehandlung.
2) Serum von rekonvaleszenten, mit Rickettsia mooseri infizierten Meerschweinchen.
3) „ „ „ „ „ prowazeki „ „

natürlich auch an anderen als säurefesten Bakterieninfektionen zu prüfen sind. In Tabelle 5 sind die verschiedenen Verbindungstypen, vor allem Zephirole und Rhodanide, aufgeführt. Sie waren alle ohne Erfolg.

Auch von Oxydationsmitteln, wie Formicin, Kaliumpermanganat und Porphyrexid, war nichts Günstiges zu erhalten. Viktoriablau und eine Viktoriablau-Plasmochin-Verbindung, die ebenfalls von der chemotherapeutischen Abteilung (Professor Wagner-Jauregg) stammen, waren leider ohne Wirkung, und schließlich wurden auch erfolglos 2 Osmiumpräparate, 2 Benzthiazole und einzelne andere Substanzen, die aus Tabelle 5 zu ersehen sind, angewendet, wenn man von einzelnen, eingetretenen Inkubationszeitverlängerungen absieht (s. Kurve 2).

Unspezifische und spezifische Behandlung mittels Sera.

Es bleibt nur noch nebenbei hinzuzufügen, daß auch versucht wurde, mit dem Mäusemodellversuch die bekannte unspezifische Therapie des Fleckfiebers zu prüfen und einen Überblick über die Möglichkeiten einer Serotherapie zu gewinnen. Normales Pferdeserum, das früher vielfach angewandt wurde (37), war ohne jeden Erfolg, ebensowenig wurde der Infektionsbefall durch eine langdauernde Vitamin-C-Vorbehandlung verringert. Gute Erfolge haben aber jeweils Gaben von Meerschweinchenimmunsera gezeigt, wie aus Kurven 5 und 6 zu ersehen [vgl. Befunde von Weil u. Breinl, Doerr u. Pieck, Otto u. Munter[1]) (28)]. Von 25 Mäusen gingen nach Meerschweinchenimmunserumbehandlung nur 5 ein, während von den 25 Kontrollen 23 Mäuse eingingen. Diese Ergebnisse lassen sich gut wiederholen. Doch wird hierüber weiteres zu arbeiten sein.

Zusammenfassung.

Es wird eine Modellversuchsanordnung für chemotherapeutische Arbeiten mit murinem Flecktyphus (Rickettsia mooseri) und die Aufarbeitung der Befunde beschrieben.

67 verschiedenste Substanzen, bekannte oder für Flecktyphus empfohlene Chemotherapeutika darunter, sind ohne jeden Erfolg geprüft worden. Weiterhin wurden 24 verschiedene Prontosile geprüft.

Von diesen hat nur ein Azoprontosil, 4′-Sulfonamid-2,4-diamino-azobenzol-6-carbonsäure, bei peroraler Verabreichung in einem Versuch einen statistisch gesicherten deutlichen Einfluß, das zwar in 9 weiteren Wiederholungen nur einen geringen, im Einzelversuch ungesicherten, in der Zusammenfassung aller Versuche aber ebenfalls gesicherten Einfluß erkennen ließ. Damit läßt sich wohl eine Erprobung des Präparates im Versuch an kranken Menschen begründen, zumal da die Therapie des Flecktyphus bislang im allgemeinen nur rein symptomatisch geführt werden kann.

1) Otto und Munter fanden auch Menschenrekonvaleszentenserum wirksam im Tierversuch; besonders bei gleichzeitiger Anwendung von Serum und Trypaflavin glauben sie einen günstigen Einfluß gesehen zu haben (28).

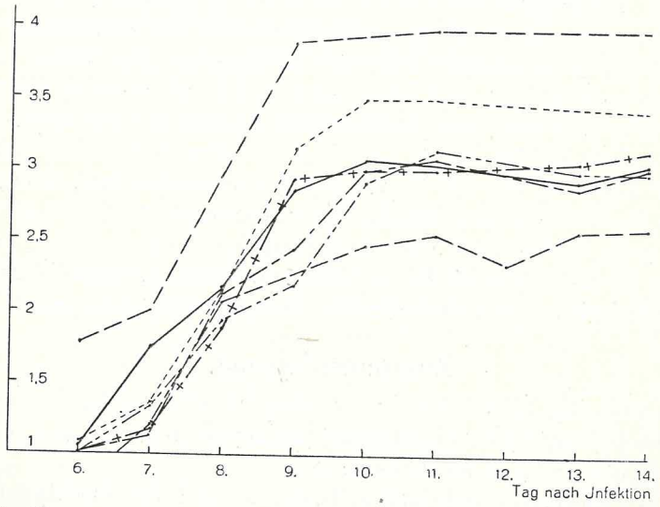
Anschließend wird gezeigt, daß eine unspezifische Therapie mit Pferdenormalserum bei den Mäusen ohne Erfolg, eine Therapie des Mäusefleckfiebers mit Meerschweinchenimmunserum aber von sehr guter Wirkung ist, womit die Möglichkeiten einer Serumtherapie des Flecktyphus erneut gesichert erscheinen.

Bemerkungen zu den nachfolgenden Kurven.

In den Kurven 2—6 sind einige Reihenversuche im Auszug dargestellt. In der Abszissenachse bedeuten

1 = nicht oder leicht krank.
2 = krank.
3 = schwerkrank.
4 = †.

Es handelt sich bei jeder Linie um Kollektive zu 25 Mäusen. Die beiden langgestrichenen Linien sind die Grenzen der 2fachen Standardabweichung, errechnet aus dem Verhalten von 15 einzelnen Infektionskontrollkollektiven.



Kurve 2. Chemotherapieversuch I, 160—168. Infektion: 0,25 ccm 1/2000 Mäusegehirnemulsion ip. = einfache Infektionsdosis. ——— Infektionskontrollkollektiv. — — — 2fache Standardabweichung der allgemeinen Fleckfieberinfektion bei Mäusen. - - - - - - Tetramethyläthylen-OsO_4 0,0002 g iv. am 5. Tag nach Infektion. — - — Tetramethyläthylen-OsO_4 0,001 g sc. am 2. Tag nach Infektion. — - - - — Osmiumsäurediester des Pinakons 0,00025 g sc. am 2. Tag nach Infektion. — + — Kongorot 0,01 g sc. am 2. Tag nach Infektion.

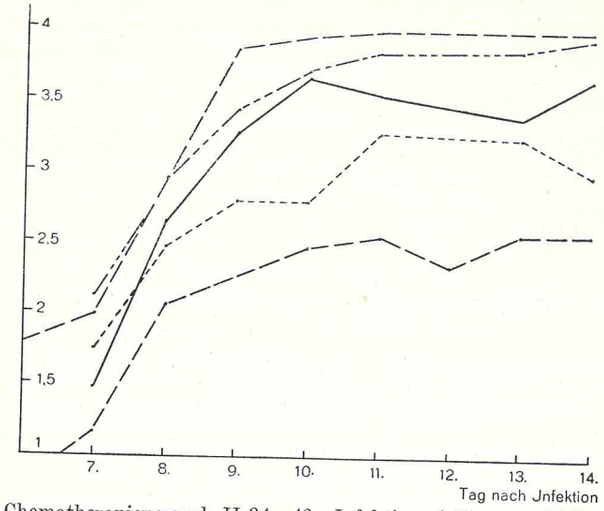
Kurve 2 zeigt Präparate, welche die Inkubationszeit um einen Tag herausschieben. Rubidiumsulfat verhielt sich ähnlich.

Kurve 3 zeigt eine gewisse ungesicherte Wirkung der Sulfanilamidverbindung Astrosol.

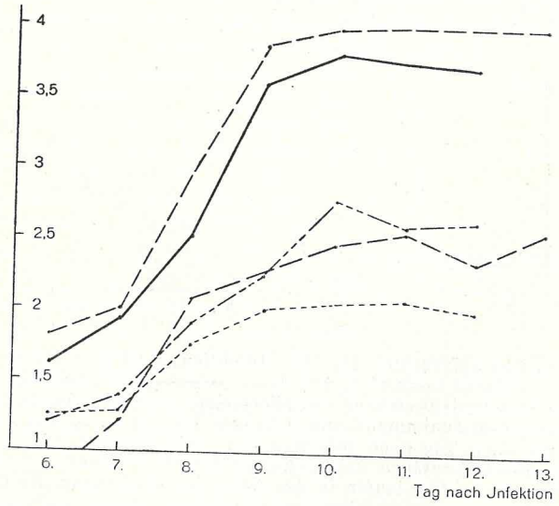
Kurve 4 zeigt die Wirkung der im Text eingehend behandelten 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure und des Chaulmoogroylcholinjodid, dessen Einwirkung hier ungesichert, auch nicht zu wiederholen war.

Kurve 5 und 6 zeigen die Wirkung des Serums von fleckfieberimmunen Meerschweinchen.

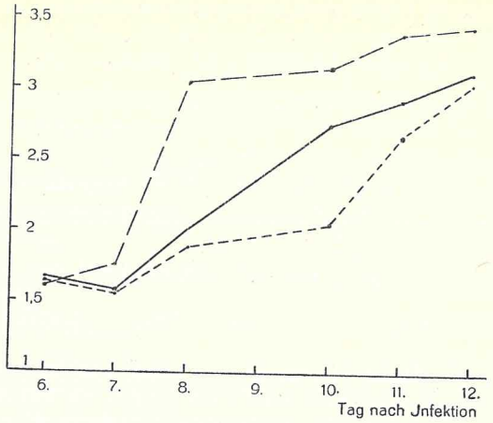
In Kurve 5 ist ein Versuch protokolliert, in dem die kurative Wirkung des Meerschweinchenimmunserums von einer Mischinfektion, die von 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure beeinflußt wird, überdeckt wird.



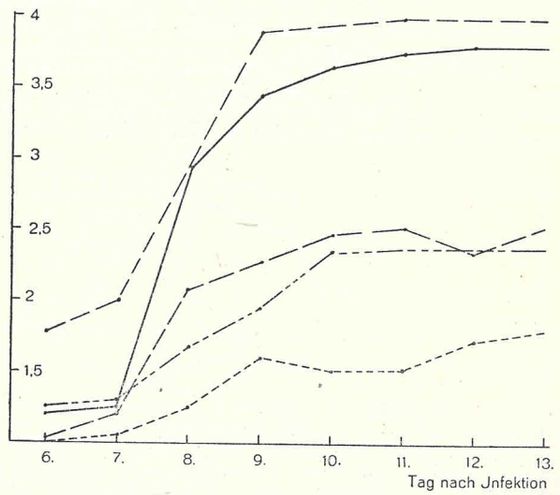
Kurve 3. Chemotherapieversuch II 34—42. Infektion: 0,25 ccm 1/2000 Mäusegehirnemulsion ip. = 10fache Dosis 80 % †/+++. ——— Infektionskontrollkollektiv. — — — 2fache Standardabweichung der allgemeinen Fleckfieberinfektion bei Mäusen. - - - - - - - Astrosol 0,1 g sc. 1 Tag vor, am 2. Tag nach Infektion. — - - - — p-Aminobenzyl-sulfanilamid 0,03 g sc. 1 Tag vor, am 2. Tage nach Infektion. 5 weitere Kollektive laufen in der Nähe oder über der Infektionskontrollkurve.



Kurve 4. Chemotherapieversuch II, 54—64. Infektion: 0,25 ccm 1/2000 Mäusegehirnemulsion ip. = über 1000fache Dosis 80 % †/+++. ——— Infektionskontrollkollektiv. — — — 2fache Standardabweichung der allgemeinen Fleckfieberinfektion bei Mäusen. - - - - - - - 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure 0,02 g per os 1 Tag vor, am Tag, 1 u. 3 Tage nach Infektion. — - - - - — Chaulmoogroyl-cholinjodid, 0,002 g sc. 1 Tag vor, am Tag, 1 u. 3 Tage nach Infektion. 5 weitere Kollektive laufen in der Nähe der Infektionskontrollkurve.



Kurve 5. Chemotherapieversuch II, 108—118. Infektion: 0,25 ccm 1/20000 Mäusegehirnemulsion ip. = 10fache Minimalinfektionsdosis. ——— Infektionskontrollkollektiv. — — — Meerschweinchenimmunserum 0,25 ccm sc. am 1., 2., 3., 5., 6. Tage nach Infektion. - - - - - - - - wie vor + 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure 0,02 g per os jeweils 2 Stunden nach Serumgabe.



Kurve 6. Chemotherapieversuch II, 118. Infektion: 0,25 ccm 1/2000 Mäusegehirnemulsion ip. = 100fache Dosis 80 % †/+++. ——— Infektionskontrollkollektiv. — — — 2fache Standardabweichung der allgemeinen Fleckfieberinfektion bei Mäusen. - - - - - - - Meerschweinchenimmunserum 0,25 ccm 1/1 am 1., 3. Tag nach Infektion, 0,25 ccm 1/2 am 2., 5. Tag nach Infektion. — - - - — wie vor + 4′-Sulfonamid-2,4-diaminoazobenzol-6-carbonsäure 0,02 g per os jeweils 2 Stunden nach Serumgabe. 5 weitere Kollektive laufen in der Nähe der Infektionskontrollkurve.

Schrifttum.

1) Bär, Z. Immunforschg **1940**, 97, 344.
2) Beloff, Russky Wratsch. **1912**, 1971.
3) Breinl u. John, Med. Klin. **1932**, 225.

4) Coglievinna, Med. Klin. **1915**, 1531.
5) — Dtsch. med. Wschr. **1916**, Nr. 27, 813.
6) — Med. Klin. **1917**, 12.
7) Fisher, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **1932**, 29, 633.
8) Gavino u. Girard, Publ. Inst. Bacteriol. National Mexico, **1910**.
9) Grabbe, Arch. exper. Path. **1928**, 138, 155.
10) Heubner, Arch. exper. Path. **1932**, 166, 177.
11) Kersten, Dtsch. med. Wschr. **1920**, 831.
12) Kikuth, Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **1937**, 41, 729.
13) Neitz-Kikuth, Zbl. Bakter. I Orig. **1939**, 144, Beiheft, 234.
14) Klink, Meyer u. Schlesies, Berl. klin. Wschr. **1916**, 178.
15) Laigret u. Jadin, Arch. Inst. Pasteur, Tunis **1932**, 20.
16) Lawrinowitsch u. Skorodumow, Zbl. Bakter. Ref. **1923**, 74, 18.
17) Levy, Fr., Beitr. klin. Infektionskrkh. **1917**, 5, 407.
18) Lewascheff u. Maranon, nach P. Ehrlich, Zbl. Bakter. Ref. **1911**, 50, Beiheft, 108.
19) McKinley, Meck u. Acree, J. inf. Dis. **1939**, 64, 38.
20) Meyer, Dtsch. med. Wschr. **1919**, 157.
21) Mollow, Wien. klin. Wschr. **1915**, 706.
22) — u. Popoff, Hambg. med. Überseeh. **1916**, 609.
23) Munk, Münch. med. Wschr. **1916**, 1239.
24) Mühlens, Zbl. Bakter. Ref. **1923**, 74, 18.
25) Nicolle u. Conseil, Ann. Inst. Pasteur **1912**, 26, 250—332.
26) Otto, Arb. Inst. exper. Ther. usw. Frankfurt/Main **1939**, 38.
27) Otto u. Chou, Zbl. Bakter. I Orig. **1922**, 88, 467.
28) — u. Munter, Z. Hyg. **1925**, 104, 429.
29) — — Handb. d. pathog. Mikroorganismen **1930**, 8, 1203.
30) — u. Papamarku, Dtsch. med. Wschr. **1920**, 594.
31) — u. Schäfer, Arb. Inst. exper. Ther. usw. Frankfurt/Main **1936**, 33, 73.
32) — u. Wohlrab, Arb. Inst. exper. Ther. usw. Frankfurt/Main **1939**, 38, 65.
33) Penafiel, Dtsch. med. Wschr., Therap. Beilagen **1898**, 36.
34) Peuirkas, Prog. med. Wschr. **1915**, 40, 246.
35) Piston u. Bucco, Riforma med. **1936**, 577.
36) Priewe, Dtsch. tierärztl. Wschr. **1928**, 179.
37) Raubitschek, Wien. klin. Wschr. **1915**, 706.
38) Reimann, J. Immunol. **1930**, 18, 153.
39) Rössler, Wien. klin. Wschr. **1916**, 356.
40) Ronse, Ann. Inst. Pasteur **1935**, 54, 341.
41) Schelling, v., Arb. Inst. exper. Ther. usw. Frankfurt/Main **1940**, 39, 35.
42) Starkenstein, Wien. klin. Wschr. **1917**, 127.
43) — u. Zitterbart, Wien. klin. Wschr. **1917**, 13, 779.
44) Teichmann, Dtsch. med. Wschr. **1916**, 1256.
45) Teuent, East afr. med. J. **1936**, 13, 254.
46) Tietz, Med. Klin. **1918**, 1198.
47) Topping, Publ. Health Rep. **1939**, 1143.
48) Trautwein, Arch. f. Tierheilk. **1931**, 63, 201.
49) Veintemillas, 8. Reun. Soc. Argent. Patol. del Norte Buenos Aires **1936**, 545—549.
50) Weichardt, Klin. Wschr. **1929**, Nr. 8, 1669.
51) Wohlrab, Zbl. Bakter. I Orig. **1937**, 140, Beiheft, 193.
52) — Arb. Inst. exper. Ther. usw. Frankfurt/Main **1939**, 38, 85.

Aus dem Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt a/Main
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto) und einem Feldlaboratorium.

III.

Die Verwendung getrockneter Blutstropfen für Zwecke der klinischen Probeagglutination.

Von
R. Kudicke und W. Steuer.

Die serologisch-diagnostischen Methoden sind Arbeitsweisen, deren Ausführung Speziallaboratorien und geschulten Kräften vorbehalten ist. Der praktische Arzt, der Kliniker und der Seuchenhygieniker wird dies bei akuten Infektionskrankheiten erst dann als Nachteil empfinden, wenn infolge ungünstiger äußerer Verhältnisse die Zeitspanne zwischen Abnahme bzw. Absendung des Untersuchungsmaterials und Eintreffen des Untersuchungsergebnisses ungebührlich groß wird.

Das Bedürfnis nach einer Methode, die es ermöglicht, wenn auch nicht am Krankenbett selbst, so doch ohne Inanspruchnahme eines Speziallaboratoriums eine Entscheidung über Vorliegen oder Ausschluß einer vermuteten Infektionskrankheit zu fällen, ist demnach — soweit die serologische Untersuchung überhaupt in diesem Sinne verwendet werden kann — wohl vielfach vorhanden. Erhöhter Wert kommt einer solchen Methode unter Verhältnissen zu, wie sie in Kriegszeiten einzutreten pflegen.

Allgemeine Verkehrs- und Postbeschränkungen ermöglichen dann eine Verbindung mit dem Laboratorium (Feldlaboratorium) oft nur in unsicherer oder zeitraubender Weise. Gerade in solchen Gebieten ist aber die Gefahr der Seuchenausbreitung durch die Truppenmassierung und starke Bevölkerungsbewegung nicht selten eine recht große. Der Truppenarzt und der für die Seuchenbekämpfung zuständige Hygieniker müssen rasche Entscheidungen fällen. Aus dieser Notwendigkeit heraus haben wir eine Schnellmethode ausgearbeitet, die geeignet ist, den praktischen Bedürfnissen möglichst gerecht zu werden.

Wir haben uns dabei zunächst auf die Diagnose des Fleckfiebers beschränkt, möchten hier aber gleich bemerken, daß die Methode wahrscheinlich auch bei der Diagnose des Abdominaltyphus, Paratyphus, der Bangschen Krankheit und vielleicht auch der Ruhr sich nützlich und brauchbar erweisen wird.

