KURZE WISSENSCHAFTLICHE MITTEILUNGEN.

REINKULTUREN DER SPIROCHAETE PALLIDA IN FESTEM UND FLÜSSIGEM NÄHRBODEN, SOWIE ÜBERTRAGUNG DIESER KULTUREN AUF TIERE¹⁾.

Von

A. v. WASSERMANN und M. FICKER.

Die Kultur der Spirochaete pallida ist schon öfters gelungen, wir erwähnen besonders SCHERESCHESKY²⁾, MÜHLENS³⁾, NOGUCHI⁴⁾, W. H. HOFFMANN⁵⁾, SOWADE⁶⁾, SHAMAMINE⁷⁾, TOMASCZEWSKI⁸⁾ NAKANO⁹⁾ und andere mehr. Aber diese Kulturen besaßen doch immer einen Seltenheitswert. Vor allem ist der Beweis, daß man eine echte Spirochaete pallida gezüchtet hat, erst dann voll erbracht, wenn sich mit ihr bei Versuchstieren wiederum Syphilis erzielen läßt. Diese Forderung ist heute um so nötiger, als wir durch die Untersuchungen, besonders von UHLENHUTH und ZUELZER¹⁰⁾ wissen, daß Spirochäten, und zwar auch solche, welche morphologisch von der echten Spirochaete pallida kaum zu unterscheiden sind, äußerst verbreitet in der Natur vorkommen. Die demonstrierten Kulturen in flüssigen und halbflüssigen Nährböden sind das Ergebnis 4–5jähriger Arbeit, wobei wir durch die unermüdete und sorgfältige Arbeit der Laboratoriumsassistentinnen Fräulein HUMMEL und Fräulein SIEVERS auf das wertvollste unterstützt wurden. Von etwa 80 bis 90 Primäraffekten, für deren Überlassung wir den Kollegen Professor BRUHNS, FRANK, BLUMENTHAL und JOSEPH besonders dankbar sind, gelang es, sieben Reinkulturstämme zu gewinnen. Besonderen Wert möchten wir dabei auf die als B 36 bezeichnete Kultur legen, mit welcher es gelungen ist, typische Syphilis am Kaninchen zu erzielen. Dieser Stamm läßt sich auch heute noch von Tier zu Tier fortpflanzen. Da die Tiere mit einer Reinkultur infiziert wurden, so handelt es sich dabei im Kaninchen um ein von allen Begleitbakterien reines Spirochätenvirus, das sich für experimentelle Untersuchungen besonders eignet. In jüngster Zeit ist es nun, was unseres Wissens bisher noch niemals gelungen ist, dem einen von uns (FICKER) möglich gewesen, den mittels Reinkultur experimentell gewonnenen Kaninchenstamm nun auch wiederum aus dem Kaninchen in Reinkulturen darzustellen. Es haben sich dabei recht interessante Einzelheiten über biologische und züchterische Veränderungen des Stammes ergeben, auf die in einer besonderen Arbeit bei Gelegenheit eingegangen werden soll. Wir haben versucht, mittels dieser Reinkulturen in flüssigen Nährmedien auch etwas Näheres über die Giftstoffe der Spirochäten zu erfahren; bisher ist es uns aber nicht gelungen, Toxine nachzuweisen, weder allgemein wirkende Gifte, noch auch die Bildung von Hämolytinen. Wir werden aber diese letztere Frage noch an anderen Reinkulturen zu verfolgen haben, denn sie ist ganz besonders bedeutungsvoll für das praktisch und pathologisch so wichtige Problem, ob die Spirochäte ein für das Nervensystem pathogenes Stoffwechselprodukt zu bilden imstande ist. Viele Autoren sind ja geneigt, beispielsweise die Sehnervenatrophie als die Wirkung eines derartigen Neurotoxins der Spirochäte anzusprechen. Da uns aber keine Mikroorganismen bekannt sind, die ein neurotropes Gift bilden, ohne gleichzeitig auch ein Hämolysin hervorzubringen — es sei in dieser Hinsicht nur an die Gifte aus der Gruppe der Gas-

