

Aus der Deutschen Dermatologischen Universitätsklinik in Prag.
(Vorstand: Prof. Kreibich.)

Methode zur Beobachtung von Giftwirkungen auf Körperspirochäten.

Von Dr. L. Dub.

Für die Dunkelfelddiagnose der *Spirochaeta pallida* ist es am vorteilhaftesten, wenn der zu untersuchende Reizserumtropfen in möglichst dünner Schicht zwischen Objektträger und Deckglas ausgebreitet wird. Dies wird durch leichtes Andrücken des Deckgläschens an den Objektträger mit dem durch Zellstoff geschützten Finger erreicht. Die Schicht ist dann meist so dünn, daß die Spirochäten fixiert erscheinen und so in ihrer natürlichen Bewegung beeinträchtigt werden. In vielen Fällen ist es aber wichtig, die Eigenbewegung der Spirochäten in einer dickeren Schicht des Serums zu beobachten.

Studien über Giftwirkung in vitro auf Körperspirochäten wurden bisher meist in der Weise ausgeführt, daß ein Tropfen Reizserum auf dem Objektträger mit einem Tropfen der Gifflösung vermischt wurde, sodann wurde nach Andrücken eines Deckgläschens im Dunkelfeld der Tod der Spirochäten festgestellt.

Die auf diese Weise erhaltenen Resultate sind jedoch von subjektiven Einflüssen abhängig, sodaß weitgehende Folgerungen aus so erhaltenen Ergebnissen nicht ohne weiteres zulässig sind. Einerseits schwankt die Tropfengröße des Reizserums und die der zu untersuchenden Gifflösung, sodaß die gewünschte Verdünnung nicht erreicht wird, andererseits wird durch das mehr oder weniger starke Andrücken des Deckglases eine weitgehende Veränderung der Beweglichkeit der Spirochäten erzielt. Eine große Rolle spielt auch der Unterschied zwischen Körper- und Zimmertemperatur.

Es war deshalb eine Untersuchungsweise zu finden, bei der die erwähnten Irrtumsquellen möglichst ausgeschaltet wurden. Dies wird erreicht durch die Dunkelfeldbeobachtung der Giftwirkung im hohlgeschliffenen Objektträger bei geheiztem Mikroskopisch.

Als Beispiel beschreibe ich das Vorgehen bei einem Versuch, bei dem zuerst eine Neosalvarsanlösung von der im Körperblut wirksamen Konzentration hergestellt wurde. Die Blutmenge des erwachsenen Körpers beträgt etwa $\frac{1}{13}$ des Gewichtes. Bei der intravenösen Salvarsanzufuhr setzt die Ausscheidung durch die Nieren sehr bald ein; ein großer Teil des Mittels wird in den Organen, besonders in der Leber und den Nieren deponiert, sodaß die eingeführte Salvarsanmenge nur kurze Zeit in ihrer Gänze im Blute wirksam sein kann. Wir hatten zu unserem Versuch eine Luetikerin im Gewichte von 54 kg mit ausgebreiteten Kondylomen zur Verfügung. Deshalb konnten wir bei einer Blutmenge von 4,11 kg und bei Einführung einer Menge von 0,5 Neosalvarsan (abgekürzt Ns) annehmen, daß die Konzentration des Ns im Blut der Frau höchstens 1:8000 betragen werde. Um diese Lösung in vitro zu erreichen, mußten wir ein gewisses Quantum einer Ns-Lösung 1:4000 mit der gleichen Menge unverdünnten Reizserums vermischen. Die Verdünnung der Ns-Lösung stelle ich auf folgende Weise her: Löst man 0,5 Ns in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung, so hat man eine Verdünnung 1:40. Hiervon zieht man mit einer 1 ccm Rekordspritze bis zum 1. Teilstrich auf, dann 9 Teilstriche physiologischer Kochsalzlösung nach. Von dieser Verdünnung spritzt man dann 9 Teilstriche der Spritze ab und zieht wieder 9 Teilstriche frischer Kochsalzlösung nach, worauf man die gewünschte Verdünnung 1:4000 annähernd erreicht hat. Will man ein anderes Ns-Quantum verdünnen, so ist die für die erste Lösung nötige Kochsalzlösung gleich dem 40fachen Gewicht des Ns, aus der Formel $Ns:x=1:40$, leicht ersichtlich. Hier sei bemerkt, daß ein ähnlicher Vorgang bei der Verdünnung des Tuberkulins viel Zeit erspart.