Als Ausgangsmaterial dienen uns getrocknete Blutstropfen, die aus dem Ohrläppchen oder der Fingerbeere gewonnen sind. Die Verwendung getrockneten Blutes zur Krankheitserkennung hat bereits Chediak bei Luetikern mit Erfolg vorgenommen. Auch uns erwies sich das Trockenblut zu der beabsichtigten serologischen Reaktion, der Schnelldiagnose des Fleckfiebers, im Laufe unserer Versuche als gut geeignet. Die Bezeichnung „klinische Probeagglutination“ soll gleichzeitig die Grenze der Methode aufzeigen: sie soll die Weil-Felixsche Reaktion dort nicht ersetzen, wo eine Kenntnis des Endtiters wünschenswert ist (s. unten).

Vorversuche.

Die orientierenden Vorversuche über die praktische Brauchbarkeit der Methode wurden in der Weise begonnen, daß ein aus dem Ohrläppchen mit der Öse auf den Objektträger gebrachter und dort ausgebreiteter Blutstropfen nach Eintrocknung mit verschiedenen Mengen physiologischer Kochsalzlösung zu einer Hämoglobin-Serumlösung verrieben wurde. Eine Öse dieser Lösung wurde mit einer gleichgroßen Öse einer Aufschwemmung von B. Proteus-OX-19 vermischt und im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung beobachtet. Später erfolgte die Ablesung unter Fortlassung des hängenden Tropfens direkt auf dem Objektträger mikroskopisch (schwache Vergrößerung) bzw. mit der Lupe. Letztere Ablesungsart wurde bald ausschließlich verwendet, da sie ebenso klare und deutliche Ergebnisse lieferte. Blute mit hohem Titer (Weil-Felix) agglutinierten hierbei sofort und stark (grobe Schollenbildung), während solche mit niederem Titer erst nach einigen Minuten und dann feinkörniger zusammenballten. Nachdem die Eignung des Trockenblutes bzw. der aus ihm gewonnenen Hämoglobin-Serumlösung für die Zwecke der Agglutination grundsätzlich festgestellt war und sich bei zahlreichen Blutpräparaten immer wieder ergeben hatte, daß das gewünschte Resultat leicht und schnell zu erhalten war, suchten wir eine quantitative Abstufung der Reaktion — soweit sie bei dem Charakter einer Probeagglutination notwendig und wünschenswert ist — zu erreichen.

Zunächst bemühten wir uns, die Größe des zu entnehmenden Blutstropfens zu normalisieren. Wir verwandten eine Öse aus Platindraht von 2 mm Durchmesser. Die Drahtdicke betrug anfangs 0,4, später 0,6 mm. Auch bei Verwendung einer solchen Öse ergeben sich Unterschiede in der Tropfengröße. Es hängt das einmal wahrscheinlich von der Viskosität des Blutes ab, weiter von der Art der Entnahme, schließlich auch von der Blutmenge, die der gesetzten Hautwunde entquillt. Viskositätsunterschiede glaubten wir in Kauf nehmen zu können. Den anderen Schwierigkeiten suchten wir dadurch zu begegnen, daß wir das zu untersuchende Blutquantum stets durch flaches Auflegen der Ösenbreite aus dem quellenden Blutstropfen heraushoben und den letzteren möglichst groß wählten.

Hierbei faßt die 2-mm-Öse meist 0,003 ccm Blut, wenn auch die mit feinen Pipetten und mit Hilfe von Filterpapier vorgenommenen Messungen noch leichte Unterschiede ergeben haben. Diese fallen jedoch, wie die späteren Tabellen erweisen werden, bei der vorliegenden Methodik nicht wesentlich ins Gewicht. Der Flüssigkeitsanteil eines normalisierten Tropfens kann entsprechend den Verhältnissen bei gesunden Menschen mit ca. 50 % angenommen werden (0,0015 ccm). Der Trockenrückstand des Tropfens von 0,003 ccm beträgt nach den allgemeinen Angaben 21—22 % des Vollbluts. Die Mengen, mit denen gearbeitet wird, sind also sehr gering.

Es erwies sich als vorteilhaft, den Blutstropfen auf dem Objektträger so auszubreiten, daß er eine Fläche von etwa 1 cm Durchmesser bedeckt. Er trocknet so schneller und es läßt sich dann auch die Hämoglobin-Serumlösung leichter herstellen. Schließlich blättert er auch bei einem Transport weniger leicht ab. Im übrigen ist der getrocknete Blutstropfen sofort und auch nach längerer Zeit brauchbar. Mehrere Tage und Wochen alte, bei Zimmertemperatur, im Brutraum und im Eisschrank gelagerte Tropfen zeigen, wie die entsprechenden Versuche ergaben, nur geringe Beeinflussung (Abschwächung) der Reaktionsfähigkeit. Das entspricht der bekannten Tatsache, daß die Eintrocknung die Agglutinine nicht schädigt. Ein Trocknen über der Flamme darf jedoch nicht vorgenommen werden; die Beobachtungen haben dabei eine deutliche Minderung der Agglutinationsfähigkeit ergeben. Verunreinigungen mit Salzen, Säuren, Alkalien dürften die Agglutination ebenso hemmen wie bei Seren.

Die weitere Behandlung des getrockneten Blutstropfens wurde im Laufe der Vorversuche verschieden gehandhabt. Zuerst wurde mit einer zweimal so großen Öse den in der erwähnten Weise abgenommenen und ausgebreiteten Blutstropfen ein Tropfen Kochsalzlösung zugefügt, bis zur völligen Lösung des Tropfens verrieben, mit gleicher Öse ein Tropfen dichte Bakterienaufschwemmung hineingebracht und das Resultat ermittelt. Da bei der Verreibung des Trockenblutes mit der Öse zuweilen nicht ganz verreibliche Fäserchen oder Flöckchen, offenbar Fibrin- und Zellreste, entstanden, die die Beurteilung stören konnten, wurde später davon abgesehen. Die Hämoglobin-Eiweißlösung entsteht auch ohne Verreiben, wenn man nur die Flüssigkeit eine Zeitlang auf dem eingetrockneten Tropfen beläßt und dann den Objektträger vorsichtig hin und her schwenkt. Die ungelösten Bestandteile bleiben dabei am Objektträger haften und stören die Reaktion nicht.

Bei der angegebenen Methode zeigten nun Blute mit Weil-Felix-Titern, die erfahrungsgemäß unspezifisch sein können (1 : 50, 1 : 100) ebenfalls positive Ausschläge. Die Zahl solcher unspezifisch reagierender Seren ist nicht so gering, wie vielleicht zunächst angenommen wird. Unter 426 nach Weil-Felix ausgeführten Reaktionen waren bei dem von uns untersuchten Material unspezifisch: 1 : 50+ = 36; 1 : 100± = 7; 1 : 100+ = 5. Deshalb wurde versucht, die Lösung des Blutstropfens so vorzunehmen, daß die Trockenblutprobeagglutination (TrBA) erst oberhalb der unspezifischen Zone positiv ausfiel. Es wurde zunächst eine stärkere Verdünnung durch

Mischung mit mehreren Ösen Kochsalzlösung hergestellt, wobei nach Zufügung von 5 Ösen eine Ausschaltung der positiven Ergebnisse mit Bluten vom Titer 1 : 100 erreicht schien. Eine Öse der so hergestellten Verdünnung und eine Öse Bakterienaufschwemmung wurden hierbei auf einem zweiten Objektträger zusammengebracht. In den folgenden Versuchen wurde die Kochsalzlösung mit einer Mikropipette abgemessen und in verschiedenen Mengen den einzelnen Tropfen ein und desselben Blutes zugefügt. Dieses Verfahren behielten wir bei.

Eine wesentliche Vereinfachung ließ sich schließlich dadurch erzielen, daß unter Weglassung der Kochsalzlösung die Bakterienaufschwemmung in verschiedenen Mengen (0,01 bis 0,08 ccm) den einzelnen Tropfen eines Blutes direkt mit der Mikropipette hinzugefügt wurde. So erfolgte die Abstufung der TrBA in zweifacher Weise: Durch die Blutverdünnung und durch die verschiedene Bakterienquantität.

Die Versuchsreihen ergaben, daß zweckmäßig von einem Blut 3 Tropfen hergestellt und mit 0,02, 0,04 und 0,08 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt werden. Die Serumverdünnung kann dann grob angenommen werden wie folgt: 0,003 Blut = 0,0015 Serum + 0,0015 Blutkörperchen. 0,0015 Serum + 0,02 Bakterienaufschwemmung = Verdünnung 1 : 13; 0,0015 Serum + 0,04 Bakterienaufschwemmung = 1 : 27; 0,0015 Serum + 0,08 Bakterienaufschwemmung = 1 : 53. Daß dabei später vielleicht noch die mittlere Titerstufe (0,04 ccm Bakterienaufschwemmung) in Wegfall kommen kann, ist nach den bisherigen Ergebnissen nicht unwahrscheinlich, muß aber von den weiteren Erfahrungen abhängig gemacht werden. Das Ergebnis der Trockenblutreaktion wurde in 3 Zeiten mit bloßem Auge bzw. einfacher Lupe nach 1, 5 und 10 Minuten nach jeweils mehrmaligem Hin- und Herschwenken des Trägers abgelesen. Die Ablesung erfolgt am besten im auffallenden Licht gegen eine schwarze Unterlage, in Zweifelsfällen auch im durchscheinenden Licht gegen das Fensterkreuz. Als Kontrolle der Homogenität der Bakterienaufschwemmung empfiehlt es sich, diese sofort nach ihrer Zumessung, noch vor Beginn der Blutlösung, genau zu betrachten. Diese Prüfung bietet auch gleichzeitig eine Vergleichsmöglichkeit mit ihrem späteren Zustand.

Wir haben verschiedentlich beobachtet, daß Bakterienaufschwemmungen, die im Eisschrank aufbewahrt waren, zunächst langsamer reagierten als solche, die bei Zimmertemperatur gestanden hatten. Die Temperatur spielt also bei der Schnelligkeit, mit der die Agglutination eintritt, zweifellos eine Rolle, was ja auch sonst bekannt ist. Deswegen sei bemerkt, daß alle unsere Versuche bei Zimmertemperatur angestellt worden sind, die freilich infolge mannigfacher Schwierigkeiten nicht ganz gleichmäßig war.

Erwähnt werden soll schließlich noch, daß wir im Laufe der Vorversuche auch eine mittels Aqu. dest. bereitete Blutlösung als Ausgangsmaterial für die Probeagglutination benutzten. Die Lösung wurde in den zur Blutkörperchenzählung verwendeten Pipetten hergestellt und dann in verschiedenem Verhältnis mit Bakterienaufschwemmung geprüft. Auch diese Methode erwies sich für die beabsichtigten Zwecke als gut brauchbar. Wie

wir bei Durchsicht der uns zugänglichen Literatur später feststellten, hat in ähnlicher Weise DIERNHOFER (Zbl. f. Bakter. Ref. Bd. 113, S. 163) eine Schnellmethode zur Ermittlung Brucella-infizierter Tiere angegeben. Ferner haben, wie noch erwähnt sei, MÜHLENS und STOJANOFF während des Weltkrieges beobachtet, daß Seren, die eine positive Weil-Felix-Reaktion von 1:100 nach 2 Stunden aufwiesen, schon vorher bei einer orientierenden Agglutination auf dem Objektträger in einer Verdünnung von 1:25 Häufchenbildung ergaben (Zbl. f. Bakter. Ref. Bd. 68, S. 516). Praktischer, handlicher und noch einfacher erscheint uns aber die Verwendung getrockneter Blutstropfen. Sie läßt auch einen bequemen Transport des Materials zu, wenn die Reaktion an einem anderen Ort gemacht wird, und eine leichte Aufbewahrung, wenn eine spätere Wiederholung, insbesondere zu Vergleichszwecken, vorgenommen wird.

Endgültige Technik.

A. Instrumente: Ein Fläschchen Alkohol, Watte, eine Frankesche Nadel oder Stechfeder, Objektträger (am besten mit Hohlschliffen), eine Normalöse (2 mm lichte Weite; 0,6 mm Drahtdicke), eine oder mehrere Mikropipetten (evtl. mit aufgesetztem Gummihütchen).

B. Reagenzien: Zur Herstellung der Bakterienaufschwemmung wird eine 18stündige Proteus-OX-19-Kultur mit 4 ccm Kochsalzlösung (0,9 %) abgeschwemmt und 1 Stunde im Wasserbad von 75° abgetötet. Bakteriengehalt: ca. 1,5 Vol.%. Nach Sterilitätsprobe ist die Aufschwemmung gebrauchsfertig. Die Empfindlichkeit der abgetöteten Keime kommt der lebender Aufschwemmung gleich. Die Agglutination ist sogar noch etwas kompakter. Karbolisierte und formolisierte Keime, desgleichen das BIENSche Diagnostikum, haben sich als wesentlich unempfindlicher erwiesen.

C. Blutentnahme. Reinigung des Ohrläppchens, Einstechen mit der Stechfeder. Mit der Normalöse werden nacheinander 3 Tropfen aus dem herausquellenden Blut so abgenommen, daß die flache Ösenrundung in das Blut hineingetaucht und in der gleichen Weise herausgehoben wird (bikonvexer Tropfen). Die Tropfen werden auf dem Objektträger nebeneinander mit gewissem Zwischenraum bis zu einem Durchmesser von ca. 1 cm ausgebreitet und so bei Zimmertemperatur getrocknet. Zweckmäßig ist Verwendung von Objektträgern mit 3 Hohlschliffen.

D. Ausführung der Reaktion. Zum ersten Tropfen werden 0,02 ccm, zum zweiten 0,04 ccm und zum dritten Tropfen 0,08 ccm der obigen Bakterienaufschwemmung mit der Mikropipette hinzugefügt und über ihn ausgebreitet. Die Homogenität der Bakterienaufschwemmung wird sofort geprüft. Dann wird die entstehende bräunliche Hämoglobin-Serumlösung durch behutsames Hin- und Herneigen des Trägers mit der Bakterienaufschwemmung gleichmäßig vermischt.

E. Beurteilung der Reaktion. Nach 1, 5 und 10 Minuten wird die Reaktion unter Hin- und Herschwenken des Trägers abgelesen. Zwischendurch wird der Objektträger zur Verhütung einer Verdunstung zweckmäßig auf ein Stück angefeuchtetes Fliespapier unter den Deckel einer Petrischale gelegt. Blute mit einem Titer von 1:200 ab (Weil-Felix) ergeben entsprechend der Höhe des Titers alsbald oder nach den Wartezeiten eine grobschollige, mittel- oder feinkörnige Agglutination.

Untersuchungsergebnisse.

Im folgenden seien zunächst die zur Prüfung der Methode mit Tropfen von eingesandten Bluten gewonnenen Ergebnisse in 71 Fällen zusammengestellt. Die Blute wurden z. T. vor, z. T. nach Serumentzug aufgeschüttelt und zur Tropfenentnahme benutzt. Der Serumanteil der einzelnen Tropfen schwankt daher in gewissen Grenzen, was auch im Resultat deutlich zum Ausdruck kommt. Ferner sei über die Vergleichbarkeit der TrBA mit der WEIL-FELIXschen Reaktion und der WEIL-FELIXschen Reaktionen untereinander[1]) noch folgendes vorweggenommen: Die Serummengen und Verdünnungsgrade sind bei der WEIL-FELIXschen Reaktion, bei Verwendung der üblichen Meßpipetten und der üblichen Arbeitsweise meist vom Nennwert nach beiden Richtungen hin etwas verschieden. Die Empfindlichkeit der jeweiligen Bakterienmenge kann eine wechselnde sein. Ein subjektives Moment liegt ferner in der Ablesungsart. Schließlich sind die einzelnen Titerstufen nur Stichproben in großen Abständen. Gleichtitrige Sera brauchen daher bei genauer Untersuchung nicht gleichwertig zu sein und sind es auch kaum genau. Ist die Vergleichbarkeit WEIL-FEILXscher Reaktionen untereinander bereits keine strenge (s. a. GARDNER, Zbl. f. Bakter. Ref. Bd. 127, S. 12), so ist ein Vergleich mit einer anderen Reaktion, im vorliegenden Falle der mit anderen Konzentrationen arbeitenden Probeagglutination, noch weniger streng durchzuführen. Immerhin läßt sich nachweisen, daß die TrBA gleichsinnig verläuft. Bei den Untersuchungen wurde stets die Probeagglutination zuerst vorgenommen (Ablesung nach 1—10 Minuten) und dann die gleichzeitig angesetzte WEIL-FELIXsche Reaktion nach ca. 20 Stunden abgelesen (s. Tabelle I, S. 44).

Die Spezifität der Probeagglutination und ihre Gleichsinnigkeit mit der WEIL-FELIXschen Reaktion ist aus der Tabelle eindeutig erkennbar. Alle Blute mit einem Serumtiter von über 1:200 haben positiv oder stark positiv reagiert, alle Blute mit einem Titer unter 1:100 einwandfrei negativ. Von 4 Proben mit einem Serumtiter 1:100 reagierte eine positiv im ersten

1) Über die Weil-Felix-Reaktion siehe bei OTTO u. MUNTER, Hdb. d. path. Mikroorg. Bd. VIII, S. 1167 (1930).

Tabelle I.

Übersicht über die Ergebnisse der Weil-Felixschen Reaktion und der gleichzeitig durchgeführten Trockenblutprobeagglutination mit **geronnenem** (eingesandtem) Blut bei 71 Fleckfieberverdächtigen bzw. -kranken. (Alter der Blutstropfen 0—8 Tage.)

Nr.	Weil-Felix-Reaktion	Trockenblutprobeagglutination mit Proteus-X-19-Aufschwemmung (abgetötet bei 75°)			
		0,01	0,02	0,04	0,08
2396	1:50 negativ	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2407		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2493		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2494		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2510		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2513		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2514		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2515		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2517		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2518		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2522		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2526		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2527		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2536		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2580		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
5476		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2511	1:50 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2512	1:50 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2520	1:50 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2519	1:50 +	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
2521		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
5291		—/—/—	—/—/—	—/—/—	
5279	1:100 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—	
E 7	1:100 +	—/±/±	—/—/—	—/—/—	
5282			—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 30			—/±/+	—/—/—	—/—/—°
6129	1:200 ±		—/±/+	—/±/+	—/—/—°
4527	1:200 +		—/±/+	—/—/—	—/—/—
5279			—/±/±	—/—/—	—/—/—
4527			±/±/±	—/—/—	—/—/—
E 64			—/+/+	—/±/+	—/—/—
E 76			+/+/+	±/+/+	—/±/±°
E 77			+/+/+	±/+/+	—/±/±°
4889	1:400 +	+/+/++	—/+/+	—/+/+	
E 65			+/+/+	+/+/+	—/±/+
E 69			+/+/+	+/+/+	±/+/+
4670		+/++/++	+/++/++	+/+/++	
4529		+/++/++	++/++/++	—/+/+	
E 83			++/++/++	+/+/+	±/±/+
E 81			++/++/++	+/+/+	±/+/+
E 78			++/++/++	+/+/+	±/+/+
E 61			+/++/++	+/++/++	—/+/+
E 62			+/++/++	+/++/++	—/+/+
E 63			+/++/++	+/++/++	—/+/+
E 74			+/++/++	+/++/++	+/+/+
5658	1:800 +		+/+/++	+/+/++	±/+/+
E 66			+/++/++	+/++/++	+/+/+
E 80			+/++/++	+/++/++	+/+/+
4946		++/++/++	++/++/++	+/++/++	

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Weil-Felix-Reaktion	Trockenblutprobeagglutination mit Proteus-X-19-Aufschwemmung (abgetötet bei 75°)			
		0,01	0,02	0.04	0,08
E 59	1:1600 +		+/+/+	+/+/+	±/±/±▫
E 6		++/++/++	++/++/++	+/+/+	
E 72			++/++/++	+/+/++	+/+/+
E 68			+/++/++	+/++/++	+/+/+
4893		++/+++/+++	++/+++/+++	+/++/++	
6049			++/+++/+++	++/++/++	+/++/++
E 5			++/+++/+++	++/++/++	+/++/++
6655	1:3200 ±		++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++
E 75	1:3200 +		+/++/+++	+/++/+++	±/+/++
4668		++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++	
4942		++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++	
4666		++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++	
6051			++/++/+++	++/++/+++	+/++/++
6053			++/+++/+++	++/+++/+++	++/++/++
6047	1:6400 ±	++/+++/+++	+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/++/+++
5125	1:6400		++/+++/+++	++/+++/+++	
E 82			+++/+++/+++	++/+++/+++	+/++/+++
6052			++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++
6054			+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
5382	1:12800 +		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
6050			+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
E 67			+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++

Zeichenerklärung:

a) bei WFR.: + = positiv ± zweifelhaft positiv.
b) bei TrBA: ± = zweifelhaft
+ = feinkörnige Agglutination
++ = mittelkörnige Agglutination
+++ = grobkörnig, grobschollige Agglutination
° = fast reines Serum, ▫ = stark hämolys. Blut
—/—/— = Resultat nach 1, 5 und 10 Minuten.

