

Aus der Bayrischen Landesimpfanstalt in München.

Ueber Gewinnung keimfreier Schutzpockenlymphe.

Von A. Groth und K. Arnold.

Die Versuche einer Entkeimung der frisch gewonnenen Schutzpockenlymphe durch chemische oder physikalische Einflüsse sind zurückzuführen auf die Befürchtung, daß die der Lymphse infolge ihrer Gewinnung auf lebenden Nährböden in größerer oder geringerer Zahl beigemengten Keime zu einer Schädigung des Impflings führen könnten. Wer sich eingehender mit der bakteriologischen Untersuchung der Schutzpockenlymphe beschäftigt hat, weiß zwar, daß diese Befürchtung völlig unbegründet ist, weil die Schutzpockenlymphe, wenn nicht grobe Fahrlässigkeiten bei ihrer Herstellung begangen werden, an sich von menschenpathogenen Keimen frei ist. Wir wissen zudem, daß unter der Einwirkung des Glyzerins, das wir bei der Herstellung des Impfstoffs verwenden, innerhalb weniger Wochen die Begleitkeime bei Erhaltung genügender spezifischer Virulenz eine so weitgehende Abminderung erfahren, daß die Lymphse sehr bald als praktisch keimfrei anzusprechen ist. In umfangreichen Versuchsreihen ist festgestellt, daß die Abminderung der Begleitkeime um so rascher erfolgt, je größer ihre Zahl anfänglich war, und daß nach Ablauf von etwa 3 bis 4 Wochen das gewünschte Ziel einer praktisch keimfreien Lymphse fast ausnahmslos erreicht ist. Wir haben außerdem durch die bakteriologische Untersuchung der Lymphse die Möglichkeit, bei einer nur in der Theorie denkbaren Verunreinigung der Lymphse mit menschenpathogenen Keimen durch die Nichtverwendung der Lymphse eine allenfallsige Schädigung des Impflings ohne weiteres zu vermeiden.

Immerhin kann man das Bedürfnis für gegeben halten, möglichst schnell keimarme Lymphse zu gewinnen, um die absolute Beruhigung zu haben, daß die Einwirkung irgendwelcher anderer Keime als die des Vakzinevirus auf den menschlichen Organismus völlig ausgeschlossen ist. Dabei darf natürlich das entzündliche Oedem um die Impfpusteln, die sogenannte Area, nicht als Kriterium für den Erfolg der Entkeimungsversuche betrachtet werden. Es findet sich tatsächlich in einigen Arbeiten die Bemerkung, daß bei der Verwendung entkeimter Lymphse zwar die Impfschnitte sich zu Pusteln entwickelt hätten (als Beweis für die Erhaltung der vakzinalen Virulenz), aber eine Area nicht oder nur in geringem Grade vorhanden war. Da regelmäßig Angaben darüber fehlen, ob die Ausbildung der Area genügend lange verfolgt wurde, so ist die Möglichkeit gegeben, daß das Urteil an sich schon falsch war, weil eine bei der gesetzlichen Nachschau, also nach Ablauf von 7 Tagen kaum angedeutete Area in den nächsten Tagen zu sehr intensiver Entwicklung gelangen kann. Die Ausdehnung der areolaren Erscheinungen darf überhaupt zur Beurteilung der Keimfreiheit der Lymphse nicht herangezogen werden. Die Area, gleichgültig welche Ausdehnung oder welchen Grad sie im einzelnen Falle annimmt, ist eine spezifisch vakzinale, auf der Bildung von Antikörpern beruhende Reaktion des Organismus. Die Art ihrer Entwicklung nach Zeit ihres Eintritts und nach Größe ihres Umfangs ist neben der individuellen Reaktionsfähigkeit des Impflings ausschließlich abhängig von der Intensität der vakzinalen Infektion. Mit den in der verwendeten Schutzpockenlymphe nachzuweisenden Begleitkeimen, ihrer Art oder Zahl steht die Area in keiner Beziehung.