branderreger oder des Tetanus erinnert, so wäre es für diese Auffassung besonders wichtig, eine etwaige Hämolysinbildung seitens der Spirochäten nachzuweisen. Selbstredend legte die Gewinnung dieser durch gelungene Tierübertragung als sichere Syphilisspirochäte erkannten Reinkultur den Gedanken nahe, auch klinische Untersuchungen darüber anzustellen, ob nicht etwa eine mit der Salvarsankur kombinierte Vaccinebehandlung von Luetikern therapeutisch Nützliches leisten könne. In dieser Hinsicht haben sich bereits verschiedentlich hervorragende Autoritäten, wie beispielsweise R. KRAUS¹⁾, R. MÜLLER²⁾, HILGERMANN³⁾ und andere für eine solche Behandlung mit spirochätenhaltigem Material ausgesprochen. Aus Mangel an Reinkulturen konnten diese Autoren indessen nur mit Aufschwemmungen von spirochätenhaltigen, menschlichen Syphilisprodukten arbeiten. Nach dieser Richtung bedeuten sichere flüssige Reinkulturen, die sich dosieren lassen, einen bedeutenden Fortschritt. Es wird vor allem darauf ankommen, festzustellen, wie sich das Verschwinden der WaR. sowie das Erscheinen von Rezidiven bei einer solchen kombinierten Vaccino- und Chemotherapie gestaltet. Es wäre nicht unmöglich, daß man beim Einverleiben von abgetöteten Spirochäten in Verbindung mit dem spirilliciden Salvarsan spirillicide Antikörper in vermehrtem Maße hervorzurufen imstande ist, und daß diesen dann für den weiteren Verlauf der Infektion eine besondere Rolle zufällt. Derartige klinische Versuche sind seit etwa 1½ Jahren im Gange. Es ist aber naturgemäß ungemein schwer, sich heute bereits ein Bild darüber zu entwerfen, inwieweit diese Kombination der Chemotherapie mit der Bakteriotherapie einen Fortschritt bedeutet. Insbesondere die wichtigste Frage, ob die Rezidive sowie spätluetischen Erkrankungen dabei seltener werden, wird sich erst nach Jahren an einem gut beobachteten Material entscheiden lassen, und es wird hierzu der zielbewußten Arbeit und Beobachtung seitens weitester ärztlicher Kreise bedürfen. Jedenfalls dürfte es nicht falsch prophezeit sein, daß in etwa 10 Jahren die heute übliche Syphilisbehandlung sehr schematisch erscheinen dürfte, und daß den Problemen der Latenz, also der Allergie der Gewebe, dem Vorhandensein von agglutinierenden und spirilliciden Substanzen im Serum, die ganz verschieden von derjenigen sind, welche die WASSERMANNsche Reaktion bedingt, auch in der Praxis weit größere Aufmerksamkeit wird geschenkt werden müssen. Es scheint das Problem gewisser Affektionen, die im Verlaufe und im Anschluß an Syphilis auftreten, wie z. B. die Veränderungen an der Aorta, mit diesem biologischen Kräftespiel zwischen Spirochäten, spirilliciden Antikörpern und spezifischer Gewebsallergie zusammen zu hängen. Für das exakte experimentelle Studium dieses Forschungsgebietes sind aber Spirochätenreinkulturen in flüssigen Nährmedien erste Bedingung, und deshalb halten wir es nicht für ausgeschlossen, daß diese zunächst rein bakteriologischen Befunde in ihrer weiteren Auswirkung auch zu einiger praktischen Bedeutung gelangen können. (Aus dem Kaiser-Wilh.-Institut f. experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

WEITERE MITTEILUNGEN ÜBER DIE ZERLEGUNG DES WASSERMANNAGGREGATES UND IHRE ANWENDUNGSFÄHIGKEIT ZUR BESTÄTIGUNG DER POSITIVEN WASSERMANNschen REAKTION.