Tropfen; von sieben Bluten mit dem Titer 1 : 200 war die Reaktion bei zwei im ersten Tropfen zweifelhaft, bei den übrigen positiv, bei vier auch noch im zweiten Tropfen. Demnach wäre die Methode nicht in jedem Fall geeignet, einen Titer von 1 : 200 zu erfassen, während höhere Titer mit Sicherheit ermittelt werden.

Als ausschlaggebend für die praktische Brauchbarkeit der TrBA muß aber ihre Bewährung bei Verwendung nativer getrockneter Blutstropfen angesehen werden. Die unter dieser Bedingung bei 70 Fleckfieberverdächtigen bzw. Kranken vorgenommenen Untersuchungen sind in der Tabelle II, S. 46 dargestellt. Für ihre Lesung gilt das zu Tabelle I Gesagte; dazu ist noch zu bemerken, daß aus äußeren Gründen die Dicke des Ösendrahts bei dem größeren Teil der Blutentnahmen 0,4 mm, später dagegen 0,6 mm betrug, wodurch die Tropfengröße nicht ganz einheitlich ist.

Wie die Tabelle II, S. 46 erkennen läßt, haben Kranke, bei denen die Weil-Felixsche Reaktion völlig negativ ausgefallen war, auch in der Trocken-

Tabelle II.

Übersicht über die Ergebnisse der Weil-Felix-Reaktion und die gleichzeitig durchgeführte Trockenblutprobeagglutination mit **nativem** Blut bei 70 Fleckfieberverdächtigen bzw. Fleckfieberkranken. (Alter der Blutstropfen 0—8 Tage.)

Nr.	Klinisches Bild	Weil-Felix-Reaktion	Trockenblutprobeagglutination mit Proteus-X-19-Aufschwemmung (abgetötet bei 75°)		
			0,02	0,04	0,08
E 07	?	1:50 negativ	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 001	an fieberhafter Erkrankung gestorben		—/—/—	—/—/—	—/—/—
6021	schleimig-blutige Diarrhoen		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 08	?		—/—/—	—/—/—	—/—/—
6022	schleimig-blutige Diarrhoen		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 71	mehrtägig. Fieber, kein Exanthem		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 73	undeutl. Exanth. a. d. Brust, marmor. Exanth. a. d. Armen		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 79	mehrtäg. hohes Fieber, marmor. Exanth. am Bauch u. a. d. Armen		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 88	Fleckfieberverdacht		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 96	,,		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 002	,,		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 90	,,		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 93	,,		—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 20	,,		—/—/—	—/—/—	—/—/—
6048	35 Jahre, mehrtäg. hohes Fieber, Exanth. an Bauch u. Armen	1:50 +	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 102	45 J., mehrtäg. Fieber, Exanth. an Bauch u. Armen gehabt	1:50 +	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 03	fieberfrei; Bruder an Fleckfieber gestorben	1:100 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 04	mehrtäg. Fieber	1:100 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 09	mehrwöchig. Fieber	1:100 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 100	11 J., mehrtäg. Fieber, schwaches Exanth.	1:100 ±	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 97	25 J., Bruder Fleckfb., mehrtäg. Fieber, spärl. makulös. Ex.	1:100 +	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 99	31 J., mehrtäg. Fieber, lyt. Abfall, Ex. größtent. abgeblaßt	1:100 +	—/—/—	—/—/—	—/—/—
E 64	?	1:200 +	—/±/+	—/—/—	—/—/—
E 84	mehrtäg. Fieber, typ. Exanth. an Brust, Bauch u. Armen		+/+/+	—/—/—	—/—/—
E 06	mehrwöchig. Fieber, jetzt fieberfrei		+/+/++	—/±/+	—/—/±
E 77	mehrtäg. Fieber, typ. Exanth. an Brust, Bauch u. Armen		+/+/++	—/+/+	—/±/±
E 05	mehrwöchig. Fieber		+/+++/++	—/+/+	—/—/+[1]
E 101	21 J., anhaltend. Fieber, Exanthem	1:400 ±	+/+++/++	+/+/+	—/±/±
E 61	mehrtäg. Fieber, kein Exanthem	1:400 +	—/+/++	—/±/+	—/—/±
E 65	mehrtäg. Fieber, typ. Exanth. an Brust u. Armen		+/+/++	+/+/+	—/—/+
E 69	mehrtäg. Fieber, spärl. Exanth. am Bauch, deutl. Exanth. a. d. Armen		+/+/++	±/+/++	—/+/+
E 74	mehrtäg. Fieber, undeutl. Exanthem		+/+/++	+/+/++	±/+/+
E 78	mehrtäg. Fieber, abgeblaßtes Exanthem		+/+/++	+/+/+	±/+/+
E 81	mehrtäg. Fieber, typ. Exanth. an Bauch u. Arm		++/++/++	+/+/+	±/±/+
E 83	mehrtäg. Fieber, stark. Exanth. an Brust, Bauch u. Hand		+/++/++	+/++/++	—/+/+
E 76	mehrtäg. Fieber, sehr undeutl. Exanthem		++/++/+++	++/++/++	+/+/+
E 63	Fieber, Typhusverdacht	1:800 ±	+/++/++	±/+/++	—/—/+
E 91	Typhusverdacht	1:800 +	+/++/++	+/++/++	—/±/+
E 66	mehrtäg. Fieber, Exanth. an Brust, Bauch u. Armen		+/+/+++	+/+/++	—/+/++
E 80	mehrtäg. Fieber, marmor. Exanth. an Bauch u. Armen		+/++/+++	+/++/+++	±/+/++
E 62	mehrtäg. Fieber, kein Exanth., Typhusverdacht		++/+++/+++	++/+++/+++	++/++/++
E 89	Typhusverdacht	1:1600 +	—/++/+++	—/+/++	—/±/++
E 70	mehrtäg. Fieb., typ. Exanth. a. d. Flanken, undeutl. a. Bauch		+/+/++	+/+/++	±/+/++
E 68	mehrtäg. Fieber, Exanth. an Brust, Bauch u. Armen		+/++/+++	+/++/++	—/+/++
E 92	mehrtäg. Fieber, Typhusverdacht		++/+++/+++	+/++/+++	—/+/++
6055	39 J., weibl., mehrtäg. Fieber, lyt. Entfiebg., undeutl. Exanth.-Reste		+/+++/+++	+/+++/+++	—/+/++
E 01	mehrtäg. Fieber, jetzt fieberfrei		++/+++/+++	+/++/+++	±/+/++
E 72	mehrtäg. Fieber, angedeut. Exanth. (marmoriert)		+/++/+++	+/++/++	+/+/++
E 22	anhalt. Fieber, jetzt fieberfrei, kein Exanth., geh.		++/++/+++	++/++/+++	+/+/++
6049	10 J., weibl., mehrtäg. Fieber, jetzt fieberfrei, schw. Exanthem gehabt		++/++/+++	++/+++/+++	+/++/++
E 02	mehrwöchig. Fieber, jetzt fieberfrei		++/+++/+++	++/+++/+++	+/++/++
E 104	mehrtäg. Fieber, stark benommen, typ. Exanthem	1:3200 +	+/+++/+++	+/++/++	±/+/++
E 60	mehrwöchig. Fieber, Typhusverdacht		++/++/+++	++/++/+++	±/+/++
E 22	anhalt. Fieber, lyt. Entf., kein Exanthem gehabt		++/++/+++	++/++/+++	+/+/++
E 59	anhaltend. Fieber, Typhusverdacht		++/+++/+++	++/++/+++	+/+/+++
6051	15 J., männl., mehrtäg. Fieb., lyt. Entfieb., Exanth. geh.		+/+++/+++	+/+++/+++	+/++/+++
E 103	75 J., mehrtäg. Fieber, sehr undeutl. Exanth., benommen		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/++/+++
E 75	mehrtäg. Fieber, typ. Exanthem a. d. Brust		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
6047	47 J., weibl., mehrwöchig. Fieber, jetzt fieberfrei, deutl. Exanthem gehabt		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
6053	27 J., männl., Fieber mit lyt. Entfiebg., undeutl. Exanth.		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
E 86	mehrtäg. Fieber, typ. Exanthem, Benommenheit		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
E 95	mehrtäg. Fieber, typ. Exanthem		+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++
E 106	24 J., mehrwöchig. Fieber, jetzt fieberfrei	1:6400 +	+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/++/++
E 82	mehrtäg. Fieber, undeutl. Exanthem		++/+++/+++	++/+++/+++	+/++/+++
E 98	53 J., mehrtäg. Fieber, jetzt fieberfrei, typ. petech. Exanth.		++/+++/+++	++/++/+++	++/+++/+++
6052	20 J., weibl., mehrwöchig. Fieber, kritisch. Fieberabfall, Exanthem gehabt		+++/+++/+++	+++/+++/+++	+++/+++/+++
6054	40 J., männl., läng. Fieber, stark. Exanth. an Bauch, Vorderarmen u. Handrücken		+++/+++/+++	+++/+++/+++	+++/+++/+++
E 67	anhalt. Fieb., Benommenheit, undeutl. spärl. Exanth. gehabt	1:12 800 +	++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++
6050	mehrwöchig. Fieber, typ. Exanthem gehabt	1:12 800 +	+++/+++/+++	++/+++/+++	++/+++/+++
E 107	30 J., weibl., mehrwöchig. Fieber, angebl. Exanth. gehabt	>1:12 800 +	+++/+++/+++	+++/+++/+++	++/+++/+++

1) Weil-Felix-Reaktion 6 Tage vorher ausgeführt.

Zeichenerklärung siehe Tabelle I.

blutprobe einwandfrei negativ reagiert. Ebenso negativ war das Ergebnis bei einem Serumtiter bis 1:100. Leider ist jedoch die Zahl dieser Proben nur gering. 5 Kranke mit einem Weil-Felix-Titer 1:200 reagierten deutlich positiv, wenn auch in Schnelligkeit und Stärke des Ausschlags Unterschiede bemerkbar waren. Völlig einwandfrei positiv war das Ergebnis bei 43 Kranken, deren Weil-Felix-Titer 1:400 und mehr betrug.

Schlußfolgerungen.

Wir halten uns nach diesem Ergebnis für berechtigt, zu schließen, daß die angegebene Trockenblutmethode, wenn sie im zweiten oder auch dritten Tropfen sicher positiv ausfällt — was der Geübte leicht erkennen kann — im gleichen Sinne zu verwerten ist, wie eine positive Weil-Felix-Reaktion. Ein Titer von 1:400 und mehr wird dabei mit Sicherheit erkannt, wenn auch nicht gemessen. Es scheint auch so, als wenn der Titer 1:200 mit Regelmäßigkeit wenigstens durch Agglutination im 1. Tropfen angezeigt würde, 1:100 dagegen nicht mehr. Angesichts der geringen Zahl der einschlägigen Proben und der in Tabelle I wiedergegebenen Ausnahmen wird man jedoch vorläufig bezüglich dieser Titerzone in der Beurteilung vorsichtig sein und die Ergänzung durch die typische Weil-Felix-Reaktion verlangen müssen.

Da die TrBA ohne Mühe für den Arzt und ohne Belästigung für den Patienten unter Umständen täglich angestellt werden kann, wird es möglich sein, ein Ansteigen des Serumtiters auf jeden Fall zu erkennen und damit einen Teil der etwa möglichen Fehldiagnosen auszuschalten. Wo eine schwach positive Reaktion nicht zu einer deutlich positiven wird, bleibt wiederum nur die typische Weil-Felix-Reaktion übrig. Eine bei Wiederholung stets negative TrBA scheint uns gegen Fleckfieber zu sprechen, doch bedürfen unsere Untersuchungen nach dieser Richtung noch der Ergänzung.

Ob sich durch Verwendung des hängenden Tropfens und Verlängerung der Beobachtungsdauer in diesen Fällen eindeutige Unterschiede zwischen dem Titer 1:200 und 1:100 darstellen lassen, wissen wir noch nicht. So sind also bei der Bewertung negativer oder schwacher Reaktionen Vorbehalte unerläßlich. Die einwandfrei positive Agglutination in 2 oder 3 Tropfen berechtigt dagegen zu den gleichen Schlüssen wie die typische Weil-Felix-Reaktion.

Wir empfehlen die Methode zur Nachprüfung.

Nachtrag bei der Korrektur.

Inzwischen sind uns zwei Arbeiten bekannt geworden, in denen gleiche oder ähnliche Ziele verfolgt werden wie in der unsrigen. Castaneda u. Silva (Ref. Zbl. f. Bakt., Bd. 137, S. 40) verwenden Frischblut oder Serum und mischen es mit Hilfe einer Öse auf dem Objektträger mit einer Proteus-OX-19-Aufschwemmung in 1,1proz. Natr.-citr.-Lösung, der 0,2% Formalin zugesetzt ist. Die positive Reaktion ist erkennbar an der Bildung eines weißen Ringes an der Tropfenperipherie und tritt nach Angabe der Autoren bereits nach 1 Minute ein. Die Arbeit ist bereits 1938 erschienen, war uns aber bei unseren Versuchen nicht bekannt.

Weiter haben Eyer u. Gruetzner[1]) inzwischen eine Arbeit veröffentlicht, die „Agglutininanalyse nach Weil und Felix im Massenversuch" betitelt ist und sich ebenfalls kleiner Blutquanten bedient, im Gegensatz zu uns und den Obengenannten aber mit den üblichen Konzentrationen arbeitet. Aus der Arbeit interessiert hier die Art, wie die Frage der Normalisierung des Blutstropfens gelöst ist. Eyer und Gruetzner verwenden dazu eine zylindrisch gestaltete Platinöse, wie sie früher bereits Shiga benutzt hat. Es ist das offenbar eine Verbesserung. Noch besser ist wahrscheinlich die Abmessung des benötigten kleinen Blutquantums mittels einer geeichten Kapillarpipette.

1) Z. f. Hyg. u. Inf. Bd. **122** S. 589.

Aus dem Staatl. Institut für experimentelle Therapie und dem Forschungsinstitut für Chemotherapie zu Frankfurt a. Main (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto).

IV.

Zur Frage der Pathogenität und Infektiosität von Kulturspirochäten des Pallida-Typus.

Von

B. Albrecht.

Mit 1 Abbildung im Text.

Es war selbstverständlich, daß man, nach der 1905 erfolgten Entdeckung der Spirochaeta pallida, die in der Bakteriologie gewonnenen Erkenntnisse und Methoden auf den Erreger der Syphilis anzuwenden sich bemühte. Vor allem war es ihre Kultivierung, die man auf den verschiedenen Wegen erstrebte, um damit die Ausgangsstellung zu schaffen für die Immunitätsstudien, die nach den mit den Bakterien gewonnenen Ergebnissen auch für die Syphilis verlockend erschienen. Die Handbücher geben ein Spiegelbild der jetzt schon Geschichte gewordenen, leider vergeblich gebliebenen Bemühungen. Die Züchtung der Spirochaeta pallida wurde mit allen bei Bakterien erprobten Verfahren versucht. Und daß auch heute noch dann und wann ein neues Verfahren angegeben wird, kann als Beweis angesehen werden, daß die bisherigen zu keinem befriedigenden Erfolge geführt haben. Es ist hier nicht der Ort, einen Überblick zu geben über die von zahlreichen Autoren ausgeführten Züchtungsversuche und ihre Ergebnisse. Den heutigen Standpunkt in der Frage, ob sich die Spirochaeta pallida auf künstlichen Nährböden kultivieren läßt, bringt auf Grund seiner jahrelangen und umfangreichen Arbeiten Jahnel zum Ausdruck, wenn er sagt: „Es gibt zur Zeit keine Methode, welche die beliebige Züchtung der Spirochaeta pallida ermöglicht. Alle von uns untersuchten, durch andere Autoren angelegten Kulturen, sog. Pallidae, stimmen weder in ihren morphologischen, noch in ihren färberischen, noch in ihren biologischen Eigenschaften mit der Spirochaeta pallida überein, hingegen besitzen sie Eigenschaften von unter gleichen Bedingungen gezüchteten saprophytischen Spirochäten der Genitalregion des Menschen.“ Diese 1934 ausgesprochenen Sätze sind bisher nicht erschüttert worden und werden von

uns auf Grund unserer Beobachtungen an fremden Spirochätenkulturen und an Kulturen aus eigenem syphilitischen Kaninchenmaterial als richtig anerkannt. Wenn trotzdem aus syphilitischem Material gewonnene Spirochätenkulturen immer noch schlechtweg als Pallidakulturen bezeichnet werden, ohne den Beweis dafür zu erbringen, daß es sich tatsächlich um Pallidae handelt, so richtet sich das Übergehen der oft mühevollen Arbeit anderer selbst. Solange solche Kulturen ein Laboratoriumsleben haben, kann man nichts dagegen einwenden, wenn ein Entdecker sie mit dem Namen belegt, den er für richtig hält. Werden sie aber der Öffentlichkeit übergeben oder gar therapeutisch verwandt, so muß unserer Meinung nach der strengste Maßstab angelegt werden, den die wissenschaftlichen Kenntnisse zu bieten haben. Von diesem Standpunkt aus müssen die Spirochätenkulturen beurteilt werden, die seit einiger Zeit zur Vakzinetherapie der Lues benutzt werden. Neben Handelspräparaten finden in den letzten Jahren vornehmlich die von Hilgermann gezüchteten Spirochätenkulturen in der Vakzinetherapie Verwendung (Hilgermann, Spitzer, Neuber, Benedek, Brecher, Kertész, Angelberger, Bruder) und werden als Pallidavakzine bezeichnet. Für eine Klärung der Frage, ob auch diese zur Vakzineherstellung benutzten Stämme wirkliche Pallidastämme sind, tritt Zieler ein. Zieler scheint, unabhängig von der Frage, ob eine „Beeinflussung und Heilung der Syphilis durch spezifische Impfung“ möglich ist, jedenfalls in bezug auf die Hilgermannsche Spirochätenvakzine „die wichtigste Forderung zu sein, daß erst einmal festgestellt wird, ob die Hilgermannschen Spirochäten echte Syphilisspirochäten sind“. Da in unseren Instituten mit dem Hilgermannschen Spirochätenstamm seinerzeit Untersuchungen ausgeführt wurden, hält Zieler es für sehr dankenswert, die zu Lebzeiten Kolles ausgeführten Untersuchungen, deren Veröffentlichung infolge der Erkrankung Kolles unterblieb, mitzuteilen. Sein Nachfolger, Geheimrat Otto, hat sich diesem Vorschlag nicht verschlossen und mir gestattet, die diesbezüglichen und weitere Ergebnisse zu publizieren.