Will man also versuchen, durch Einwirkung namentlich chemischer Mittel eine Entkeimung der Lymphse zu erzielen, so sind zwei einander durchaus gleichwertige Gesichtspunkte zu beachten. Einmal muß das Mittel und die dabei angewendete Methode tatsächlich eine möglichst rasche und vollständige Keimtötung herbeiführen, und dann darf die Schutzpockenlymphe in ihrer spezifischen Wirksamkeit überhaupt nicht oder nur in so geringem Maße herabgesetzt werden, daß sie noch als vollvirulent anzusehen ist. Es sollen demnach dem keimtötenden Mittel elektive Fähigkeiten zu eigen sein, insofern, als es sich ausschließlich oder vorwiegend gegen die Begleitkeime richtet, dem Vakzineerreger gegenüber jedoch völlig oder fast völlig unwirksam bleibt. An sich erscheint die Erfüllung dieser Forderung durchaus im Bereich der Möglichkeit zu liegen, da sich der Erreger der Vakzine in seinen Eigenschaften, namentlich in seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen, von den Bakterien wesentlich unterscheidet. Wir haben auch schon im Glyzerin ein Mittel, das über die geforderte elektive Fähigkeit bis zu einem gewissen Grade verfügt. Nur erfolgt die Abminderung der Begleitkeime nicht innerhalb weniger Stunden oder Tage, sondern wesentlich langsamer.

Der Nachweis, daß das Mittel und die angedeutete Methode geeignet ist, eine möglichst rasche und vollständige Abtötung der Begleitkeime zu erzielen, ist leicht zu führen, auch die Feststellung, daß der Vakzineerreger selbst überhaupt nicht oder nicht in nennenswertem Maße geschädigt wird, begegnet keinen wesentlichen Schwierigkeiten. Nur kann es nicht als genügend angesehen werden, aus positiven Impferfolgen bei Erst- oder Wiederimpfungen oder nach kutaner oder kornealer Infektion von Kaninchen schlechtweg auf eine unverminderte oder noch ausreichende Virulenz des Impfstoffs zu schließen. Es ist vielmehr notwendig, den Grad der Virulenz möglichst annähernd zu bestimmen. Dazu darf die Zahl der Kinder, deren Impferfolge zur Beurteilung des Virulenzgrades der Lymphse dienen sollen, nicht unter eine gewisse Größe herabsinken, und auch die

Impferfolge selbst müssen nach bestimmten Richtlinien entsprechend gewertet werden. Zur Wertbestimmung der Lymphe im Tierversuch besitzen wir in der intrakutanen Injektion abgestufter Verdünnungen in die enthaarte Rückenhaut des Kaninchens trotz gewisser durch die individuelle Reaktionsfähigkeit der Versuchstiere bedingten Schwankungen eine Methode, die völlig einwandfreie und verhältnismäßig einfach zu gewinnende Ergebnisse liefert. Ueber die Einzelheiten der uns zur Verfügung stehenden Wertbestimmungsmethoden ist an anderer Stelle eingehend berichtet¹⁾.

Wir haben eine größere Reihe der bisher empfohlenen Mittel einer eingehenden Nachprüfung sowohl nach ihrer Wirkung auf die Begleitkeime als auch hinsichtlich der Erhaltung der vakzinalen Virulenz unterzogen und konnten dabei fast durchweg feststellen, daß sie zur Anwendung ungeeignet sind. Im Folgenden werden wir uns darauf beschränken, nur solche Verfahren kurz zu besprechen, die in der letzten Zeit besonders empfohlen wurden und bei denen auf Grund der darüber erfolgten Veröffentlichungen einige Wahrscheinlichkeit bestand, daß sie tatsächlich geeignet sein würden, in das Herstellungsverfahren der Schutzpockenlymphe eingeführt zu werden. Es sind das Chinosol, Trypaflavin, Phenol und Eukupinotoxin.

Seiffert und Hüne²⁾ erzielten durch einen 30%igen Zusatz von Chinosol zur Glycerinlymphe durchschnittlich nach 4 bis 5 Tagen Keimfreiheit angeblich ohne Beeinträchtigung der Virulenz. Daß sie bei 170 Erst- und 473 Wiederimpfungen 100% persönlichen, bei den Erstimpfungen 98,1% und bei den Wiederimpfungen 99,3% Schnitterfolg erzielten, war uns Veranlassung, das Verfahren nachzuprüfen, trotzdem diese Angaben uns nicht völlig einwandfrei erschienen. Das Chinosol setzten wir nicht wie Seiffert und Hüne zur Glycerinlymphe, sondern, um ein Bild der reinen Chinosolwirkung zu erhalten, unmittelbar zu dem mit Kochsalz verriebenen Rohstoff von 2 Impfstoffproben zu. Der Zusatz erfolgte in Konzentrationen von 1 bis 10 auf 1000. Die Keimzählung erfolgte fortlaufend täglich, die Auswertung der Impfstoffe mittels intrakutaner Injektion am Kaninchen zu Beginn und am Ende des Versuches.