I. Teil.

Von

A. v. WASSERMANN.

Vor mehr als Jahresfrist⁴⁾ habe ich mitgeteilt, daß es gelingt, den Komplex syphilitisches Serumantigen wiederum zu

¹⁾ Die nachfolgenden im Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie ausgeführten Arbeiten sind in der Hufelandischen Gesellschaft zu Berlin am 9. März 1922 zur Mitteilung gelangt. Da sie in einem kurzen Referat nicht genügend klar wiedergegeben sind, so erfolgt mit freundlicher Bewilligung der Schriftleitung die Veröffentlichung in Gestalt kurzer Originalmitteilungen.

²⁾ SCHERESCHESKY, Dtsch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 29, 38; Berl. klin. Wochenschr. 1910, Nr. 42.

³⁾ P. MÜHLENS, Klin. Jahrb. 23, 339.

⁴⁾ NOGUCHI, Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 29; Journ. f. exp. Med. 14, 99; 15, 90, ebenda S. 201.

⁵⁾ W. H. HOFFMANN, Berl. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 48; Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 68, 1911.

⁶⁾ SOWADE, Dtsch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 15, S. 682; Dtsch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 17, S. 797; Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 18, S. 1015.

⁷⁾ SHAMAMINE, Zentralbl. f. Bakteriolog. usw., 65, 311. 1912.

⁸⁾ TOMASCZEWSKI, Berl. klin. Wochenschr. 1912, S. 1556.

⁹⁾ NAKANO, Dtsch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 9; Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, Orig., 1913.

¹⁰⁾ UHLENHUTH u. ZUELZER, Ref. Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1154.

¹⁾ KRAUS, R., Sitzungsber. der k. Akad. d. Wiss. Wien, Juli 1905; Wien. klin. Wochenschr. 1905, S. 1246.

²⁾ MÜLLER, R., u. R. O. STEIN, Med. Klinik 1921, Nr. 15. Ges. d. Ärzte, Derm. Ges. MÜLLER, R., u. H. BLANKER, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 43. S. 1393.

³⁾ HILGERMANN, R., u. W. KANTZ, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 20. S. 605.

⁴⁾ v. WASSERMANN, Berl. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 19.