Richtunggebend für unsere tierexperimentellen Arbeiten mit Kulturspirochäten war die Überlegung, Spirochätenkulturen zu einer spezifischen Immunotherapie zu verwenden. Es wurde hierbei vor allem der Frage eine besondere Bedeutung beigelegt, ob die sog. Pallidastämme, die uns in Kulturen zur Verfügung standen, pathogen sind. Sie interessierte Kolle, vom immunbiologischen Standpunkt aus, mehr als ihre Züchtbarkeit. Kolles Ansicht nach war die Anwendung der Kochschen Trias auf die Kulturspirochäten vom Typus der Pallida eine Selbstverständlichkeit, und er hielt diesen Nachweis für den Schlußstein in der Beweisführung für eine Identität der Kulturspirochäten mit der Pallida. Er vertrat völlig die Gedankengänge von Noguchi, der 1911 als erster mit vom Menschen stammenden Material durch Verimpfung von Reinkulturen auf Kaninchen typische syphilitische Läsionen erzeugte, und die Pathogenität des Materials

als Haupterfordernis ansieht für den Nachweis der Pallida. Der Ausfall des Tierexperimentes war Kolle für die Entscheidung, ob es sich bei Kulturspirochäten um Pallidae handelt, wichtiger als die Heranziehung morphologischer Momente, eine Ansicht, die Tomasczewski bereits 1912 vertreten hatte. Den Einwand, daß Spirochäten in der Kultur selbst nach wenigen Passagen ihre Pathogenität völlig eingebüßt haben sollten, ließ er nicht gelten. Wohl machte er die Konzession, daß alte Passagen in ihrer Virulenz herabgemindert sein könnten, doch müßten sie sich, seiner Ansicht nach, durch Tierpassage wieder aktivieren lassen, wenn es sich um pathogene Spirochäten handele. Kolle war von der Geltung der These über die „Wiedererzeugung der gleichen Krankheit mit demselben reingezüchteten Erreger in einem bisher gesunden Organismus" auch für die Pallida fest überzeugt und scheute keine Kosten, an einem großen Tiermaterial diese für die Immunität der Syphilis wichtige Frage zu klären. Mir wurde damals der Auftrag zuteil, die notwendigen Untersuchungen auszuführen.

An die Spitze aller Betrachtungen über die Pathogenität der Spirochätenkulturen muß man m. E. die Überlegung setzen, die E. Hoffmann u. E. Hofmann in die Worte fassen, daß bei der Verimpfung von Kulturspirochäten auf geeignete Tiere „selbst die Erzeugung des Kaninchenprimäraffektes immer noch den Gedanken offen läßt, ob nicht neben der dadurch nachgewiesenen Pallida eine andere feine Spirochätenart in der Kultur vorhanden sein kann, was bei der großen Variabilität der Formen nicht ganz auszuschließen ist". Auch nach Noguchi kann man selbst dann, wenn die Kulturen mit dem Material typischer syphilitischer Läsionen des Menschen angelegt wurden und Spirochäten gewachsen sind, ohne das Tierexperiment dennoch solche Spirochätenkulturen nicht mit Sicherheit als reine Pallidakulturen bezeichnen, da in ihnen auch noch andere morphologisch der Pallida sehr nahestehende Spirochäten zugegen sein können. Es bleibt sich deshalb bei der Beurteilung der Pathogenität von Spirochätenkulturen gleich, ob den Autoren wirklich Reinkulturen oder nur Mischkulturen zur Verfügung gestanden haben. Von ausschlaggebender Bedeutung ist allein die Frage der Pathogenität. Läßt man die negativen Verimpfungsergebnisse außer Ansatz, die Schereschewsky, Mühlens, Levaditi, Uhlenhuth u. Mulzer, Arnheim, Grütz u. a. hatten, so haben positive Resultate nur wenige erzielt. Und unter ihnen noch verschiedene, deren Resultate nicht eindeutig waren. Die älteren Arbeiten zielen darauf hin, den Beweis zu führen für die ätiologische Rolle, die die Pallida bei der Syphilis spielt (Bruckner u. Galasesco, W. H. Hoffmann, Sowade). Von diesem Gesichtspunkt aus sind die meisten Arbeiten zu beurteilen, in denen versucht wurde, mit Spirochätenkulturen Syphilis experimentell bei Tieren zu erzeugen[1]). Daß man mit Spirochätenmischkulturen aus menschlichem Ausgangsmaterial beim Kaninchen eine syphilitische Orchitis erzeugen kann, bewiesen zuerst Bruckner u. Galasesco 1910, die durch Verimpfung von 1 ccm einer zweiten Kulturpassage auf einen Kaninchenhoden in diesem eine typische syphilitische Orchitis mit Spirochätenbefund erzeugen konnten. Da der nicht geimpfte Hoden ebenfalls syphilitisch erkrankte, kann man mit einiger Sicherheit annehmen, daß in der Kultur tatsächlich Pallidae enthalten waren. Ob es in ihr aber zu einer Vermehrung der Pallidae in der Kultur gekommen war oder ob es sich bei der kleinen Passagenzahl nur um konservierte Exemplare gehandelt hat, ist nicht entschieden worden. Nach unseren Erfahrungen kann man noch gut mit einer Konservierung rechnen, da zwischen der Abimpfung vom Ausgangsmaterial und der Verimpfung auf das Tier nur eine Frist von einem Monat lag.

1) Bei der zerstreut liegenden älteren Literatur will ich die beweisenden Befunde im Originaltext bzw. in Auszügen (s. Anhang) zum Abdruck bringen, sofern sie an Kaninchen ausgeführt wurden.

Die gleichen Bedenken, daß es sich nicht um kulturell vermehrte, sondern nur um konservierte Spirochäten handelt, müssen, wie bei Bruckner u. Galasesco (s. Anhang) auch bei Sowade (s. Anhang) geltend gemacht werden, der 1911 mit einer ersten Generation seiner Mischkultur eine „syphilitische Allgemeinerkrankung beim Kaninchen durch intrakardiale Kulturimpfung" erreichte. Sowade entkräftet zwar seine eigenen dahingehenden Bedenken durch die Tatsache, daß in dem zur Verimpfung kommenden Material zahllose Spirochäten gefunden wurden, „wie sie selbst bei den spirochätenreichsten Präparaten von menschlichem Substrat nicht annähernd beobachtet werden". Höher sind jedenfalls seine mit höheren Kulturgenerationen ausgeführten positiven Infektionsversuche zu bewerten, bei denen er 5mal einer ersten, 4mal einer zweiten und 1mal einer vierten Kulturgeneration das Infektionsmaterial entnahm. Sowade glaubt durch seine erfolgreichen Tierimpfungen mit Kulturspirochäten „die von verschiedenster Seite vermutete Avirulenz der Kulturspirochäten widerlegt" zu haben. Für unsere Untersuchungen sind die von Sowade von geringerer Bedeutung, als er sich hauptsächlich darauf beschränkte, an seinen Kaninchen und Affen durch intrakardiale bzw. intravenöse Infektion und durch Infektion in die Leber eine Allgemeinsyphilis zum Beweis für die Erregernatur der Pallida zu erzeugen. Nebenbei bemerkt, könnte man beim Studium von Sowades sehr ausführlichen Protokollen den Eindruck gewinnen, daß die Adaption von menschlichem Luesmaterial an Kaninchen mühelos gelingt. Daß dem nicht so ist, wird jeder bestätigen, der solche Übertragungen vorgenommen hat. Sowade gelang übrigens ebensowenig wie Bruckner u. Galasesco eine zweite Fortzüchtung ihrer Spirochäten in irgendeinem Nährboden.

Noguchi war dann der erste, der durch Verimpfung von Reinkulturenmaterial mit Erfolg typische syphilitische Läsionen bei Tieren erzeugte (s. Anhang). Er verwendete zwei vom Hodensyphilom des Kaninchens erhaltene Stämme der reingezüchteten Pallida als Infektionsmaterial und erhielt so bei einer Anzahl Kaninchen eine typische syphilitische Orchitis.

Es folgten dann 1911 W. H. Hoffmann (s. Anhang) und Shmamine (1912) (s. Anhang), die mit Spirochätenkulturen Kaninchen erfolgreich infizieren konnten. W. H. Hoffmann vermochte mit der 77. Passage der Mühlensschen Kultur wie mit einer eigenen Reinkultur eine syphilitische Orchitis beim Kaninchen hervorzurufen und aus ihr wieder eine Kultur durch Rückübertragung zu gewinnen. Über Versuche mit früheren Passagen seiner Reinkultur berichtet Mühlens, daß seine „sämtlichen Versuche, Tiere mit Kulturspirochäten syphilitisch zu infizieren, negativ ausfielen". Die meisten Kaninchen bekamen wohl Hodenanschwellungen, die jedoch bald erweichten und in ihrem Innern nur Bakterien enthielten. Die von W. H. Hoffmann als sehr wichtig angesprochene Applikation von großen Kulturmengen wandte auch Shmamine an. Trotzdem waren seine Versuche eine Zeitlang bei zahlreichen Tieren stets negativ. „In der Regel trat die Entzündung 1—2 Tage nach der Infektion auf, nach 5—15 Tagen bekamen die meisten der geimpften Kaninchen entweder allgemeine oder knotige, erbsen- bis walnußgroße Hodenanschwellungen, die entweder weicher wurden oder sich in käsige Massen umwandelten und mit Krustenbildung durchbrachen. Die richtige Induration fehlte gewöhnlich! Die Tiere lebten, nachdem die Erscheinungen an den Hoden abgeklungen waren, gewöhnlich recht lange oder „starben an einer Seuche unter Erscheinungen, die denen der Allgemeinsyphilis ähnlich sind: Abmagerung, Haarausfall, struppiges Haarkleid usw." „Doch konnte ich keine Spirochaeta pallida weder im Hodengewebe noch in den Eingeweiden finden", schließt Shmamine. Wegen der Verluste bei der intrakardialen und intravenösen Infektion hat Shmamine sich dann ausschließlich auf die Hodenimpfung beschränkt. Nach zahlreichen vergeblichen Versuchen, bei denen Shmamine die verschiedensten Impftechniken anwendete, gelang es ihm endlich, ein positives Resultat zu bekommen (s. Anhang). Shmamine konnte einen gezüchteten Pallidastamm bis in die zweite (!) Tiergeneration übertragen.

Ob die von Tomasczewski einem Kaninchen intravenös eingespritzte Mischkultur der 4. Generation eine sichere Allgemeinsyphilis erzeugte, muß auf Grund unserer Kenntnisse der intravenösen Infektionsversuche mit aus Schankern gewonnenen Spirochäten m. E. bezweifelt werden. Vor allem ist die nach 23 Tagen aufgetretene „erodierte Papel am Präputium mit positivem Spirochätenbefunde" nach Zeit und Ort eher für ein Symptom einer Spirochaeta cuniculi-Infektion zu deuten als für eine Erscheinung der Allgemeinsyphilis. Inwieweit die 1914 und 1919 bekanntgewordene originäre Kaninchenspirochätose bei den vor dieser Zeit ausgeführten Untersuchungen eine Rolle gespielt hat, wird sich heute leider nicht mehr feststellen lassen. Doch muß man bei ihrer seinerzeit starken Ausbreitung damit rechnen, daß sie das Untersuchungsbild mancher Forscher beeinflußt haben kann, vor allem derer, die sich zur Diagnose der Pallida nur des Mikroskopes bedienten. Daß Tomasczewski möglicherweise ähnliche Krankheitsprozesse beobachtet hat, geht aus seinem Protokoll (s. Anlage)

hervor, wenn er betont, daß das oben erwähnte positiv gewordene Tier „neu angekauft und von Beginn an in einem sorgfältig gereinigten Käfig allein untergebracht" war, ein anderes an der Anovaginalfalte eine erodierte Papel mit sehr zahlreichen Spirochäten aufwies. Eine Erscheinung, die auf das Bestehen der Kaninchenspirochätose schließen läßt.

Durch Verwendung einer hohen Passage der Reiterschen Reinkultur konnten Mulzer u. Nothhaas eine umschriebene Orchitis hervorrufen und die Weiterzüchtung im Kaninchen durch 5 Passagen fortsetzen, wie Mulzer 1927 mitteilte.

Schereschewsky infizierte mit der 2. und 3. Generation eines Kulturstammes, der aus einer extragenitalen, am Oberschenkel einer Frau gelegenen Papel in sterilem Pferdeserum gezüchtet war, Kaninchen an Augen und Hoden. Nach 12 Tagen trat bereits eine pralle Schwellung der Hoden auf. Im eitrigen Sekret konnten Spirochäten vom Pallidatypus, ohne sichtbare Beimengung anderer Bakterien, festgestellt werden.

Die 5 Wochen nach der Infektion beobachtete „typische Keratitis parenchymatosa ohne Pannusbildung", die Schereschewsky mit der Spirochätenwirkung seiner Pferdeserumkultur in ätiologischen Zusammenhang brachte, war ein Irrtum, wie Schieck es darlegt. Es ruft nämlich das Pferdeserum, ohne jede Beimengung, in der Keratitis anaphylactica die gleichen Veränderungen am Kaninchenauge hervor.

Neuere Untersuchungen auf dem Gebiet der Übertragbarkeit von Kulturspirochäten auf Tiere wurden in den letzten Jahren fast ausschließlich im Ausland angestellt. So hat Oganesjan (1931) mit einer Spirochätenmischkultur, die zwei Jahre auf dem Nährboden von Aristowski fortgezüchtet worden war, Kaninchen nicht infizieren können. Eine nach der Fortnerschen Plattenkulturmethode gewonnene Oberflächenkultur erwies sich O. ebenfalls nicht als pathogen. Eine besondere Bedeutung gewinnen die Mitteilungen von Gammel u. Ecker (1931), nach denen, da kein Laboratorium über eine virulente Pallidakultur verfügt, das Committee on Research in Syphilis, Cleveland/Ohio den Auftrag gab, Versuche in dieser Richtung zu unternehmen. In jahrelangen Versuchen mit über 100 Nährböden gelang es nicht, eine Pallidakultur zu erhalten, die länger als 48 Std. virulent blieb. Um Begleitbakterien tunlichst zu vermeiden und die Versuche auf breiterer Basis ausführen zu können, wurde als Ausgangsmaterial fast nur Tiermaterial gewählt, und zwar Hodenstückchen von Kaninchen mit Orchitis ohne Schankerbildung. In der Hauptsache wurden zwei eigene und der Nichols-Stamm verwendet. Nach den Verff. ist ein Nährboden, auf dem virulente Syphilisspirochäten regelmäßig gezüchtet werden können, unbekannt.

Ohya (1932) sah weder bei Kulturen, die auf Schereschewshyschem Nährboden aus Kaninchenmaterial gewonnen waren, noch bei Kulturen des Kroóschen Stammes eine Pathogenität für Tiere. Von Interesse für die Züchtbarkeit der Pallida mag die Beobachtung sein von Aksjanzew-

Malkin (1933), der in Oberflächenkultur verschiedene Pallidastämme (Noguchi-Kolmer, Nichols, Aristowsky-Hoeltzer I und II) züchten konnte, aber nicht den Truffi-Stamm aus Kaninchenhoden.

In lebenden Gewebskulturen kultivierten Kast u. Kolmer (1933) die Spirochaeta pallida und sahen bei zahlreichen Verimpfungen der Kulturen auf Kaninchenhoden niemals syphilitische Veränderungen. Den gleichen Autoren ist es aber (1933) unter sehr vielen vergeblichen Versuchen ein einziges Mal geglückt, aus einem Kaninchenschanker (Stamm Nichols-Hough) die Syphilisspirochäte zu züchten. Mit 4-, 7- und 14tägigem Kulturmaterial und ebenso mit den ersten Subkulturen wurden Kaninchen in den Hoden geimpft. Keines der Tiere zeigte innerhalb von 3 Monaten irgendwelche klinische Erscheinungen. In einem Falle aber ergab die Untersuchung der Popliteallymphknoten eines mit einer 4 Tage alten Kultur geimpften Kaninchens zahlreiche Spirochäten. 4 Wochen nach der Weiterverimpfung entstand eine syphilitische Orchitis, die die Ansicht der Verff. stützte, eine Vermehrung der Pallida erreicht zu haben.

E. Hoffmann u. Frohn, die eine direkte virulente Reinkultur von „ganz pallidaähnlichen Spirochäten" aus einem Kaninchensyphilom des Nichols-Stammes 1934 isolieren konnten, geben über den Tierversuch folgendes an: „Im Tierversuch entstanden bei einem weißen Kaninchenbock[1]) in beiden Hoden deutliche Knötchen nach etwa 30 Tagen; darin wurden auch im Schnitt typische Spirochaetae pallidae am 35. Tage nach der Überimpfung der 5. Passage der Reinkultur gefunden." Nach E. Hoffmann konnte „eine neue Reinkultur aus anderen geschlossenen Syphilomen aber nicht wieder gewonnen werden". „Ferner gelang es weder bei uns noch im Kolleschen und Jahnelschen Laboratorium mit weiteren Passagen unserer Reinkultur nochmals einen positiven Impferfolg bei Kaninchen zu erzielen, wohl aber wiesen sich an allen diesen Stellen die mit unserer Kultur geimpften Kaninchen als wohlempfänglich gegen Nachimpfung mit dem Nichols-Stamm." E. Hoffmann, der das einmalige positive Ergebnis nur als Zufallsbefund gedeutet wissen will, spricht diesem positiven Impferfolg keine Beweiskraft zu. So viel geht aber aus den in Tab. X zusammengefaßten Verimpfungen von Hoden und Lymphknoten des Kaninchen Nr. 504 hervor, daß in der Passage V der E. Hoffmannschen Spirochätenkultur pathogene und in rund 25 Tierpassagen weiterverimpfbare Pallidae enthalten waren.

Welferz will (1936) mit einer aus syphilitischen Patienten gewonnenen Spirochätenkultur neben negativen Verimpfungsresultaten einmal einen Primäraffekt erzielt haben, in dessen Reizserum Spirochäten jedoch nicht

1) Die 1934 in Bonn bei E. Hoffmann und in Frankfurt a. M. vom Verf. vorgenommenen Verimpfungen von Hoden und Lymphknoten dieses Tieres (Nr. 504) sind mit den an beiden Orten, in Bonn bis 1939, fortgeführten Passagen in Tab. X zusammengestellt. Herrn Prof. Grütz-Bonn, der mir, auf Veranlassung seines Vorgängers, die hierzu notwendigen Protokolle der Bonner Hautklinik zur Verfügung stellte, spreche ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

gefunden wurden. Crespel hat (1938) unter Benutzung der von Welferz angegebenen Kulturmethode aus Syphilitikerblut wohl eine Vermehrung der Spirochäten in einem (!) von 23 Versuchsröhrchen feststellen können, zur Prüfung der Virulenz 1 ccm der Kultur aber nur einer Maus unter die Rückenhaut gespritzt, über das Ergebnis der Weiterverimpfung von Leber und Milz der nach 1 Monat getöteten Maus aber nichts angegeben.

Mit Kulturspirochäten (Stamm Kazansky und Reiter) hat Kolessinskaja (1939) befruchtete Eier infiziert. Eine Änderung der Eigenschaften der Kulturspirochäten in Richtung einer etwaigen Virulenz trat aber, wie die Autorin mitteilt, nicht ein.