Die Verdünnungen 5 bis 10 Chinosol auf 1000 erwiesen sich dabei als dem 40%igen Glycerin in der Desinfektionswirkung überlegen, die Verdünnungen 2 bis 4:1000 waren annähernd gleichwertig, 1:1000 stand dem 40%igen Glycerin wesentlich nach. Dagegen war, wie aus Tabelle I hervorgeht, schon bei einem Chinosolgehalt 1:1000 die vakzinale Virulenz gegenüber der Glycerinlymphe bei dem ersten Impfstoff nach acht Tagen merklich abgeschwächt, bei dem zweiten fast und bei beiden Impfstoffen mit einem Chinosolgehalt von 3:1000 vollkommen aufgehoben.

Tabelle I.

Wertbestimmung der Chinosollymphe am Kaninchen durch intrakutane Injektion.

Verdünnung	Impfstoff Nr. 1.						Impfstoff Nr. 2.					
	Glycerin-lymphe		Chinosol-lymphe 1/1000		Chinosol-lymphe 3/1000		Glycerin-lymphe		Chinosol-lymphe 1/1000		Chinosol-lymphe 3/1000	
	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.
1/10	+	11,1	+	10,3	—	—	++	12,2	+	?	—	—
1/100	±	8,7	+	5,6	—	—	+	8,0	—	—	—	—
1/1000	+	7,4	+	5,7	—	—	+	6,2	—	—	—	—
1/10000	+	4,8	+	?	—	—	+	3,3	—	—	—	—
1/100000	+	3,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

B. = Bewertung der vakzinalen Infiltration.

D. = Durchmesser der vakzinalen Infiltration in mm.

Die dem Glycerin eigene elektive Wirkung besitzt demnach Chinosol nicht.

E. Illert³⁾ prüfte Trypaflavin, und zwar Trypaflavin-Handelsware, konzentriertes Trypaflavin, Neutraltrypaflavin und konzentriertes Neutraltrypaflavin und fand das letztere dem 80%igen Glycerin sowie den übrigen Präparaten überlegen. Die Virulenzprüfung der Lymphe, die in der Kaninchenhornhaut ein befriedigendes Ergebnis geliefert hatte, nahm er an 22 Revakzinierten und durch intrakutane abgestufte Injektion am Kaninchen vor. Diese letztere Angabe war für uns die Veranlassung, trotzdem genaue Versuchsergebnisse nicht mitgeteilt wurden, das Trypaflavin einer Nachprüfung zu unterziehen. Es zeigte sich dabei, daß Trypaflavin-Handelsware in Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 dem von uns bei der Herstellung von Schutzpockenlymphe verwendeten 40%igem Glycerin in seiner Wirkung auf die Verminderung der Begleitkeime wesentlich überlegen, in einer Verdünnung 1:400 annähernd gleichwertig war und daß es im Gegensatz zu den Angaben von Illert auch das von ihm besonders empfohlene konzentrierte Neutraltrypaflavin in seiner keimvermindernden Wirkung übertraf. Das letztere war in Verdünnungen 1:100 und 1:200 dem 40%igen Glycerin etwas überlegen, in den Verdünnungen 1:300 und 1:400 annähernd gleichwertig. Die Wertbestimmung durch intrakutane Injektion am Kaninchen zeigte jedoch, wie aus Tabelle II hervorgeht, deutlich, daß durchaus im Einklang mit der keimvermindernden Fähigkeit auch eine Herabsetzung der vakzinalen Virulenz stattgefunden hatte, daß demnach auch dem Trypaflavin elektive Wirkungen nicht zukommen.

¹⁾ Zschr. f. Hyg. 1921, 92, H. 1. — ²⁾ Zbl. f. Bakt. 1913, 71, H. 1. — ³⁾ D. m. W. 1922 Nr. 7.

Tabelle II.

Wertbestimmung der Trypaflavin-Handelsware-Lymphen (Htr.-Ly.) und der konzentrierten Neutraltrypaflavin-Lymphen (Ntr.-Ly.)