Vor Herstellung der Gifflösung nimmt man einen gewöhnlichen hohlgeschliffenen Objektträger, dessen Dicke die eines normalen nicht übersteigt, und bestimmt, welche Flüssigkeitsmenge in dem Hohlgeschliff Platz hat. Zu diesem Zwecke füllen wir den Hohlraum des Objektträgers mit Wasser an und saugen dann die gesamte Flüssigkeit in eine Glaskapillare auf. Die Höhe der Flüssigkeitssäule, von einem Ende an gerechnet, wird durch einen Ritz der Kapillarwand bezeichnet. Bei den von uns verwendeten beträgt die Höhe etwa 3 cm. Die Hälfte dieser Höhe, also in unserem Fall $1\frac{1}{2}$ cm, wird ebenfalls durch einen Ritz der Glaswand bezeichnet.

Das Reizserum gewinnt man am besten von nicht zu lange bestehenden nässenden Papeln, deren Spirochätenreichtum vor dem Versuch kontrolliert wird. Die Reizung erfolgt durch Abreiben mit trockenem Zellstoff; das zuerst hervorquellende Serum, das ge-

schädigte Spirochäten und Zelltrümmer enthält, wird abgewischt. Kommt dann nicht mehr genügend Serum zum Vorschein, so wird ein auf 37° erwärmter Schuberg-Mulzerscher Saugnapf angewendet, in dessen schräg nach hinten gezogener Ausbuchtung sich das klare Serum ansammelt. Ich verwende, je nach Größe der Papel, Saugnapfe von verschiedener Größe, sodaß der Napf, die Papel umschließend, auf der normalen Haut aufgesetzt wird.

Wir füllen nun das Kapillarrohr bis zur 1. Marke, welche die Hälfte anzeigt, mit der auf Körpertemperatur erwärmten Gifflösung, die wir dann in den Hohlsliff des auf 37° erwärmten Objektträgers ausblasen; daraufhin wird das gleiche Ende des Röhrchens in das Reizserum gebracht und durch Schiefneigen das gleiche Quantum aufgenommen. Dann wird das Reizserum vorsichtig in den Hohlsliff ausgeblasen, sodaß beide Flüssigkeiten sich mischen. Jetzt legen wir ein körperwarmes, dünnes Deckglas, 24:32 cm groß, auf den Rand des Objektträgers und schieben es langsam gegen den Hohlsliff vor. Die Flüssigkeit dringt bald zwischen Objektträger und Deckglas und bewirkt so eine genügende Adhäsion. Das Deckglas wird so weit vorgeschoben, bis der Hohlsliff unter seine Mitte kommt; Luftblasen lassen sich bei einiger Uebung leicht vermeiden.

Die Dunkelfelduntersuchung (wir benützen den Zeißschen Kardoidkondensor) wird in der Weise vorgenommen, daß zuerst die Flüssigkeitsschicht zwischen Deckglas und dem nicht geschliffenen Teil des Objektträgers eingestellt wird. Sodann wird durch langsames Verschieben der Rand des Hohlsliffes eingestellt und dann einige Gesichtsfelder gegen die Mitte verschoben. Durch Drehen der Mikrometerschraube kann man dann die in den verschiedenen Schichten der Flüssigkeit schwebenden Mikroorganismen beobachten und das Eintreten des Aufhörens der Eigenbewegung feststellen.

Zur Erreichung einer konstanten Temperatur von 37° verwende ich nachstehende Heizvorrichtung. Ein etwa 20 cm langes, an beiden Seiten offenes Blechrohr von 8 cm Durchmesser wird an einem Ende ausgeschnitten, sodann wird das andere Ende am Fuß des Mikroskopes angebracht. Darauf läßt man einen Gasbrenner mit kleiner, nicht leuchtender Flamme in das Rohr schlagen. Dadurch wird eine genügende Erwärmung des Mikroskoptisches erreicht, die mit dem Thermometer festgestellt wird. Durch Regulieren der Gasflamme kann man konstante Temperaturen erzielen.

Nimmt man an Stelle des Giftes physiologische Kochsalzlösung oder ungemischtes Reizserum, so kann man im Hohlsliff verschiedene biologische Eigentümlichkeiten der Spirochäten beobachten. Diese Untersuchungsweise gibt auch Aufschluß über das Wesen der Agglutination der Spirochäten; hierüber wird noch berichtet werden.