trennen. Ich hatte damals, da die Arbeiten noch nicht genügend vorgeschritten waren, um sie der Allgemeinheit zu übergeben, nur diese Tatsache, das Verfahren selbst aber noch nicht veröffentlicht. Diese Unterlassung, welche mir von manchen Seiten recht persönlich gefärbte Angriffe zuzog, die, wie aus der nachfolgenden Veröffentlichung meines Mitarbeiters H. CITRON hervorgehen wird, durchaus ungerechtfertigt waren, möchte ich nunmehr nachholen. Meine ersten Resultate waren so gewonnen, daß die Mischung Antigen-syphilitisches Serum durch Zusatz von destilliertem Wasser nach dem Vorgang MEINICKES in Form eines Niederschlages gewonnen wurde. Dieser Niederschlag wurde in 1,7% proz. Kochsalzlösung gelöst und diese Lösung durch das DE HAENSsche Membranfilter Nr. 303 gegeben. In der ablaufenden Flüssigkeit war dann allein die die Reaktion ergebende Substanz des syphilitischen Serums (WASSERMANNsche Substanz) ohne das vorher zugefügte Antigen enthalten. C. NEUBERG machte mich dann auf die von der Firma Macherey, Düren, in den Handel gebrachten, mit Kieselgur getränkten Papierfilter aufmerksam. In der Tat zeigte sich, daß auch diese Kieselgurfilter eine Trennung des Aggregates ermöglichen. Aber diese Filter waren, soweit ich sie im Handel erreichen konnte, nicht gleichmäßig genug, um eine sichere Trennung zu gestatten. Es mußten daher erst genaue Arbeiten unternommen werden, welche Kolloide sich am besten zur Trennung des Aggregates eignen, wie die Mengenverhältnisse beschaffen sein müssen, wie rasch die Filtration geschehen soll und anderes mehr. Zur Lösung dieser Aufgaben zog ich Kollegen H. CITRON hinzu, welcher im nachfolgenden über die Versuchsanordnung und die Ergebnisse berichten wird. Ich selbst möchte mich darauf beschränken, zu betonen, daß nunmehr jeder Untersucher in den Stand gesetzt ist, meine in der damaligen Mitteilung gegebenen Angaben nachzuprüfen, und ich bereit bin, zu diesem Zwecke seitens des Kaiser Wilhelm-Institutes für experimentelle Therapie für derartige wissenschaftliche Versuche das ausgeprüfte Kolloid abzugeben. Ohne den nachfolgenden Mitteilungen meines verehrten Mitarbeiters vorgreifen zu wollen, möchte ich aber doch nicht verfehlen, hier nochmals hervorzuheben, daß die Versuche in zweifelloser Weise die Möglichkeit einer quantitativen Trennung der, nennen wir sie nun WASSERMANNsche oder LUES-Substanz, ergaben. Diese Substanz ist daher nach ihren Eigenschaften meines Erachtens nicht anders zu bezeichnen als ein Amboceptor, denn sie bindet sich an ihr Antigen, sie ist von diesem Antigen wieder abzutrennen, bindet sich von neuem und bei jeder Bindung wird Komplement fixiert. Das sind nach der EHRLICHschen Definition die Grundeigenschaften für eine im lebenden Organismus, sei es spontan vorkommende oder im Verlaufe einer Krankheit oder eines Immunisierungsprozesses auftretende biologische Substanz. Ich möchte weiter darauf hinweisen, daß diese Substanz es ist, welche sowohl bei der Komplementbindung wie bei den Fällungsreaktionen die ursächliche Rolle spielt. Sie ist daher der Träger für jede bis heute bekannte Serodiagnostik der Syphilis. Der Unterschied besteht nur darin, daß zum Auslösen der Fällungsreaktionen gleichzeitig eine größere Menge von Globulin vorhanden sein muß als dies zum Eintritt der WASSERMANNschen Reaktion erforderlich ist. Ich habe darüber besondere Versuche angestellt, die für die WASSERMANN-Substanz zu dem gleichen Ergebnis führten, wie sie für das syphilitische Serum schon früher aus dem Laboratorium von H. SACHS mitgeteilt wurden. Da die WASSERMANN-Substanz kein Lipoid ist, so kann ich mich auch der Ansicht von EPSTEIN und PAUL¹⁾, wonach die positiven Flocken nur aus Lipoid bestehen sollen, nicht anschließen. Ich stimme in dieser Hinsicht vielmehr vollkommen überein mit den Mitteilungen, die OTTO und BLUMENTHAL anlässlich der Diskussion in der Sitzung der Hufelandischen Gesellschaft vom 9. März 1922 machten, sowie mit denjenigen WEISSBACHS²⁾, wonach es sich bei dem Aggregat um einen Komplex von Lipoid und anderen Substanzen handelt. (Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

¹⁾ EPSTEIN u. PAUL, Arch. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 30. 1921.

²⁾ WEISSBACH, Wassermannsche Reaktion und Ausflockungs-Reaktion, Jena, Gustav Fischer 1921.

II. Teil.

METHODIK FÜR DIE GEWINNUNG DER WASSERMANN-SUBSTANZ.

Von

H. CITRON.

Nachdem durch die Versuche v. WASSERMANNs im Prinzip festgestellt war, daß bei der Berührung mit gewissen Kolloidalsubstanzen eine Zerlegung des WASSERMANN-Aggregates unter Zurückhaltung des Antigens stattfindet, handelte es sich darum, die günstigsten Bedingungen für dieses Phänomen zu ermitteln. Denn nur so erschien es möglich, festzustellen, erstens, ob es sich um ein für jedes Luesserungsgültiges Gesetz handele, zweitens, ob es möglich sein würde, dasselbe für die Luesdiagnose im Sinne einer Bestätigungsreaktion praktisch zu verwerten.