Verdünnung	Impfstoff 14 b.						Impfstoff 14 b.					
	Glycerin-lymphe 14 b		Ntr.-Ly. 1/100		Htr.-Ly. 1/100		Glycerin-lymphe 14 b		Ntr.-Ly. 1/100		Htr.-Ly. 1/100	
	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.
1/10	++	14,2	±	11,8	+	6,4	++	13,6	+	5,5	+	9,8
1/100	+	11,2	±	9,2	+	4,8	+	11,6	+	3,5	+	8,4
1/1000	+	8,0	+	7,8	+	5,6	+	8,6	+	3,2	+	5,2
1/10000	+	4,2	+	7,2	—	—	+	5,0	—	—	—	—
1/100000	—	—	+	7,2	—	—	+	4,5	—	—	—	—

B. = Bewertung der vakzinalen Infiltration.

D. = Durchmesser der vakzinalen Infiltration in mm.

H. A. Gins¹⁾ will durch Schütteln des unzerkleinerten Rohstoffs mit der fünffachen Gewichtsmenge der von Lentz empfohlenen 10%igen Karbolsäure während drei Stunden eine Lymphe erhalten haben, die nur noch geringe Mengen von Begleitkeimen enthielt oder bakteriologisch steril war, und mit solcher Lymphe ebenso gute Resultate, im allgemeinen sogar kräftigere Reaktionen erzielt haben als mit den früheren Glycerinlympen.

Wir haben uns bei der Nachprüfung streng an die von Gins mitgeteilte Versuchsanordnung gehalten, nur aus bestimmten Ueberlegungen den Rohstoff nicht unmittelbar, sondern erst nach seiner Verreibung, wobei natürlich eine nachträgliche Verunreinigung ausgeschlossen war, untersucht und dabei Keimzahlen gefunden, welche wenigstens teilweise hinter den Glycerinlympen, die nicht mit Phenol vorbehandelt wurden, nicht zurückblieben. Wir haben bei den Impfstoffen folgende Werte festgestellt:

	Tier Nr. 9	Tier Nr. 11	Tier Nr. 12	Tier Nr. 13
Karbolymphe	5 120 500	198 300	289 600	21 080
Glycerinlymphe	3 280 000	177 400	1 178 760	592 000

Diesen Mangel an Uebereinstimmung mit den Angaben von Gins führen wir darauf zurück, daß Gins den unzerkleinerten, wir den fein verriebenen Rohstoff untersucht haben. Das als Rohstoff bezeichnete Pustelgewebe enthält nicht nur in seinen oberflächlichen Schichten, welche einer Einwirkung des Phenols ohne weiteres zugänglich sind, sondern auch in der Tiefe eine Reihe von Keimen. Es ist auch je nach der serösen Durchtränkung der Impfpustel nicht immer von gleicher Konsistenz, setzt also dem eindringenden Phenol verschieden großen Widerstand entgegen. Die Karbolsäurebehandlung nach der Methode von Gins stellt zwar eine mehr oder weniger tiefgreifende, doch in erster Linie oberflächliche Desinfektion dar, und die spätere Verreibung des Rohstoffs bringt die der Einwirkung des Phenols entzogenen tieferen Keime zum Vorschein. Es ist daher auch durchaus verständlich, daß die Impfergebnisse mit der Phenollymphe nicht schlechter waren als mit der früheren Glycerinlymphe, weil durch das Verreiben des Rohstoffs auch die im Pustelgewebe gelegenen Vakzinekeime befreit werden und zur Wirkung gelangen können. Die Auswertung der Impfstoffe N 12 und 13, welche eine stärkere Keimverminderung aufwiesen, ergab zugleich, wie aus Tabelle III hervorgeht, eine so deutliche Abnahme der vakzinalen Virulenz, daß auch dem Phenol eine elektive Wirkung nicht zugesprochen werden kann.

Tabelle III.

Wertbestimmung der Karbolymphe nach der intrakutanen Methode am Kaninchen.