Grigorieff prüfte (1939) einen seiner beiden aus dem Blut Kranker mit seronegativer Lues gewonnenen reinen Spirochätenstämme auf seine Pathogenität hin. Die intravenöse Verimpfung der 5. Generation auf ein Kaninchen verursachte in 25 Tagen keinerlei Krankheitserscheinungen, wohl aber riefen Leber und Milz, die einem anderen Tier intraskrotal einverleibt wurden, bei diesem nach 4 Monaten eine typische Orchitis hervor. Der Lymphknotenbrei wurde die Ursache für eine Sklerose mit reichlichen Spirochäten und typischem histologischem Befunde nach 5 Monaten und eine nachfolgende generalisierte Syphilis. Von diesem Kaninchen entnommenes Material aus Sklerose und einem spät entstandenen Hodenknoten wurde 3 weiteren Tieren verimpft. Bereits nach einigen Wochen bildeten sich bei allen typische Schanker mit zahlreichen Spirochäten. Auch die Passage über Mäuse glückte. Der kultivierte Stamm entfaltete, nach des Verfassers Ansicht, nach einmaliger Kaninchenpassage volle pathogene Eigenschaften und bewahrte seine Virulenz auch nach der Passage durch eine weiße Maus.

Aus obiger Zusammenstellung geht zunächst hervor, daß die Spirochäten-Mischkulturen die Spirochäten-Reinkulturen zahlenmäßig überwiegen. Eine Tatsache, die im Erreger allein nicht ihre Erklärung finden kann. Nach unseren heutigen Kenntnissen und eigenen Erfahrungen sind ferner ausschlaggebend Ausgangsmaterial und Nährmedium. Ganz allgemein ist bei dem Anlegen von Spirochätenkulturen, wegen des gleichzeitigen Vorkommens von saprophytischen Spirochäten beim Menschen und ihrer gleichen Kultivierbarkeit, das Ausgehen von luetischen Läsionen des Menschen nicht zu empfehlen. Es kämen dann höchstens geschlossene Prozesse dafür in Frage und hier vor allem die Lymphknoten. Diese Ansicht haben Noguchi, E. Hoffmann u. E. Hofmann bereits vertreten. Nach ihrer Ansicht ist ein reines, aus der Tiefe völlig geschlossener Effloreszenzen, insbesondere den Lymphknoten entstammendes Ausgangsmaterial von großer Wichtigkeit für den Beweis der Reinheit einer Kultur. Stammt das Ausgangsmaterial aus Effloreszenzen, die saprophytische Spirochäten beherbergen können, so schließen auch alle Desinfektionsmethoden die Möglichkeit einer Mischkultur nicht aus. Bewährt hat sich seinerzeit das Ausgehen von einer Drüse Mühlens beim Anlegen einer

Kultur; er benutzte auf Anraten von E. Hoffmann die Drüse eines Sekundärsyphilitischen als Ausgangsmaterial für eine Spirochätenkultur und gewann dabei seine Reinkultur. Die Verwendung von Gewebsstücken führte bei Schereschewsky zum Entstehen einer Mischkultur.

Bei unseren Untersuchungen haben wir diese Tatsache weitgehendst bestätigen können und bezogen hinterher in den Kreis unserer kulturellen Versuche nur Lymphknoten oder geschlossene Hodensyphilome von Kaninchen ein. Ich halte zur generellen Klärung der Frage über die Gewinnung einer Reinkultur der Pallida für das erste Erfordernis, zunächst nur von Kaninchenmaterial auszugehen und auf die Züchtungsversuche aus menschlichem Material zu verzichten, weil dabei die Gefahr der Verunreinigung durch saprophytische Genitalspirochäten geringer, wenn nicht ganz ausgeschaltet ist. Ein weiterer ebenso wichtiger Grund wäre die unbegrenzt zur Verfügung stehende Menge von geschlossenen Prozessen und die Wahl der Terminbestimmung.

Ebenso wichtig wie das Ausgangsmaterial erscheint mir der Nährboden zu sein. Und zwar deshalb, weil die gebräuchlichsten Nährmedien Zusätze von Organstückchen einer Tierart enthalten. Wenn Erfahrungen darüber auch anscheinend nicht vorliegen, daß Spirochäten aus Organen solcher Tiere gezüchtet wurden, so gibt doch das Vorkommen von Spirochäten beim Kaninchen und beim Meerschweinchen (beim Kaninchen ist vor allem an das Treponema cuniculi zu denken, beim Meerschweinchen an drei in Deutschland bisher beobachtete Spirochätenarten) zu Bedenken Anlaß. Daß andere Spirochätenarten aus der Umwelt auch Eingang in den Tierkörper finden, mag nur nebenher erwähnt sein. Können die Nährmedien gekocht werden, wie die Tarozzi-Leberbouillon, so ist die Gefahr einer Infektion des Nährmediums durch saprophytische Spirochäten praktisch gebannt. Nährböden mit einer geringeren Erhitzung, vielleicht auch nach einer Pasteurisierung, dürften immerhin als verdächtig angesehen werden müssen, sofern sie Organstückchen enthalten. Aber auch bei der Verwendung besten Ausgangsmaterials und bester Nährmedien wird man der Züchtung von Pallidakulturen m. E. so lange nicht Herr werden, als man nicht die bei Bakterien bewährte Methode der Einzell-Kultur diesen Zwecken dienstbar macht. Die bisher beobachtete Vielgestaltigkeit der Formen in Spirochätenkulturen und die daraus resultierende Unmöglichkeit, auf Grund der Morphologie Differenzierungen vorzunehmen, geschweige denn die Pallida zu erkennen, sind die wesentlichste Grundlage für die Tatsache, daß „die Züchtung der Spirochaeta pallida zu den ungelösten Problemen der Mikrobiologie" gehört, wie Vásárhelyi es 1932 auf Grund seiner umfangreichen Arbeiten formulierte. Erst mit der Einzell-Kultur wird man die Grenzen zwischen Rein- bzw. Mischkultur erkennen können und einen Weg haben, auf dem man die Fragen der Züchtbarkeit und der Pathogenität direkt lösen kann. Solange man von dieser Möglichkeit keinen Gebrauch gemacht hat, werden alle Arbeiten und alle Mühen

immer nur erneut die Schwierigkeiten erkennen lassen, mit denen das Studium der Spirochätenkulturen verbunden ist.

Als Resultat aller mitgeteilten Untersuchungen, die auf Vollständigkeit wegen der schwierigen Beschaffung einzelner ausländischer Literatur leider keinen Anspruch erheben können, mit Spirochätenkulturen beim Kaninchen eine Syphilis zu erzeugen, muß leider festgestellt werden, daß es nur einigen Forschern gelang, in wenigen Passagen weiterverimpfbare syphilitische Prozesse beim Versuchstier zu erzeugen. Eindeutig gelungen scheint es zu sein W. H. Hoffmann mit dem Stamm Mühlens und seinem eigenen Stamm. Weiterhin Noguchi mit verschiedenen Stämmen und Mulzer u. Nothhaas mit dem Reiterschen Spirochätenstamm. E. Hoffmann u. Frohn mit dem Nichols-Stamm (1934) und aus der letzten Zeit (1939) Grigorieff, der, wie Shmamine, zwei Passagen im Kaninchen weiterzüchten konnte.

Wie sind nun diese positiven Übertragungsresultate zu bewerten, wenn man sich den heutigen Standpunkt in der Frage der Züchtbarkeit der Pallida (s. Jahnel, Vásárhelyi, Gammel u. Ecker) zu eigen macht? Tatsache ist, daß die in unseren Laboratorien befindlichen Spirochätenstämme des Pallidatypus für Tiere nicht pathogen sind. Und Tatsache ist auch (s. Anhang), daß mit Pallida-Kulturen syphilitische Prozesse bei Tieren hervorgerufen werden konnten. Ein Weg läßt sich nicht finden, diesen Widerspruch der beiden Tatsachen zu klären. Alle Vermutungen, welche Faktoren bei ihrem Zustandekommen geherrscht haben können, bringen keine Erklärung. Entweder sind alle Autoren, die über eine krankmachende Wirkung ihrer Spirochäten-Kulturen berichten, einer Täuschung zum Opfer gefallen oder es bestanden damals Bedingungen beim Erreger und im Nährboden, die heute nicht mehr reproduzierbar sind. Die erste Möglichkeit ist in Anbetracht des Namens der Autoren von der Hand zu weisen. Vom heutigen Standpunkt aus ist es nur zu bedauern, daß gegenseitige Nachprüfungen nicht vorgenommen wurden, so daß alle Resultate nur den Wert von Einzelergebnissen haben. Es war so, „daß ausgezeichnete Spirochätenkenner ihre Kulturen bezüglich ihrer Echtheit und Reinheit anzweifelten", wie E. Hoffmann u. E. Hofmann den Zustand darstellen. So bezweifelte z. B., ich folge den genannten Autoren, Noguchi die Kulturen von Mühlens und von W. H. Hoffmann, W. H. Hoffmann die von Sowade, Levaditi wieder die von Noguchi. Die andere Möglichkeit der nicht mehr reproduzierbaren Bedingungen muß man wohl auch ablehnen, da die Untersuchungen in den verschiedensten Gegenden der Welt und unter den verschiedensten Bedingungen und Zeiten ausgeführt wurden. Die Ursache für den Widerstreit der Tatsachen mag in den veränderten Gesichtspunkten zu suchen sein, unter denen die Ergebnisse gewertet wurden. Wir wissen heute, daß man bei der Vielgestaltigkeit der Kulturspirochäten mit dem Mikroskop allein weder Pallidae eindeutig erkennen, geschweige denn als mögliche Reinkultur gegen andere Spirochäten

abgrenzen kann. Und das Mikroskop war in der Frühzeit der Spirochätenkulturen das alleinige Beweismittel mit all seinen möglichen Fehlerquellen. W. H. Hoffmann meinte 1911 bereits, daß bei der „Unmöglichkeit, die Spirochaeta pallida an der Form allein unzweifelhaft als solche zu erkennen", dem Tierversuch „in zweifelhaften Fällen die entscheidende Bedeutung für den Nachweis der Spirochaeta pallida zukomme, wenn nicht ein färberisches oder auch ein Züchtungsverfahren gefunden wird, „um die Spirochaeta pallida von allen anderen und namentlich den in der Form ihr ähnlichen Spirochäten sicher zu unterscheiden" W. H. Hoffmanns Wünsche betr. solcher Methoden haben sich zwar nicht erfüllt, doch stehen dem heutigen Untersucher andere Mittel (Laufbilder, Mikromanipulator), vor allem die aus der experimentellen Syphilisforschung entwickelten Methoden des Tierversuches (Verimpfung von Lymphknoten, Superinfektion) und eine größere Kenntnis der pallidaähnlichen Spirochäten zur Verfügung.

Wenn man die Existenz von Pallida-Kulturen überhaupt ablehnt, so kommt man an der Frage nicht vorüber, wie es zu erklären ist, daß mit den sogenannten Pallida-Kulturen typische syphilitische Veränderungen beim Versuchstier erzeugt werden konnten. Hierfür gibt es m. E. nur eine Erklärung: Das unmöglich reine syphilitische Ausgangsmaterial hat sich infolge begünstigender Umstände in der Kultur in irgendeiner Form lebend gehalten, vielleicht sogar vermehrt, hat bei der Verimpfung auf das Tier eine krankmachende Wirkung entfalten können, ist abgestorben und dann von den lebenstüchtigeren, weil anspruchsloseren saprophytischen Spirochäten der Kultur überwuchert worden. Man hätte es also mit einer Konservierung des syphilitischen Ausgangsmaterials zu tun und nicht mit einer durch Kultur erreichten Vermehrung. Diese Erklärung wird den Tatsachen gerecht, daß alle sogenannten Pallida-Kulturen nach mehr oder weniger zahlreichen Passagen ihre Pathogenität verloren haben und sich doch fast mühelos jahrelang fortzüchten lassen, weil nur die Saprophyten noch vermehrungsfähig geblieben sind. Mit Annahme dieser Erklärung würde das Urteil gefällt sein über virulente, dann apathogen gemachte Spirochätenkulturen, sofern man ihre (verlorene) Virulenz als Beweis für ihre Pallida-Natur benutzt.

Eigene Untersuchungen.

Unser Beitrag zur Klärung der Frage über die Kulturspirochäten des Pallida-Typus bestand darin, daß wir Kulturstämme verschiedener Autoren an einem umfangreichen Tiermaterial auf ihre Pathogenität und Infektiosität hin prüften. Wir verfuhren dabei, um mögliche Einwände auszuschalten, so, daß wir zu den Versuchen nur die vom Autor uns direkt überlassenen Passagen verwerteten. Selbstverständlich haben wir von den uns überlassenen Kulturen, unter Verwendung der von den Autoren angegebenen speziellen Nährböden, Subkulturen angelegt, doch fanden sie auf meinen Vorschlag hin niemals Verwendung zu Pathogenitätsprüfungen. Es mag

hier erwähnt werden, daß wir die Angaben über die Brauchbarkeit der jeweiligen Nährböden im großen und ganzen bestätigt fanden zur Fortzüchtung der Spirochätenkulturen, doch haben wir mit keinem der angewandten Nährböden aus Kaninchensyphilomen oder Kaninchenlymphknoten unseres eigenen Tiermaterials einen neuen Stamm trotz vielfältiger Versuche herauszüchten können. Auf Grund unserer Erfahrungen bei der Herauszüchtung von Pallida-Stämmen aus menschlichem Material haben wir diese nur in kurzen Reihen zu kultivieren versucht. In der Hauptsache gingen wir aus den auch von anderen Autoren (Noguchi, E. Hoffmann) angegebenen Gründen lieber von dem Kaninchenmaterial aus, weil wir in ihm bessere Arbeitsbedingungen durch die größere Reinheit garantiert sahen.

Wir waren uns bewußt, daß wir bei Verwendung der überlassenen Kulturen u. a. den Unsicherheitsfaktor der Transportschädigung in unsere Rechnung mit hineinnahmen. Doch suchten wir diesen Fehler weitgehendst auszuschalten durch Vorsichtsmaßregeln (Transport der Kulturen in einer Thermosflasche durch Boten, Verwendung der Kulturen erst nach Brutschrankaufenthalt) und durch Kontrolle des Zustandes der Spirochäten nach Eingang, nach Brutschrankaufenthalt und vor der Verimpfung. Waren irgendwo bedeutende Schwankungen der Zahl, der Beweglichkeit oder im Aussehen festzustellen, so schieden diese Kulturen aus. Es war dies aber nur einmal der Fall.

Es würde den Rahmen dieser Veröffentlichung überschreiten, wenn ich alle von uns mit Kulturspirochäten vorgenommenen Untersuchungen aufführen würde. Da wir mit der Tatsache rechneten, daß die Spirochäten in ihrer Virulenz durch eine längere Passagenreihe abgeschwächt sein könnten, möchte ich mich nur auf die beiden Kulturstämme beschränken, die uns in verhältnismäßig jungen Passagen zur Verfügung standen. Es sind dies die Stämme von Hilgermann und E. Hoffmann. Beide Autoren haben uns in freundlichster Weise und zu jeder Zeit ihre Kulturen zur Verfügung gestellt. Wo die örtlichen Verhältnisse es gestatteten, wie im Falle E. Hoffmann, wurden alle unsere Wünsche in der Terminfestlegung berücksichtigt, so daß wir in jedem Falle mit einwandfreiem Material und ausgesuchtem Tiermaterial arbeiten konnten.

Für unsere Untersuchungen legten wir den Begriff Pathogenität in folgenden Forderungen fest:

Eine Spirochätenkultur vom Pallida-Typus ist pathogen, wenn sie, intratestikulär beim Kaninchen verimpft, in dem beimpften Kaninchenhoden spirochätenhaltige Prozesse erzeugt, die in Form und Konsistenz, makroskopisch und im Schnitt den Hodenveränderungen gleichen oder ähneln, die man durch Verimpfung der Spirochaeta pallida aus Kaninchenpassagen auf Kaninchenhoden erhält.

Wir haben, wie man sieht, die Frage der Pathogenität nicht gleichgesetzt mit der der Identität. Um diese zu erfüllen, hätten die erschienenen Prozesse sich in der bei der experimentellen Kaninchensyphilis angewandten

Methodik auf weitere Tiere gleicher Art einmalig oder in Passagen übertragen lassen müssen. Darüber hinaus hätte die Rückübertragung der in den veränderten Hodenpartien vorhandenen Spirochäten in ein Kulturmedium möglich sein müssen.

Unter ausgesuchtem Tiermaterial haben wir solche Kaninchen verstanden, deren Rasse, Alter, körperliche Beschaffenheit (guter Futterzustand, gut ausgebildete und unbeschädigte Hoden) uns erfahrungsgemäß die höchste Ausbeute an Hodensyphilomen zu garantieren schienen. Wie bei der experimentellen Kaninchensyphilis verwandten wir auch zu diesen Versuchen von Kaninchen die sogenannten Mittelrassen (verschiedene Silberkaninchen, Hermelin, Havanna), die sich als besonders empfänglich für Syphilis bewährt haben.

Die Pathogenitätsprüfung spielte sich in folgender Weise ab: Kaninchen bekamen in jedem Falle die Kulturemulsion intratestikulär eingespritzt. Da wir das Hodensyphilom als einen wichtigeren Beweis ansahen für die Pathogenität einer Kulturspirochäte als eine Allgemeinlues, haben wir auf jede andere Infektionsmethode verzichtet und wählten die mit dem größten Sicherheitsfaktor aus. Zu diesem Entschluß trug ferner die Überlegung bei, daß bei einer Hodeninfektion sich die beste Möglichkeit zu weiteren Passageimpfungen bietet. Die Tiere wurden dann in regelmäßigen Zeitabständen untersucht, ob sich an den Hoden Veränderungen zeigten. Wäre dies der Fall gewesen, so hätte der mikroskopische Spirochätennachweis das Angehen der Infektion beweisen müssen. Im Falle des Nichtangehens der Infektion wurden den Kaninchen, nach der bei der experimentellen Syphilis bewährten Methode, zum Nachweis einer latenten Infektion die verschiedenen Lymphknoten der einen Körperseite aus später zu erwähnenden Gründen exstirpiert und auf andere Kaninchen weiterverimpft. Verlief die Lymphknotenverimpfung in einer bestimmten Zeit negativ und fehlte somit der Beweis für das Vorliegen einer syphilitischen Infektion, so wurde das Ausgangstier mit einem unserer Pallidastämme superinfiziert. Für den Fall, daß die Superinfektion nicht anging, wurden dann zum Nachweis einer möglichen latenten Superinfektion die Lymphknoten der anderen Körperseite exstirpiert und auf weitere Kaninchen verimpft. Mit diesen Sicherungen glauben wir alles getan zu haben, um eine irgendwie haftende Infektion zu erfassen.

Als Infektionsdosis wählten wir zunächst je Hoden 0,3 ccm Kulturflüssigkeit, so daß jedes Tier mit 0,6 ccm intratestikulär infiziert wurde. Allmählich gingen wir dann auf je 0,5 ccm herauf, um möglichst viele Spirochäten zu erfassen. Die Massierung des Infektionsmaterials bis zu der genannten obersten Grenze erschien uns notwendig für den Fall, daß nur wenig lebensfähige Spirochäten in der Kultur vorhanden sein sollten. Die Dosis noch zu steigern, war bei der Größe der von uns verwandten Kaninchenrassen nicht zu verantworten, da wir das Untersuchungsergebnis durch unspezifische, sich bis zu Nekrosen steigernde Orchitiden nicht gefährden wollten.