Was die Versuchsanordnung anlangt, so ist v. WASSERMANN in der ersten Zeit so vorgegangen, daß er ein Gemisch von 0,2 ccm Serum, 0,3 ccm einer Extraktverdünnung (1 : 8 phys. NaCl) mit 1,5 ccm destilliertem Wasser fällte und, wie in Teil I angegeben, weiter behandelte. — v. W. ist dann, um für den praktischen Gebrauch bequemere Versuchsbedingungen zu schaffen, dazu übergegangen, die Trennung ohne vorausgegangene Ausfällung direkt mittels des bereits erwähnten MACHEREYSchen Kieselgurpapiers zu bewirken.

Von dem erzielten Filtrat wurde eine Portion mit neuem Antigen in gleicher Dosis wie im Hauptversuch versetzt, eine zweite ohne Antigen gelassen. Beiden wurde Komplement und nach der vorschriftsmäßigen Bindungszeit Amboceptor und Hammelblut hinzugefügt. Trotzdem die Versuche nicht immer gleichmäßig ausfielen, und die Resultate sich nicht immer stark abhoben, war doch schon bei dieser Versuchsanordnung ein gesetzmäßiges Verhalten zu erkennen: das Filtrat ohne neuen Antigenzusatz ergab ein negatives, das mit frischem Antigenzusatz ein positives Resultat. Die Resultate wurden gleichmäßiger und schärfer, als wir das fertige Papier aufgaben und mit selbstbereiteten Filtern zu arbeiten begannen. Wir probierten neben Kieselgur eine Anzahl anderer Imprägnierungsmittel, Tierkohle, Zinkoxyd, Kaolin,³⁾ Bariumsulfat, Osmosil, fanden aber, daß sich für unsere Zwecke ausschließlich die Kieselgur eignete, während die anderen durchgeprüften Stoffe nicht nur für sich allein völlig versagten, sondern auch als Zusatzmittel zur Kieselgur die Resultate zum Teil bis zur Unbrauchbarkeit verschlechterten.

Am besten bewährte sich ein geglähtes, sehr feines Kieselgurpräparat (KAHLBAUM), das wir, bevor wir es portionsweise abfüllten, in einer Kugelmühle mit Achatkugeln aufs allerfeinste pulverten. Die Menge des für jeden Versuch erforderlichen Quantum muß für jedes Präparat ausgetrobt werden. Nimmt man die Menge zu gering, so wird Antigen durchgelassen, nimmt man zu viel, so wird Wassermann-Substanz adsorbiert und man erzielt überhaupt keine Reaktion mehr. Die Filtration geschieht nun folgendermaßen: Auf einen Aluminiumtrichter, der oben eine Siebplatte trägt, kommt eine doppelte Lage Filtrierpapier. Der Trichter befindet sich auf einer Saugflasche. Das Papier wird mit der Wasserstrahlpumpe zunächst festgesaugt, dann setzt man einen Aufsatz darauf, der die Form eines oben offenen, breitkrempigen Hutes hat, unten eine Gummiplatte, oben eine Bleiplatte trägt und mittels dreier Schrauben fest gegen die Unterlage gepreßt wird. Jetzt wird das Vakuum abgestellt. Nun gießt man in den Hohlraum des Aufsatzes eine Aufschwemmung der abgewogenen Kieselgurportion in 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung, und läßt ein genau dem inneren Raum angepaßtes Filter auf die Flüssigkeit gleiten. Jetzt stellt man das Vakuum wieder her und sorgt durch vorsichtiges Abschieben des schwimmenden Filters vom Rande dafür, daß es sich der Kieselgurschicht genau anschließt. Filtriert kein Wasser mehr durch, so stellt man die Pumpe ab und verbindet die Saugflasche mit einer Heberflasche von 1 l Inhalt, deren Ausflußrohr, bestehend aus einer 10 ccm-Pipette, etwa $\frac{1}{2}$ m unter Tischhöhe endet. Durch Abklemmen der Schlauch-