Verdünnung	Impfstoff Nr. 12.				Impfstoff Nr. 13.				Impfstoff Nr. 12.				Impfstoff Nr. 13.			
	Glycerin-lymphe 12		Karbolymphe 12		Glycerin-lymphe 13		Karbolymphe 13		Glycerin-lymphe 12		Karbolymphe 12		Glycerin-lymphe 13		Karbolymphe 13	
	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.
1/10	++	14,2	±	11,1	++	14,3	±	8,5	++	13,8	±	7,0	++	13,2	±	7,3
1/100	+	9,9	±	4,6	+	11,4	±	4,6	+	10,2	±	4,9	+	8,9	±	5,4
1/1000	+	9,2	±	3,1	±	8,3	±	4,2	±	9,1	±	4,2	±	6,9	±	5,6
1/10000	+	7,5	—	—	±	5,4	±	3,2	+	5,9	±	3,2	+	4,1	±	4,3
1/100000	+	6,6	—	—	±	7,0	—	—	+	4,0	—	—	±	2,8	±	2,0

B. = Bewertung der vakzinalen Infiltration.

D. = Durchmesser der vakzinalen Infiltration in mm.

Bessere, wenn auch nicht völlig befriedigende Ergebnisse als mit Chinosol, Trypaflavin und Phenol erhielten wir mit dem von F. Kirstein²⁾ empfohlenen Eucupinotoxinum hydrochloricum. Wir haben Eucupinotoxinum in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:6000 für sich und neben Glycerin zu drei Lympheproben zugesetzt und uns im übrigen streng an die Versuchsanordnung von Kirstein gehalten. Eucupinotoxin allein war in den Verdünnungen 1:1000 bis 1:3000 dem Glycerin in der keimabmindernden Wirkung überlegen, die Verdünnungen 1:4000 bis 1:6000 blieben dagegen fast völlig unwirksam. Als Zusatz zur Glycerinlymphe, also im Zusammenwirken mit diesem, ist es selbst in Verdünnungen 1:6000 dem Glycerin allein noch überlegen, wobei wir in Uebereinstimmung mit Kirstein die Verdünnung

¹⁾ D. m. W. 1921 Nr. 45 — ²⁾ D. m. W. 1919 Nr. 40.

1:5000 als ausreichend erkannten, um nach 8 Tagen fast völlige Keimfreiheit zu erzielen. Die Wertbestimmung ergab zwar, wie Tabelle IV an einem der untersuchten Stoffe erkennen läßt, eine Herabminderung der vakzinalen Virulenz bei der Glycerin-Eucupinotoxin-1:5000-Lymphe gegenüber der reinen Glyzerinlymphe, sie war jedoch nicht so stark wie bei der Eucupinotoxinlymphe (ohne Glycerin) 1:3000 und der Glycerin-Eucupinotoxin-1:3000-Lymphe, sodaß die Verwertung des Impfstoffs zu Kinderimpfungen nicht hätte beanstandet werden müssen.

Tabelle IV.

Wertbestimmung der Eucupinotoxinlymphe am Kaninchen durch intrakutane Injektion.

Verdünnung	Glycerinlymphe 4b		Impfstoff 4b.							
			Eucupinotoxin- lymphe 1/3000		Eucupinotoxin- Glycerinlymphe 1/3000		Eucupinotoxin- Glycerinlymphe 1/5000		Eucupinotoxin- Glycerinlymphe 1/5000	
	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.	B.	D.
1/10	++	16,0	++	11,2	+	9,3	++	14,0		
1/100	++	10,8	+	8,5	+	7,1	+	10,3		
1/1000	+	8,4	+	7,9	+	5,9	+	8,2		
1/10 000	+	7,6	+	8,1	+	4,2	+	5,8		
1/100 000	+	6,0	+	8,0	+	4,2	+	4,9		

B. = Bewertung der vakzinalen Infiltration.

D. = Durchmesser der vakzinalen Infiltration in mm.

Ob tatsächlich dem Eucupinotoxinum hydrochloricum eine so ausgesprochen elektive Wirkung zukommt, daß es zur Entkeimung der Lymphe allgemein oder wenigstens in Zeiten raschen Bedarfs als Zusatz zur Glycerinlymphe empfohlen werden kann, darüber müssen erst weitere Untersuchungen, welche sich auf eine größere Zahl von Impfstoffen erstrecken, die Entscheidung bringen.

Vorher ist das Glycerin immer noch sowohl hinsichtlich der keimvermindernden Wirkung als auch wegen der geringen Schädigung der spezifischen Virulenz das geeignetste Zusatzmittel zur Schutzpockenlymphe. In erster Linie ist allerdings die Forderung einer schon primär möglichst keimfreien Gewinnung der Schutzpockenlymphe durch geeignete Vorbehandlung der Impftiere, im besondern der Impfstelle zu erfüllen.