Wenn W. H. Hoffmann aus dem genannten Grunde seinerzeit eine Verwendung ganz großer Dosen empfahl und 2—3 ccm einer dicken Kulturemulsion in das Hodengewebe einspritzte, so halte ich das für unmöglich, weil der Hodenkörper solch eine Menge gar nicht fassen kann. Daß man 2—3 ccm aber intraskrotal zu applizieren vermag, bezweifele ich nicht bei großrassigen Tieren.

Da die weiße Maus sich auch als geeignet für gewisse Syphilisstudien erwiesen hatte (Schlossberger), wurden beim Stamm Hilgermann auch diese Tiere verwandt. Und zwar ging Kolle dabei von der Überlegung aus, daß die in der Kultur möglicherweise abgeschwächten Spirochäten in der Maus, die selbst nicht manifest an Lues erkrankt, gewissermaßen angereichert werden könnten.

Hilgermannsche Kulturspirochäten.

Inwieweit unser Bestreben, möglichst junge Kulturen zu den Tierversuchen zu verwenden, bei den Hilgermannschen Kulturspirochäten geglückt ist, kann aus folgenden Gründen nicht beurteilt werden.

Hilgermann gibt in der für seine Spirochätenkulturen grundlegenden Veröffentlichung 1931 nur an, daß „es gelang, im Laufe der jahrelang fortgesetzten Nährbodenübertragung pathogenen Spirochätenstämmen ihre Virulenz zu nehmen". „Bei Prüfung im Tierversuch waren die gleichen virulenten Ausgangsstämme völlig apathogen geworden." Da Hilgermann seine Spirochätenstämme als „Originalkulturen aus Primäraffekten, Papeln in direkter Züchtung" bezeichnet, so kann man annehmen, daß seine Ausgangsstämme pathogen gewesen sind. Mindestens stammen sie aus pathogenem Material. Wann und nach wieviel Passagen sie „bei Prüfung im Tierversuch völlig apathogen geworden" sind, wissen wir nicht. Wir kennen auch nicht die Methodik, mit der Hilgermann arbeitete. Die von uns sofort nach Erscheinen seiner oben erwähnten Veröffentlichung erbetenen und uns bereitwilligst zugesandten Kulturen trafen am 15. IV. 1931 ein. Es waren die 17., 22., 33. und 40. Passage eines Stammes. Wir hatten erwartet, verschiedene Stämme zu bekommen, begnügten uns aber mit diesem einen, nicht näher bezeichneten Stamm. Auf unsere weitere Bitte nach anderen und möglicherweise jüngeren Kulturen erhielten wir am 8. VIII. 1931 eine Passage Nr. 4. Kolle unterließ es damals, die Differenz aufzuklären, ob es sich um eine junge Kultur eines weiteren Stammes oder eine alte Kultur des gleichen Stammes handelt, dessen ältere Passagen wir bereits in Händen hatten. Für unsere Arbeiten war es auch zunächst nicht wichtig, da wir nur Originalkulturen des Autors haben wollten. Diese Tatsachen müssen bei der Beurteilung der Versuche berücksichtigt werden. Weisungsgemäß wurden die in der ersten Sendung uns übermittelten Kulturen im Brutschrank bei 37° aufgehoben und am 17. Tage nach Eingang (2. V. 1931) von Kolle selbst geöffnet und mikroskopiert. Durch den Brutschrankaufenthalt wollte Kolle etwaige Transportschäden ausgleichen

und den Kulturen Zeit lassen, sich nötigenfalls zu regenerieren. Die am 8. VIII. 1931 eingetroffene Passage Nr. 4 wurde, nach 4tägigem Brutschrankaufenthalt, am 12. VIII. 1931 von mir geöffnet, in Gegenwart von Kolle, und von uns gemeinsam mikroskopiert.

Mikroskopische Ergebnisse:

Passage 17,	eingetroffen am 15. IV. 31: geöffnet am 2. V. 31	Wenig unbewegliche Spirochäten, Gewirr von Bakterienfäden.
Passage 22,	dgl.	Mäßig viel unbewegliche Spirochäten in verschiedener Länge. In Fäden liegende Stäbchen.
Passage 33,	dgl.	Spirochäten in verschiedenen Formen. Zahlreiche bewegliche und unbewegliche Bakterien. Spirochäten teilweise beweglich.
Passage 40,	dgl.	Verschieden lange unbewegliche Spirochäten in mäßiger Anzahl unter zahlreichen kürzeren und längeren Stäbchen.
Passage 4,	eingetroffen am 8. VIII. 31: geöffnet am 12. VIII. 31	Zwei unbewegliche Spirochäten im Präparat (1 Öse).

Mit diesen Kulturen, die, bis auf Passage Nr. 4, sämtlich Bakterien der verschiedensten Gestalt neben den beweglichen und unbeweglichen Spirochäten enthielten, wurden 16 Kaninchen im Direktversuch intratestikulär an beiden Hoden infiziert. Wie Tabelle I zeigt, haben diese Tiere in längstens 289 Tagen keine Erscheinungen an den Hoden oder Allgemeinerscheinungen gezeigt, die für das Haften einer syphilitischen Infektion hätten sprechen können. Auch die Sektion der 11 im Versuch gestorbenen Tiere bot keine Merkmale einer syphilitischen Infektion. Anzunehmen ist nur, daß die an einer Peritonitis eingegangenen Kaninchen Nr. 1492, 1498 und 5612 diese dem Gehalt des Infektionsmaterials an Bakterien zu verdanken haben. Bei den übrigen waren Pneumonien, Tympanitis und eine Enteritis die Todesursachen.

Den überlebenden Tieren (Tabelle II) wurden, zum Nachweis einer möglichen latenten Syphilisinfektion, nach den Methoden der experimentellen Kaninchensyphilis, die rechten Inguinal- und Popliteallymphknoten exstirpiert zu einer Zeit, als man mit dem Angehen einer Direktinfektion nicht mehr rechnen konnte. Wir beschränkten uns auf die Lymphknoten nur einer Seite, um die der anderen Seite für weitere Verimpfungen zur Verfügung zu haben. Die exstirpierten Lymphknoten wurden mit der Schere zerkleinert und weiteren 9 Kaninchen sk. an beiden Hoden appliziert. Bringt man die interkurrent eingegangenen Tiere in Abzug, so bleiben im Versuch 5 Tiere übrig, an denen sich in der bis zum 434. Tage ausgedehnten Beobachtungszeit an den Hoden keinerlei Symptome feststellen ließen, aus denen man auf eine Infektiosität der verimpften Lymphknoten hätte schließen können. Damit war der Beweis erbracht, daß die Verimpfung der Spirochätenkulturen auch keine latente Syphilis bei den Kaninchen der Tabelle I gesetzt hatte.

Tabelle I.

Pathogenität der Hilgermannschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.

a) Klinischer Befund.

M.-St.-Kan. Nr.	Infektion					Klinischer Befund in Tagen		Gestorben
	am	bds. intratest. mit je	Kulturpassage					
			Nr.	Ankunft	Öffnung	negativ	positiv	
1483	5. V. 31	0,3 ccm	40	15. IV. 31	2. V. 31	289		
1484	,,	,,	,,	,,	,,	289		
1485	,,	,,	,,	,,	,,	289		
1486	,,	,,	,,	,,	,,	93		†
1487	,,	,,	33	,,	,,	122		†
1488	,,	,,	,,	,,	,,	106		†
1489	,,	,,	,,	,,	,,	171		†
1490	,,	,,	,,	,,	,,	191		†
1491	,,	,,	22	,,	,,	280		
1492	,,	,,	,,	,,	,,	22		†
1493	,,	,,	,,	,,	,,	48		†
1494	,,	,,	,,	,,	,,	132		†
1495	,,	,,	17	,,	,,	281		
1496	,,	,,	,,	,,	,,	171		†
1497	,,	,,	,,	,,	,	281		
1498	,,	,,	,,	,,	,,	10		†
Tr.-Kan.-Nr.								
5610	12. VIII. 31	,,	4	8. VIII. 31	12. VIII. 31	212		
5611	,,	,,	,,	,,	,,	212		
5612	,,	,,	,,	,,	,,	15		†
5613	,,	,,	,,	,,	,,	212		

Tabelle II.

Pathogenität der Hilgermannschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.

b) Verimpfung von Lymphknoten zum Nachweis einer latenten Infektion.

Verimpfung der rechten Inguinal- und Popliteal-Lymphknoten							Gestorben
von M.-St. Kan. Nr.	infiziert mit Kulturpassage Nr	am	Tage nach der Infektion	auf Kaninchen Nr.	Ergebnis in Tagen		
					negativ	positiv	
1483	40	27. I. 32	267	M.-St. 1728	41		†
1484	,,	,,	267	,, 1729	362		
1485	,,	,,	267	,, 1730	33		†
1491	22	27. I. 32	267	M.-St. 1731	262		†
1495	17	28. I. 32	268	M.-St. 1732	361		
1497	,,	,,	268	,, 1733	291		
Tr.-Kan.-Nr.							
5610	4	25. I. 32	166	Tr. 5720	47		†
5611	,,	,,	166	,, 5721	434		
5613	,,	,,	166	,, 5722	434		

Tabelle III.

Pathogenität der HILGERMANNschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.

c) Superinfektion der mit Kulturspirochäten infizierten Kaninchen mit der Sp. pallida.

M.-St. Kan. Nr.	Infiziert mit Spirochäten-Kulturpassage Nr.	Superinfektion mit Schankerstückchen sk. an beiden Hoden							Gestorben
		am	Tage nach der		von		Ergebnis in Tagen		
			Kulturinfektion	Verimpfung d. Lymphknoten	Kan. Nr.	Sp. pallida-Stamm	negativ	positiv	
1483	40	18. II. 32	289	22	1692	M. St. XXII		49	
1484	,,	,,	,,	,,	,,	,,		78	
1485	,,	,,	,,	,,	,,	,,		49	
1491	22	9. II. 32	280	12	2477	Nichols		34	
1495	17	9. II. 32	280	12	2477	Nichols	1		†
1497	,,	,,	,,	,,	,,	,,		58	
Tr.-Kan.-Nr.									
5610	4	11. III. 32	212	45	5725	Truffi		28	
5611	,,	,,	,,	,,	,,	,,		28	
5613	,,	,,	,,	,,	,,	,,		56	

Tabelle IV.

Pathogenität der HILGERMANNschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.

d) Superinfektion der mit Lymphknoten von Kultur-Kaninchen infizierten Kaninchen mit der Sp. pallida.

M.-St. Kan. Nr.	Infiziert mit Lymphknoten von Kaninchen aus Kulturpassage Nr.	Superinfektion mit Schankerstückchen sk. an beiden Hoden					
		am	Tage nach der Infektion mit Lymphknoten	von		Ergebnis in Tagen	
				Kan. Nr.	Sp. pallida-Stamm	negativ	positiv
1729	40	24. I. 33	362	5880	Truffi		49
1732	17	24. I. 33	361	5880	Truffi		17
1733	,,	14. XI. 32	,,	2571	Nichols		16
Tr.-Kan.-Nr.							
5721	4	4. IV. 33	344	5919	Truffi		48
5722	,,	,,	,,	,,	,,		48

Als weitere Beweismethode wandten wir die in der experimentellen Syphilisforschung mit Erfolg angewandte Methode der Superinfektion an zum Nachweis einer möglichen Luesinfektion. Zu diesem Zwecke wurden die aus Tabelle I übrig gebliebenen 9 Kaninchen sk. an beiden Hoden mit Pallidamaterial aus Kaninchenschankern infiziert (Tabelle III). Um die Variationsbreite in Rücksicht auf die benutzte Spirochätenkultur zu vergrößern, wurde zur Superinfektion Schankermaterial von drei Pallidastämmen benutzt (Stamm M. St. XXII, Stamm Nichols, Stamm Truffi).

Nach Abzug eines am 1. Versuchstage interkurrent eingegangenen Tieres wurden die anderen 8 Kaninchen positiv und bekamen typische Hodensyphilome. Womit der Beweis geführt war, daß das zu ihrer Infektion (Tabelle I) benutzte Material Pallidae nicht enthalten haben konnte. Die in Tabelle II zusammengefaßten Kaninchen, denen die Lymphknoten der Ausgangstiere aus Tabelle I appliziert worden waren, wurden, um die Beweiskette zu schließen, ebenfalls mit Pallidastämmen (Stamm Nichols, Stamm Truffi) superinfiziert. Auch sie verhielten sich wie normale Kaninchen und bewiesen mit ihrem 100proz. Angehen der Schanker, daß sie frei von Syphilis waren. Mit diesem Versuch waren die der experimentellen Syphilisforschung zur Verfügung stehenden Methoden erschöpft. Weder der Direktversuch, noch die Verimpfung der Lymphknoten, noch die Superinfektion hatten den Beweis bringen können, daß die zur Untersuchung benutzten Spirochätenkulturen von HILGERMANN tierpathogene syphilitische Spirochäten enthalten haben.

Mit den 5 gleichen Kulturpassagen, die zur Infektion der Kaninchen verwandt wurden, erfolgte am selben Tage die Infektion von je 10 Mäusen. Es wurden demnach im ganzen in diesen Versuch 50 Mäuse eingesetzt. Jede Maus erhielt sk. 0,5 ccm der Spirochätenkultur. Von den 50 Mäusen starben interkurrent 2 der Passage 40, 2 der Passage 22 und 4 der Passage 4, so daß zur weiteren Untersuchung 42 Tiere übrig blieben (Tabelle V). Nach 252—350 Tagen wurden diese 42 Mäuse getötet. Ihre beiderseitigen Subiliakal- und Axillarlymphknoten wurden je einem Kaninchen sk. auf den rechten Hoden, ihre Gehirne auf den linken Hoden verimpft. Bringt man die im Laufe des Versuches gestorbenen 21 Tiere in Abzug, so bewies das Nichtangehen einer Infektion an den Hoden der übrigen 21 Tiere doch zur Genüge, daß sich in den Lymphknoten und im Gehirn der mit Spirochätenkulturen infizierten Mäuse keine Pallidae befunden haben. Die Methode der Superinfektion zum Nachweis einer syphilitischen Infektion kam auch bei den überlebenden 21 Kaninchen zur Anwendung. Aus Tabelle VI geht hervor, daß, nach Abzug eines interkurrent eingegangenen Tieres, 17 Tiere manifeste syphilitische Erscheinungen an den Hoden bekamen. Bei den Kaninchen Nr. 1912 und Nr. 1822 traten in 368 bzw. 369 Tagen keine Erscheinungen auf. Die positive Verimpfung ihrer beiderseitigen Inguinal- und Popliteallymphknoten auf je ein weiteres Kaninchen brachte den Beweis, daß sie sog. Nuller, also nur latent syphilitisch infiziert gewesen sind. Kaninchen Nr. 2356, das mit den genannten Lymphknoten von Kaninchen Nr. 1818 sk. an den Hoden infiziert worden war, starb interkurrent am 19. Tage nach der Impfung.

Auf den möglichen Einwand, daß wir mit zu hohen Passagen und zu alten Kulturen unsere Tierversuche ausgeführt haben, wäre zu erwidern, daß wir uns dabei von der Regenerationsfähigkeit der Spirochäten, wie

Tabelle V.

Pathogenität der HILGERMANNschen Spirochätenkulturen bei Mäusen.

a) Verimpfung von Subiliakal-, Axillarlymphknoten und Gehirn zum Nachweis einer latenten Infektion.

Maus Nr.	Infiziert sk. mit 0,5 ccm Kultur von		Bds. Subiliakal- und Axillarlymphknoten verimpft auf den rechten Hoden, Gehirn auf den linken Hoden					Gestorben
	Passage Nr.	am	am	Tage nach der Kulturinfektion	von M. St.-Kaninchen Nr.	Ergebnis in Tagen		
						negativ	positiv	
1972	40	5. V. 31	14. IV. 32	345	1795	314		
1973	,,	,,	,,	,,	1796	314		
1974	,,	,,	,,	,,	1797	314		
1975	,,	,,	,,	,,	1798	307		†
1976	,,	,,	,,	,,	1799	314		
1979	,,	,,	,,	,,	1800	264		†
1980	,,	,,	,,	,,	1801	272		†
1981	,,	,,	,,	,,	1802	314		
1982	33	5. V. 31	15. IV. 32	346	1803	313		
1983	,,	,,	,,	,,	1804	299		†
1984	,,	,,	,,	,,	1805	105		†
1985	,,	,,	,,	,,	1806	314		
1986	,,	,,	,,	,,	1807	263		†
1987	,,	,,	,,	,,	1808	314		
1988	,,	,,	,,	,,	1809	258		†
1989	,,	,,	,,	,,	1810	232		†
1990	,,	,,	18. IV. 32	348	1811	331		
1991	,,	,,	,,	,,	1812	331		
1993	22	5. V. 31	18. IV. 32	348	1813	233		†
1994	,,	,,	,,	,,	1814	331		
1996	,,	,,	,,	,,	1815	332		
1997	,,	,,	,,	,,	1816	332		
1998	,,	,,	,,	,,	1817	332		
1999	,,	,,	,,	,,	1818	332		
2000	,,	,,	19. IV. 32	349	1819	206		†
2001	,,	,,	,,	,,	1820	109		†
2002	17	5. V. 31	19. IV. 32	349	1821	331		
2003	,,	,,	,,	,,	1822	331		
2004	,,	,,	,,	,,	1823	9		†
2005	,,	,,	,,	,,	1824	41		†
2006	,,	,,	,,	,,	1825	29		†
2007	,,	,,	,,	,,	1826	331		†
2008	,,	,,	20. IV. 32	350	1827	142		†
2009	,,	,,	,,	,,	1828	180		†
2010	,,	,,	,,	,,	1829	310		
2011	,,	,,	,,	,,	1830	313		
2092	4	12. VIII. 31	20. IV. 32	252	1832	313		
2095	,,	,,	,,	,,	1833	313		
2096	,,	,,	,,	,,	1834	86		†
2097	,,	,,	,,	,,	1835	195		†
2098	,,	,,	,,	,,	1836	37		†
2100	,,	,,	,,	,,	1837	195		†

eingangs erwähnt, leiten ließen, die wir oft feststellen konnten. Nach RUKAWISCHNIKOWA soll die Spirochaeta pallida im künstlichen Nährboden

Tabelle VI.

Pathogenität der HILGERMANNschen Spirochätenkulturen bei Mäusen.

b) Superinfektion mit Sp. pallida der mit Lymphknoten und Gehirn von Kulturmäusen infizierten Kaninchen.

M.-St.-Kan. Nr.	Negativ infiziert mit bds. Subiliakal- u. Axillarlymphknoten und Gehirn von		Superinfiziert mit Schankeremulsion bzw. Schankerstückchen								Gestorben
	Maus Nr.	am	am	Tage nach der Infektion	sk.	intratest.	von		Ergebnis in Tagen		
							Kan. Nr.	Sp. pallida-Stamm	negativ	positiv	
1795	1972	14. IV. 32	22. II. 33	314		intratest.	2069	M.-St. I		58	
1796	1973	,,	,,	,,		,,	,,	,,		58	
1797	1974	,,	,,	,,		,,	,,	,,		58	
1799	1976	,,	,,	,,		,,	,,	,,		58	
1802	1981	,,	,,	,,		,,	,,	,,		58	
1803	1982	,,	,,	,,		,,	,,	,,		58	
1806	1985	15. IV. 32	23. II. 33	,,		,,	2074	M.-St.III		57	
1808	1987	,,	,,	,,		,,	,,	,,		57	
1811	1990	18. IV. 32	,,	311		,,	,,	,,		57	
1812	1991	,,	,,	,,		,,	,,	,,	369*		
1814	1994	,,	,,	,,		,,	,,	,,		57	
1815	1996	,,	,,	,,		,,	,,	,,		88	
1816	1997	,,	24. II. 33	310		,,	2084	M.St.XIII		56	
1817	1998	,,	,,	,,		,,	,,	,,		56	
1818	1999	,,	,,	,,		,,	,,	,,	368*		
1821	2002	19. IV. 32	,,	309		,,	,,	,,		56	
1822	2003	,,	,,	,,		,,	,,	,,	368*		
1829	2010	20. IV. 32	,,	308		,,	,,	,,		56	
1830	2011	,,	27. II. 33	313	sk.		5907	Truffi		15	
1832	2092	,,	,,	,,	,,		,,	,,	13		†
1833	2095	,,	,,	,,	,,		,,	,,		56	

* Bei Kaninchen Nr. 1812 und Nr. 1822 wurde die syphilitische Infektion durch positive Verimpfung der beiderseitigen Inguinal- und Popliteallymphknoten nach 217 bzw. 105 Tagen festgestellt an M.-St.-Kaninchen Nr. 2355 und 2357.

Kaninchen Nr. 2356, infiziert mit den genannten Lymphknoten von Nr. 1818 starb interkurrent am 19. Tage.

ohne Überimpfung sogar über ein Jahr ihre Fortpflanzungsfähigkeit behalten. Wie alt die HILGERMANNsche Kultur in der „jahrelang fortgezüchteten Nährbodenübertragung" war, als wir sie erhielten, wissen wir genau so wenig wie das Alter der einzelnen Passagen. Für uns erschien das Vorhandensein von Spirochäten überhaupt wichtig. Zudem schließen nach unseren mit der Pallida vom Kaninchenschanker gewonnenen Erfahrungen selbst unbeweglich erscheinende Spirochäten eine Infektiosität nicht aus. Da wir jeweils nur eine Öse mikroskopierten, können Angaben nicht gemacht werden, in welchem Verhältnis unbewegliche und bewegliche Spirochäten in dem zur Verimpfung kommenden Gesamtmaterial vorhanden waren.

E. Hoffmannsche Kulturspirochäten.

Die E. Hoffmannschen Kulturspirochäten wurden mit den gleichen Methoden auf ihre Pathogenität und Infektiosität hin geprüft wie die Hilgermannschen. Nur wurde von den Mäuseversuchen Abstand genommen. Obwohl heute kein Zweifel mehr besteht, daß die von E. Hoffmann u. Frohn (1934) gezüchtete Spirochäte, aus einem mit dem Nichols-Stamm infizierten Kaninchen, keine Pallida ist — E. Hoffmann selbst hat sie als Nicht-Pallida erkannt und bezeichnet —, sollen die Untersuchungen über diesen Kulturstamm hier doch Platz finden, da wir damit einen weiteren Beitrag liefern können zur Frage der Entstehung von sog. Pallidakulturen und gleichzeitig einen Beweis für die Richtigkeit der von uns bei der Hilgermannschen Spirochätenkultur angewandten Methodik. Die E. Hoffmannsche Kultur läßt bindende Schlüsse zu auf das Alter der uns zur Verfügung gestellten Passagen. Wir erhielten zur Bearbeitung die wahrscheinlich 16., die 29. und die 36. Passage. Da E. Hoffmann u. Frohn angeben, daß sie die Kulturen alle 2—3 Tage überimpft haben, wäre das Alter der ältesten in unseren Händen befindlich gewesenen Kulturpassage mit höchstens 48, das der jüngsten mit höchstens 108 Tagen anzusetzen. Bei der mikroskopischen Untersuchung der uns überlassenen, in der Hoffmannschen Klinik angelegten Kulturen sowie der von uns über lange Zeit und in größeren Zeitabständen fortgeführten Passagen konnten wir zunächst das Freisein von jeglichen anaeroben und aeroben bakteriellen Keimen feststellen. Die E. Hoffmannsche Kultur war also eine Spirochäten-Reinkultur. In dieser Tatsache können wir einen Beweis sehen für die auch von uns vertretene Ansicht, daß nur das Ausgehen von Syphilomen des Kaninchens, und zwar von möglichst geschlossenen, aus dem auch die E. Hoffmannsche Kultur stammt, wirklich Aussicht auf den Erfolg hat, eine Reinkultur zu bekommen. In morphologischer Hinsicht konnten wir bei unseren Untersuchungen die Angaben von E. Hoffmann bestätigen.

Tabelle VII.
Pathogenität der Hoffmannschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.
a) Klinischer Befund.

M.-St.-Kan. Nr.	Infektion					Klinischer Befund in Tagen		Gestorben
	am	bds. intratest. mit je	Kulturpassage					
			Nr.	Ankunft	Öffnung	negativ	positiv	
2419	25. I. 34	0,5 ccm	16?	25. I. 34	25. I. 34	530		
2420	,,	,,	,,	,,	,,	530		
2421	,,	,,	,,	,,	,,	530		
2422	,,	,,	,,	,,	,,	177		†
2423	,,	0,6 ccm	,,	,,	,,	532		
2424	,,	,,	,,	,,	,,	532		
2433	10. II. 34	0,4 ccm	29	10. II. 34	10. II. 34	135		†
2434	,,	,,	,,	,,	,,	515		
2435	,,	,,	,,	,,	,,	515		
2436	,,	,,	,,	,,	,,	515		
2473	9. III. 34	0,4 ccm	36	9. III. 34	9. III. 34	392		
2474	,,	,,	,,	,,	,,	341		†

Tabelle VIII.
Pathogenität der Hoffmannschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.
b) Verimpfung von Lymphknoten zum Nachweis einer latenten Infektion.

Verimpfung der bds. Inguinal- und Popliteal-Lymphknoten							Gestorben
von M.-St. Kan. Nr.	infiziert mit Kulturpassage Nr.	am	Tage nach der Infektion	auf Kaninchen Nr.	Ergebnis in Tagen		
					negativ	positiv	
2419	16?	25. VII. 34	181	M.-St. 2552	43		†
2420	,,	,,	,,	,, 2553	299		
2421	,,	,,	,,	,, 2554	299		
2423	,,	,,	,,	,, 2555	172		†
2424	,,	,,	,,	,, 2556	299		
2434	29	26. VII. 34	166	M.-St. 2558	109		†
2435	,,	,,	,,	,, 2559	298		
2436	,,	,,	,,	,, 2660	160		†
2473	36	5. IV. 35	392	M.-St. 2699	185		†

Tabelle IX.
Pathogenität der Hoffmannschen Spirochätenkulturen bei Kaninchen.
c) Superinfektion der mit Kulturspirochäten infizierten Kaninchen mit der Sp. pallida.

M.-St. Kan. Nr.	Infiziert mit Spirochäten-Kulturpassage Nr.	Superinfektion mit Schankerstückchen bzw. -Emulsion sk. und intratest. an beiden Hoden								
		am	Tage nach der		sk.	intratest.	von		Ergebnis in Tagen	
			Kulturinfektion	Verimpfung d. Lymphknoten			Kan. Nr.	Sp. pallida-Stamm	negativ	positiv
2419	16?	9. VII. 35	530	349	sk.		2916	Nichols		37
2420	,,	,,	,,	,,	sk.		,,	,,	315	
2421	,,	,,	,,	,,	sk.		,,	,,		37
2423	,,	11. VII. 35	532	351		intratest.	2731	M.-St. XXII		35
2424	,,	,,	,,	,,		intratest.	,,	,,		35
2434	29	10. VII. 35	515	349	sk.		561	T—N		70
2435	,,	,,	,,	,,	sk.		,,	,,		70
2436	,,	,,	,,	,,	sk.		,,	,,		70

Die in Tabelle VII niedergelegten Infektionsversuche zeigen ein Hinaufgehen mit der Infektionsdosis gegenüber denen der Tabelle I. Es war dies bedingt durch die Größe der Versuchstiere und Reinheit des Materials. Von den 12 Kaninchen blieben im Direktversuch alle erscheinungsfrei. Auch die bereits am 135. und 177. Tage interkurrent gestorbenen Kaninchen hatten lange genug gelebt, um ein Haften der In-

fektion erkennen zu lassen, wenn man den bei der experimentellen Syphilis gewonnenen Maßstab anlegt. Die Verimpfung der beiderseitigen Inguinal- und Popliteallymphknoten (Tabelle VIII) verlief ebenfalls bei allen Tieren negativ. In Abzug bringen müßte man das vorzeitig gestorbene Tier Nr. 2552, das bereits am 43. Tage ausschied. Die Superinfektion der Ausgangstiere (Tabelle IX) hatte zum Ergebnis, daß von den 8 Tieren 7 Stück einen typischen Hodenschanker bekamen. Nur Kaninchen Nr. 2420 blieb erscheinungsfrei. Die Verimpfung seiner Lymphknoten und die Superinfektion unterblieben. Aber auch ohne diese dürfte der Beweis erbracht sein, daß die Superinfektion ein positives Ergebnis hatte.

Eine Veröffentlichung der gesamten Versuchsprotokolle erscheint bei den zusammengefaßten Tabellen nicht mehr notwendig. Protokollauszüge von den zuletzt behandelten Tieren aus Tabelle IX mögen hier folgen und als Maßstab gelten für die Sicherheit einer der angewandten Methoden, der Superinfektion.

Kan. Nr. 2419.

9. 7. 1935. Superinf. bds. sk. mit Schankerstückchen von Nichols-Kan. Nr. 2916.
13. 8. 1935. Bds. haselnußgroße Schanker.
15. 8. 1935. Spirochätennachweis: Bds. Sp. +++ gut beweglich.

Kan. Nr. 2420.

9. 7. 1935. Superinf. wie Kan. Nr. 2419.
13. 8. 1935. Bds. walnußgroße, trockene Schanker.
15. 8. 1935. Spirochätennachweis: Bds. Sp. +++ gut beweglich.

Kan. Nr. 2423.

9. 7. 1935. Superinf. bds. intratest. mit Schankeremulsion von M. St.-Kan. Nr. 2731.
13. 8. 1935. Bds. haselnußgroße Schanker.
15. 8. 1935. Spirochätennachweis: Bds. Sp. +++ gut beweglich.

Kan. Nr. 2424.

9. 7. 1935. Superinf. wie Kan. Nr. 2423.
13. 8. 1935. Bds. haselnußgroße Schanker.
15. 8. 1935. Spirochätennachweis: Rechts Sp. ++ gut beweglich.
Links Sp. +++ „ „

Kan. Nr. 2434.

10. 7. 1935. Superinf. bds. sk. mit Schankerstückchen von T/N-Kan. Nr. 561.
13. 8. 1935. Rechts vereitert, links o. B.
16. 9. 1935. Bds. pflaumengroß, trocken.
18. 9. 1935. Spirochätennachweis: Bds. Sp. +++ gut beweglich.

Kan. Nr. 2435.

10. 7. 1935. Superinf. wie Kan. Nr. 2434.
13. 8. 1935. Rechts vereitert, links o. B. Links haselnußgroßer Schanker.
16. 9. 1935. Rechts o. B.
18. 9. 1935. Spirochätennachweis: Links Sp. +++ gut beweglich.

Kan. Nr. 2436.

10. 7. 1935. Superinf. wie Kan. Nr. 2434.
13. 8. 1935. Rechts o. B. Links vereitert.
16. 9. 1935. Bds. walnußgroße, trockene Schanker.
18. 9. 1935. Spirochätennachweis: Bds. +++ gut beweglich.

Tabelle X.

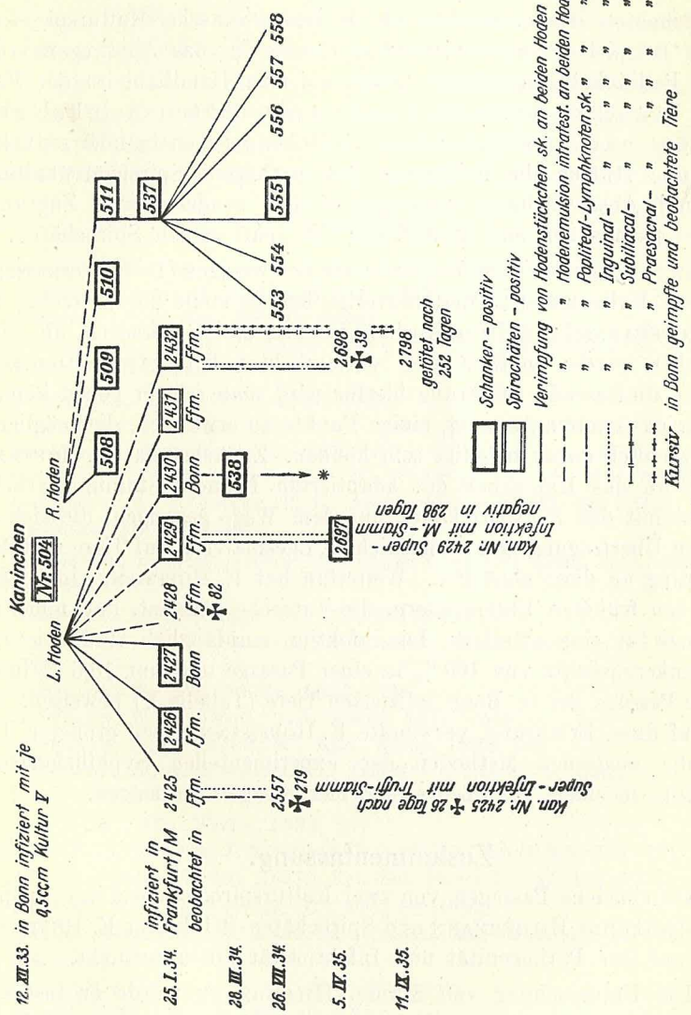


Abb. 1.

* „vom 28. III. 34 bis 25. V. 39 laufend in 23 Passagen weitergeführt, und zwar abwechselnd durch Impfung von Schankermaterial und Popliteallymphknoten, dann abgebrochen wegen Tiermangel."
(Mitteilung von Prof. Grütz-Bonn.)

Auch bei der E. Hoffmannschen Spirochätenkultur liefert der negative Ausfall der Direktinfektion, der Lymphknotenverimpfung und der Superinfektion, wie bei der Hilgermannschen Kultur, den Beweis, daß zumindest

von der 16. Kulturpassage ab tierpathogene syphilitische Spirochäten in den Kulturen nicht enthalten waren.

Die Tatsachen, daß die 5. Kulturpassage (s. Tab. X) noch virulente, in rund 25 Tierpassagen weiterübertragbare Spirochäten enthielt und daß die späteren Kulturpassagen nach den in Bonn, München und Frankfurt a. M. vorgenommenen Untersuchungen (s. S. 56) apathogen waren und sich jahrelang fortzüchten lassen, machen die E. Hoffmannsche Kulturspirochäte zu einem Beispiel der oben erwähnten Theorie für das Apathogenwerden der sog. Pallidakulturen. Ferner geben sie eine Handhabe zu der Feststellung, daß selbst mikroskopische Spirochäten-Reinkulturen pathogene und apathogene Spirochäten nebeneinander enthalten können und stützen die Erklärung, daß pathogene Spirochätenkulturen nicht durch Abschwächung apathogen werden, sondern durch Zugrundegehen der pathogenen und Weiterleben der apathogenen Spirochäten.

Wenn es bisher nur möglich war, in einigen wenigen (1—5) Tierpassagen pathogenes Kulturmaterial weiterzuverimpfen, so stellt die Tatsache, daß die E. Hoffmannsche Kulturspirochäte in rund 25 Tierpassagen, die leider abgebrochen werden mußten, sich weiterzüchten ließ, etwas Einmaliges dar. Eine umfassende Erklärung hierfür wird man schwer geben können, doch scheint es mir notwendig, einige Punkte zu erwähnen, die möglicherweise ursächlich daran beteiligt sein können. Zunächst hat E. Hoffmann mit dem an das Kaninchen gut adaptierten Nichols-Stamm gearbeitet und ist damit den Schwierigkeiten aus dem Wege gegangen, die sich bei der ersten Übertragung von menschlichem Luesmaterial auf Tiere und ihrer Adaptierung an diese einstellen. Weiterhin hat E. Hoffmann, im Gegensatz zu den früheren Untersuchern, die Tatsache gekannt, daß nicht alle Kaninchen für eine manifeste Luesinfektion empfänglich sind, wie z. B. die Schankerausbeute von 100 % in einer Passage und nur 16,6 % in der nächsten Passage der in Bonn infizierten Tiere (Tabelle X) beweisen. Gestützt auf diese Erfahrung, verwandte E. Hoffmann neben größeren Tierreihen die modernen Methoden der experimentellen Syphilisforschung und konnte so einem Abreißen seiner Tierpassagen vorbeugen.

Zusammenfassung.

1. Verschiedene Passagen von zwei Kulturspirochätenstämmen (Spirochätenmischkultur Hilgermann und Spirochäten-Reinkultur E. Hoffmann) wurden auf ihre Pathogenität und Infektiosität hin untersucht.

2. Die Untersuchung von Stamm Hilgermann wurde an insgesamt 74 Kaninchen und 50 Mäusen, die von Stamm E. Hoffmann an 21 Kaninchen ausgeführt.

3. Im Direktversuch ließen sich bei intratestikulärer Applikation in längstens 532 Tagen keinerlei Erscheinungen am Kaninchen feststellen, die auf eine syphilitische Infektion hätten schließen lassen können.

4. Die Verimpfung von Lymphknoten bzw. Gehirn der Kaninchen und Mäuse auf normale Kaninchen bewies durch ihren negativen Ausfall, daß die verimpften Spirochätenkulturen keine latente Syphilis bei Kaninchen und Mäusen verursacht hatten.

5. Die mit verschiedenen echten Pallidastämmen vorgenommene Superinfektion war bei allen kulturinfizierten Tieren positiv und bewies, da die superinfizierten Tiere sich wie normale infizieren ließen, das Fehlen jeglicher syphilitischen Infektion durch die Kulturspirochäten.

6. Die im Tierversuch geprüften Spirochätenkulturstämme Hilgermann und E. Hoffmann waren in allen untersuchten Passagen für Kaninchen apathogen und zeigten nicht das für die Spirochaeta pallida spezifische Verhalten.

Schrifttum.

1) Aksjanzew-Malkin, S., Zbl. Bakter. I Orig. **129**, 405 (1933).
2) Angelberger, E., Wien. klin. Wschr. **1937**, 259.
3) Arnheim, G., Z. Hyg. **76**, 407 (1914).
4) Benedek, L., Mschr. Psychiatr. **1934**, 88; zit. nach Spitzer, L., Münch. med. Wschr. **1934**, 1967.
5) Brecher, I., Klin. Wschr. **1936**, 1319.
6) Bruckner, I., u. Galasesco, P., C. r. Soc. Biol. Paris **68**, 684 (1910).
7) Bruder, K., Dermat. Wschr. **107**, 1467 (1938); **110**, 173 (1940).
8) Crespel, C., Arch. Inst. Prophyl. **9**, 87 (1937); Ref. Zbl. Hyg. **41**, 516 (1938).
9) Gammel, J. A., u. Ecker, E. E., Arch. of Dermat. **23**, 439 (1931); Ref. Zbl. Hautkrkh. **38**, 816 (1931).
10) Grigorieff, P., Vest. Venerol. i. Dermat. (Russisch) **1939**, 82; Ref. Zbl. Hyg. **44**, 664 (1939).
11) Grütz, O., Arch. Dermat. (D.) **147**, 337 (1924).
12) Hilgermann, R., Dtsch. med. Wschr. **1931**, 488; Münch. med. Wschr. **1935**, 1760.
13) Hoffmann, E., Klin. Wschr. **1934**, 1540.
14) Hoffmann, W. H., Dtsch. med. Wschr. **1911**, 1546.
15) Hoffmann, E., u. Frohn, W., Klin. Wschr. **1934**, 206.
16) Hoffmann, E., u. Hofmann, E., Jadassohns Handb. d. Haut- u. Geschlechtskrankh. **15**/I, 1 (1927).
17) Jahnel, F., Klin. Wschr. **1934**, 550.
18) Kast, C., u. Kolmer, J. A., Amer. J. Syph. **17**, 529 (1933); Ref. Zbl. Hautkrkh. **47**, 614 (1934); **17**, 533 (1933); Ref. Zbl. Hautkrkh. **47**, 615 (1934).
19) Kertész, G., Arch. Dermat. (D.) **174**, 84 (1936).
20) Kollessinskaja, L., Z. Mikrobiol. (Russisch) **68**, 64 (1939); Ref. Zbl. Hyg. **44**, 664 (1939).
21) Levaditi, C., C. r. Acad. Sci. **171**, 410 (1920).
22) Mühlens, P., Klin. Jb. **23**, 339 (1910).
23) Mulzer, P., Jadassohns Handb. d. Haut- u. Geschlechtskrkh. **15**/I, 115 (1927).
24) Mulzer, P., u. Nothhaas, R., zit. nach Mulzer, P.
25) Neuber, E., Dermat. Wschr. **98**, 229 (1934).
26) Noguchi, H., Münch. med. Wschr. **1911**, 1551; J. exper. Med. (Amer.) **14**, 105 (1911); **15**, 90 (1912); Wien. med. Wschr. **1913**, 2664.

27) Oganesjan, P., Vrac. Delo (Russisch) **12**, 795 (1929); Ref. Zbl. Hautkrkh. **37**, 508 (1931); Borba vener. Bol. (Russisch) **1932**, 291; Ref. Zbl. Hautkrkh. **46**, 492 (1933).
28) Ohya, Z., Acta dermat. (Kyoto) **19**, 119 u. 172 (1932); Ref. Zbl. Hyg. **42**, 635 (1932); **43**, 326 (1933).
29) Rukawischnikowa, E., Sovet. Vest. Venerol. i. Dermat. **3**, 818 (1934); Ref. Zbl. Hautkrkh. **50**, 522 (1935).
30) Schereschewsky, J., Dtsch. med. Wschr. **1909**, 1260; **1929**, 17.
31) Schieck, F., Dtsch. med. Wschr. **1914**, 2039.
32) Schlossberger, H., Arb. Staatsinst. exper. Ther. usw. Frankf./M. **1928**, H. 21 344; Med. Klin. **1929**, 307.
33) Shmamine, T., Zbl. Bakter. I Orig. **65**, 311 (1912).
34) Sowade, H., Arch. Dermat. (D.) **114**, 247 (1913)
35) Spitzer, L., Münch. med. Wschr. **1932**, 1990; **1934**, 1967; Schweiz. med. Wschr. **1938**, 1017.
36) Tomasczewski, E., Berl. klin. Wschr. **1912**, 792.
37) Uhlenhuth, P., u. Mulzer, P., zit. nach Mulzer, P.
38) Vásárhelyi, J. v., Zbl. Bakter. I Orig. **124**, 365 (1932).
39) Welferz, G., Bull. Soc. franc. Dermat. **43**, 1065 (1936); Ref. Zbl. Hautkrkh. **55**, 68 (1937).
40) Zieler, K., Dermat. Wschr. **110**, Nr 19, 373 (1940).

Anhang.

Bruckner, I., et Galasesco, P., Orchite syphil. chez le lapin par cultures impures de spirochètes. (C. r. Soc. Biol. Paris **68**, 684, 1910.)

„Vingt-quatre heures après, le testicule avait doublé de volume, sa consistance avait augmenté, et la peau qui le recouvrait était rouge et chaude. Les jours suivants, le testicule a diminué progressivement de volume, la peau a repris sa coloration nouvelle, et, à la fin de la semaine, rien ne faisait soupçonner l'inoculation subie.

Après deux mois environ, les deux testicules sont devenus plus durs, et, soixante-dix jours après l'inoculation, nous observâmes un œdème mou, gélatineux, enveloppant des deux testicules: l'œdème grandit très vite, et par ponction nous avons retiré une abondante sérosité citrine, transparante, qui contenait, à côté de quelques globules rouges et de quelques leucocytes, d'innombrables spirochètes typiques comme forme, dimensions et colorabilité."

Sowade, H., Die Kultur der Sp. pallida und ihre experimentelle Verwertung. (Arch. Dermat. [D.] **114**, 247, 1913.)

„Kaninchen 51. Albino, ausgewachsen, weiblich, zur Zeit tragend, 1. XII. 10 mit 4 ccm spirochätenreicher verflüssigter Kultur B 2 intrakardial geimpft. . . . 10. XII. 10. Wirft 4 ausgetragene kräftige Albinos. . . . 2. III. 11: Das Tier zeigt an der Innenfläche beider Löffel ein kleinpapulöses, spärliches Exanthem, ein derbes, papulöses Infiltrat an der Druckstelle des Nummernknopfrandes im Ohr, strichförmige Infiltrate im Verlauf einzelner feiner Ohrvenen (Spirochätenembolie?). Im Dunkelfeld zeigt das Reizserum einer Papel Spirochaetae pallidae, ebenso Ausstriche nach Giemsa gefärbt, auch im Schnitt (Silberimprägnation) Spirochaetae pallidae nachweisbar. Bis 20. III. 11 status idem. An diesem Tage wird festgestellt: Vermehrung der papulösen Effloreszenzen auf der Innenfläche beider Löffel, fortgeschrittene strichförmige Infiltrate im Verlauf der Ohrvenen, zahlreiche bis linsengroße derbe Infiltrate am freien Rand beider Löffel, ganz vereinzelte stecknadelkopfgroße, zum Teil leicht

schuppende Papeln auch auf der Außenseite der Löffel. An der linken Löffelwurzel ein pfennigstückgroßes, mit dicker Kruste bedecktes Infiltrat. Auf dem Nacken des Tieres in einem Gebiet von Kleinhandtellergröße Haarausfall, daselbst ein klinisch typischer ulzero-serpiginöser Herd, vereinzelte papulo-pustulöse Effloreszenzen auf dem ganzen Rücken. Im Ausstrich verschiedener Effloreszenzen sowohl im Dunkelfeld wie im Giemsapräparat Sp. pallidae. . . . 29. III. Erscheinungen in Rückbildung, Krusten überall abgefallen. . . . 7. IV. 11. Im Dunkelfeldpräparat von der Druckpapel im Löffel unbewegliche und gut bewegliche typische Pallidae. Anfang Mai 1911 frei von Erscheinungen. . . . 19. VI. 11: Rezidiv, namentlich wieder in Form eines papulösen Exanthems und strichförmiger bis bleistiftdicker Infiltrate im Verlauf von Löffelvenen und einzelner papulopustulöser Effloreszenzen auf dem Rücken. . . . Anfang August waren die Rezidiverscheinungen sämtlich verschwunden.

Kaninchen 53. Albino, weiblich, 4 Monate alt. . . . 9. IV. 11 mit 1½ ccm spirochätenreicher Stammkultur Le B. intrakardial geimpft. . . . 30. V. 11: Klinisch typische Iritis specifica sinistra! Augenbefund: Ziliare Injektion, hochgradige Hyperämie der Irisgefäße. . . . 18. VII. 11: Starker Haarausfall. . . . 26. VII. 11: An der linken Löffelwurzel überlinsengroßes flaches braunrotes Infiltrat mit zentraler Borke. . . . 3. VIII. 11: Infiltrat wieder verschwunden.

Kaninchen 66. Weiblich. 14. VI. 1911. Injektion mit 1 ccm spirochätenreicher Mischkultur, verdünnt mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung in die rechte Carotis communis. . . . 11. IX. 11. Auf der Bauchhaut findet sich ein kleinhandtellergroßer papulo-pustulöser, serpiginös ausgebreiteter Herd. . . . Die Untersuchung der Randpartien des Hautherdes der Bauchhaut nach Levaditi ergab positiven Spirochätenbefund.

Kaninchen 68. Junges männliches Tier. . . . 14. VI. 1911 mit ½ ccm sehr spirochätenreicher Kultur 120 in die rechte Carotis communis geimpft. Kollaps. 1. IX. Auf der Skrotalhaut über dem linken Hoden eine zehnpfennigstückgroße dicke braune Kruste, nach deren Entfernung ein Ulkus mit leicht wallartig verdickten Rändern erscheint. Bei der Palpation stellt sich der ganze Prozeß als ein kirschgroßer Tumor dar, der mit dem unteren Pol des darunterliegenden Hodens fest verlötet ist. Im Giemsapräparat vom Rand des Ulkus: Spirochäten +. Regionäre Lymphdrüsen nicht geschwollen. 6. IX. Exitus. Bei der Obduktion findet sich eine Periorchitis diffusa syphilitica des linken Hodens, sonst kein Befund an inneren Organen.

Kaninchen 80. Ausgewachsenes Tier. 20. VI. 1911. Mit 1 ccm Kultur 137 intraarteriell . . . geimpft. 7. VII. Starke Abmagerung, struppiges Aussehen. . . . 4. IX. In Summa 3 Paronychien, je eine am Daumen der Vorderpfote, eine an der Mittelzehe der linken Hinterpfote. Charakteristisches klinisches Bild, entzündliche derbe Schwellung um den ganzen Nagel herum. Im Dunkelfeld keine sicheren Pallidae, im Giemsaausstrich Sp. pallidae +. . . . 8. IX. Exitus. In Schnittpräparaten des Kondyloms (Silberimprägnierung nach Levaditi) vereinzelte Spirochäten.

Kaninchen 81. Weiblich. 20. VI. 1911. Mit 0,5 ccm sehr spirochätenreicher Mischkultur 137, erste Generation, mit der gleichen Menge Kochsalzlösung verdünnt, in die rechte Carotis communis geimpft. Bis Mitte Dezember 1911 keine Erscheinungen. . . . 11. XII. 1911. Mit ¾ ccm Mischkultur, Stamm E. zweite Generation (aus einem tertiärsyphilitischen Prozeß gewonnen) . . . in die linke Carotis communis geimpft. . . . 15. I. 1912. Ausgedehntes, oberflächlich ulzeriertes Infiltrat auf der linken Seite des Kreuzbeins dicht an der Schwanzwurzel. Das linke untere Augenlid ist samt Konjunktiva ektropioniert; entsprechend der Mitte dieses Lides ein mit kleiner Kruste bedecktes Infiltrat. . . . 16. I. Das Infiltrat am linken unteren Augenlid ist größer geworden, im Dunkelfeld zeigen Abstrichpräparate sichere Sp. pallidae in sehr großer Menge.

Kaninchen 111. 24. X. 1911. Mit 0,75 ccm Mischkultur im Verhältnis 1 : 3 mit Kochsalzlösung verdünnt, in die rechte Carotis communis geimpft. . . . 5. XII. Skrotalhaut über dem rechten Hoden gut linsengroß geschwürig zerfallen, mit dicker Kruste bedeckt, der darunter liegende Hoden ist stark verdickt und scheint mit dem Ulkus im Zusammenhang zu stehen. . . . 2. I. 1912. Ulzeriertes Infiltrat auf der Adduktorenseite des Oberschenkels der rechten Hinterpfote und kirschkerngroßer, etwas fluktuierender Tumor auf der Beugeseite desselben Oberschenkels. Spirochätennachweis gelingt weder im Dunkelfeld noch im Giemsapräparat. . . . 6. I. Rechter Hoden operativ entfernt. Typische Periorchitis diffusa syphilitica."

Noguchi, H., Über die Gewinnung der Reinkulturen von pathogener Sp. pallida und von Sp. pertenuis. (Münch. med. Wschr. **1911**, 1551.)

„Bis jetzt ist es mir gelungen, bei 2 von 8 Kaninchen, welche mit dem ersten Pallidastamme (rein) geimpft waren, und bei 3 von 4 Kaninchen, welche mit dem zweiten Stamme der reinen Pallida beschickt waren, typische Hodensyphilis mit überraschend zahlreichem Spirochätenbefund zu erzeugen."

Noguchi, H., A method for the pure cultivation of pathogenic treponema pallidum (spirochaeta pallida). (J. exper. Med. [Amer.] **14**, 105, 1911.)

„So far only two strains of pure cultures have been carefully testes for their virulence. Both strains have produces typical lesions in the testicle of the rabbit. The lesion became noticeable about two weeks after inoculation, and the testicles were excised, under anesthesia, at the end of about four weeks for examination (dark field, and Giemsa, Levaditi, and the usual methylene blue and eosin stains). The first strain (cultivated in October, 1910, in the mixed state, and purified through a Berkefeld filter in January, 1911) was inoculated into eight rabbits on February 2, when a ten day old culture in a serum water tissue medium was used. Two rabbits showed lesions in the course of two to five weeks. The testicles were excised under anesthesia on March 3 and showed typical syphilitic orchitis with an abundance of the pallida. The second strain (cultivated impurely in March — from the 6th to 26th — and purified in a serum agar tissue medium on April 16, 1911) was inoculated into four rabbits on April 26, when a seven day old culture in a serum water tissue medium was used. Three of the four rabbits showed typical lesions in three to five weeks. The aspirated tissue juice from the swollen testicles contained an enormous number of actively motile pallida. One of the positive animals was castrated on May 24, 1911, and the histological examination revealed the appearance shown in the illustrations."

Hoffmann, W. H., Die Übertragung der Syphilis auf Kaninchen mittels reingezüchteter Spirochäten vom Menschen. (Dtsch. med. Wschr. **1911**, 1546.)

„Gerade durch die Menge der eingeführten Spirochäten waren diese Versuche, glaube ich, von meinen früheren Versuchen grundsätzlich verschieden.

Ich habe auf diese Weise eine Reihe von Kaninchen behandelt. Bei allen Tieren trat in den ersten Tagen eine starke Schwellung und Reizung der Hoden auf, die später zurückging. Doch blieben stets deutliche Reste der Entzündung an den Hoden zurück, die in einzelnen Fällen zu fibröser Verdickung des ganzen Hodens führten, in anderen zur Bildung umschriebener, bis erbsen- und bohnengroßer Knoten Anlaß gaben.

Die beiden am längsten im Versuch befindlichen Tiere, die vor 7 Wochen mit Kulturspirochäten gespritzt waren, fielen mir nun am 2. August durch starke Abmagerung und Schwäche, struppiges Haarkleid und elendes Aussehen auf, so daß ich ihren

baldigen Tod voraussah. Ich ließ sie aus diesem Grunde töten. Als ich die verdickten und höckerig-derb sich anfühlenden Hoden durchschnitt, fand ich auf dem Durchschnitt ein speckiges, saftreiches, rötlich-weißes, schwieliges Gewebe, wie ich es bei syphilitischen Hodenentzündungen der Kaninchen sehr häufig gesehen hatte.

Bei Untersuchungen im Dunkelfeld fand ich dieses chronisch entzündliche Gewebe durchsetzt von großen Massen von Spirochäten mit deutlicher Eigenbewegung, die in ihrem Aussehen ganz denen aus der Reinkultur glichen und damit wiederum, beim jetzigen Stand unserer Kenntnisse, in ihrer Form nicht von der Spirochaeta pallida zu unterscheiden waren, wie wir das schon mehrfach hervorgehoben haben. Ich habe dieses spirochätenreiche Gewebe auf eine Anzahl anderer Kaninchen unter die Hodenhaut verimpft, um zu beobachten, ob eine Weiterzüchtung und vielleicht eine Steigerung der Pathogenität möglich ist."

Shmamine, T., Über die Reinzüchtung der Spirochaeta pallida und der nadelförmigen Bakterien aus syphilitischem Material, mit besonderer Berücksichtigung der Reinkultur der Spirochaeta dentium und des Bac. fusiformis aus der Mundhöhle. (Zbl. Bakter. I Orig. **65**, 311, 1912.)

„Kaninchen 108 am 26. November 1911 erhielt 2½ ccm Aufschwemmung von spirochätenreicher Reinkultur aus Serumagar mit flüssigem Nährboden (8 Tage alt, erster Stamm) in der oben erwähnten Weise in beide Hodensäcke injiziert. Am 29. November fand ich bei der Punktion lebende Spirochäten. 25. Januar 1912 an der Injektionsstelle ein ziemlich derbes Knötchen und verdickte Haut. Dieses Knötchen habe ich gequetscht und darauf das Tier weiter beobachtet. Am 1. Februar bemerkte ich an der Stelle des Knötchens eine ca. stecknadelkopfgroße frische Wunde, wie zernagt. 7. Februar 1912. Jene neue wundartige Stelle ist unter eigenartiger Krustenbildung vergrößert. Obwohl wir in der Umgebung der betreffenden Stelle nicht so deutliche Induration bemerkt haben, wie sonst gewöhnlich bei Kaninchensyphilis sich zeigt, so habe ich doch wegen des eigenartigen Aussehens der kranken Stelle auf Spirochäten untersucht. In 2 von 14 Präparaten habe ich lebende Spirochäten mit lebhafter Eigenbewegung gefunden, welche Herr Prof. Bruck und noch andere Herren in der Neisserschen Hautklinik ohne weiteres für typische Pallida gehalten haben. 10. Februar. Befund derselbe (Herrn Dr. Prausnitz gezeigt). 13. Februar. Nachdem ich heute wieder lebende Spirochaetae pallidae gefunden (Herrn Geheimrat Pfeiffer gezeigt), habe ich davon Gewebsstückchen entnommen und einerseits in den von mir hergestellten Nährboden, andererseits unter die Hodenhaut von 3 neuen Kaninchen verimpft. In den nach Levaditi gefärbten Gewebsstückchen fanden wir viele Spirochäten. In den angelegten Kulturen fand sich schon nach 7 Tagen sicheres Wachstum beweglicher Spirochäten. Die geimpften Tiere verhielten sich folgendermaßen: Zwei Kaninchen zeigten an der Impfstelle Krustenbildung, die Umgebung war diesmal deutlich induriert. Die mikroskopische Untersuchung am 4. April ergab im Dunkelfeld zahlreiche typische, lebhaft bewegliche Pallidae. Am 9. April zeigte ich frische Ausstriche Herrn Geheimrat Pfeiffer und einigen Herren der hiesigen Hautklinik. Diesen letzten Fall, nämlich den Befund in der zweiten Tiergeneration, habe ich in der Literatur noch nicht gefunden."

Tomasczewski, E., Ein Beitrag zur Züchtung der Sp. pallida. (Berl. klin. Wschr. **1912**, 792.)

„29. II. 1912. Kaninchenbock 988 erhält 5 ccm einer 9 Tage alten Kultur der 4. Generation intravenös (Ohrvene) injiziert. Am 22. III. 1912 am Präputium eine deutlich erhabene ovale, von einem Halo umgebene, eben erodierte Papel. Im Ge-

webssaft der Papel bei Dunkelfeldbeleuchtung schwach lichtbrechende, windungsreiche, lebhaft bewegliche Spirochäten; im Giemsapräparat vereinzelte, blaßrote, windungsreiche und spitz endende Spirochäten. Das Tier war neu angekauft und von Beginn an in einem sorgfältig gereinigten Käfig untergebracht."

„Kaninchenweibchen 739. Am 23. II. 1911 intravenös mit syphilitischer Orchitis von Kaninchen 711 (31. Passage) geimpft; am 17. III. 1911 an der linken Anovaginalfalte eine große erodierte Papel mit sehr zahlreichen Spirochäten."

„Kaninchenbock 928: Am 18. XII. 1911 intravenös geimpft mit syphilitischer Orchitis von Kaninchen 889 (36. Passage); am 18. I. 1912 Analpapel mit zahlreichen Syphilisspirochäten."

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena — 39