

BEITRÄGE ZUR HYGIENE UND EPIDEMIOLOGIE

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HORST HABS

HEIDELBERG

PROF. DR. DR. h. c. JOHANNES KATHE

ROSTOCK

HEFT 12

DIE TREPONEMEN DER MUNDHÖHLE UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE PATHOGENESE DER ORALEN FUSOSPIROCHÄTOSEN

VON

Dozent Dr. med. ULRICH BERGER

LEITER DES BAKTERIOLOGISCHEN LABORATORIUMS DER
UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR ZAHN-, MUND- UND KIEFERKRANKHEITEN
ZU HAMBURG



1 9 5 8

JOHANN AMBROSIUS BARTH / VERLAG / LEIPZIG

**DIE TREPONEMEN DER MUNDHÖHLE
UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE PATHOGENESE
DER ORALEN FUSOSPIROCHÄTOSEN**

VON

Dozent Dr. med. ULRICH BERGER

LEITER DES BAKTERIOLOGISCHEN LABORATORIUMS DER
UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR ZAHN-, MUND- UND KIEFERKRANKHEITEN
ZU HAMBURG

MIT 35 ABBILDUNGEN IM TEXT



1 9 5 8

JOHANN AMBROSIUS BARTH / VERLAG / LEIPZIG

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der fotomechanischen Wiedergabe
und der Übersetzung, vorbehalten

Copyright 1958 by Johann Ambrosius Barth, Leipzig

Printed in Germany

Satz und Druck von Oswald Schmidt KG, Leipzig, III-18-65

Lizenz-Nr. 285/125/110/58

Vorwort

Die Fusospirochätosen bilden eine Gruppe von Krankheiten, die sich eines recht wechselnden Interesses in der Medizin erfreuen. Die Gründe dafür dürften darin zu suchen sein, daß in normalen Zeiten die banalen, leicht zu beeinflussenden Prozesse an Zahl weit im Vordergrund stehen, während die schwereren, prognostisch üblen Verlaufsformen fast ausschließlich in materiellen und damit zugleich auch hygienischen Notzeiten beobachtet werden. Es sei in diesem Zusammenhang besonders an die Nosokomialgangrän und an die Noma erinnert. – Aus geographischen Gründen liegen uns die tropischen Fusospirochätosen (*Ulcus tropicum*) ferner.

Die große Zahl der harmlosen, vorwiegend oral und genital lokalisierten Formen aber läßt sich weitgehend auf mangelhafte persönliche Hygiene zurückführen und ist aus dieser Richtung leicht zu beeinflussen.

Demgegenüber darf jedoch nicht vergessen werden, daß es eine Reihe von Fusospirochätosen gibt, deren Auftreten wir heute noch als schicksalsmäßig ansehen müssen, weil wir hier meist nicht in der Lage sind, den Entstehungsmodus zu erkennen oder ihren Ausbruch zu verhindern. An leichteren Verlaufsformen gehören dazu unter anderen die Entzündungen des Parodontiums, die Angina *PLAUT-VINCENT* und (teilweise) die Sinusitis, an schwereren die putriden Infektionen der Lungen und der Pleura, des Knochenmarks und des Zentralnervensystems.

Weniganziehend war die bakteriologische Erforschung dieser Krankheiten wohl auch deswegen, weil man bald erkannte, daß es sich dabei zwar um Infektionen, aber doch nicht um solche im üblichen Sinne handelt, da der Faktor *Disposition* hier in ungewöhnlicher Weise im Vordergrund steht. Auf eine mangelhafte Hygiene, sei sie individuell, klimatisch oder geschichtlich begründet, als Grundbedingung für die Entstehung der Fusospirochätosen wurde eben hingewiesen. Aber auch die als schicksalsmäßig zu bezeichnenden Fälle haben eine ihrer Grundursachen häufig im Darniederliegen der allgemeinen Resistenz.

So ist es verständlich, daß die Auffassungen über das Wesen der charakteristischen, bei allen diesen Krankheiten zu findenden Anaerobierflora zwischen den beiden extremen Polen schwankte: die einen hielten sie (oder nur bestimmte einzelne Arten davon) für die spezifischen Erreger, die anderen lediglich für eine Sekundärflora von nicht mehr als Indikatorwert.

Ein weiterer Grund dafür, daß die bakteriologische Erforschung der Fusospirochätosen in den vergangenen acht Jahrzehnten so langsam vorangekommen ist, liegt in den technischen Schwierigkeiten der Anaerobierzüchtung, die bis heute nicht völlig überwunden sind. Hemmend stand da wohl auch gelegentlich eine einseitig orientierte Ausrichtung bei der Wahl der angewandten Methoden im Wege, von denen keine einzige nur Vorzüge auf-

weisen kann. Hier vorurteilslos zu wählen, ist eine Voraussetzung für erfolgreiches Arbeiten.

Dem Wesen der Fusospirochätosen von bakteriologischer Seite her näherzukommen, sollte am ehesten einer analytischen Arbeitsrichtung gelingen, die sich der verschiedenen, aus der Mischflora isolierten Keimarten – am besten in der Reihenfolge ihrer wahrscheinlichen Bedeutung – annimmt und sie einzeln in umfassender Weise auf alle jene Eigenschaften und Fähigkeiten untersucht, die nach unserem heutigen Wissen die Pathogenität eines Mikroorganismus bedingen.

Eine derartig umfassende Bearbeitung haben bisher wohl nur die Fusobakterien durch BØE erfahren. – Bei den Spirochäten standen die erwähnten technischen Hindernisse im Wege, die erst vor einigen Jahren durch ROSEBURY und seinen Kreis in St. Louis sowie durch HAMPP in Bethesda beseitigt worden sind. Damit aber war der Weg auch für die genauere Erforschung dieser interessanten Mikroorganismen frei, deren erste Reinkulturen ja vor einem halben Jahrhundert in unserem Lande MÜHLENS (1906), PAUL (1909) und SHAMAMINE (1910), einem japanischen Schüler von R. PFEIFFER in Breslau, gelungen waren. Die vorliegenden Untersuchungen wären ohne die Arbeiten der genannten und vieler anderer Forscher nicht denkbar; sie bauen auf ihnen auf und möchten eine Fortsetzung der durch sie eingeschlagenen Linie darstellen. Als abschließende Darstellung wollen und können sie selbstverständlich nicht betrachtet werden.

Wenn nun die bakteriologischen Untersuchungen bei Fusobakterien und Spirochäten (Treponemen) zwar gewisse krankmachende Fähigkeiten ergeben, aber auch klar gezeigt haben, daß sie weder einzeln noch gemeinsam die spezifischen Erreger der Fusospirochätosen darstellen, so sollte diese Erfahrung doch nicht in dem Sinne ausgelegt werden, daß die bisherigen Untersucher der Suggestion des Namens erlegen seien; denn keineswegs leiten die Fusospirochätosen von diesen beiden Keimgruppen nur ihre Benennung ab; Fusobakterien und Spirochäten sind ohne Zweifel auch, dem lange bekannten histologischen Bild nach zu urteilen, in vorderster Linie an der Ausbildung der pathologischen Veränderungen beteiligt.

Dennoch sollte der bisher nicht recht befriedigende Ausgang der bakteriologischen Untersuchungen an Fusobakterien und Spirochäten Anlaß zur Einbeziehung weiterer Keimarten in den Kreis der Arbeiten sein. Wir denken hier vor allem an die Keime der Bacteroidesgruppe, an die anaeroben gramnegativen kokkenförmigen Mikroorganismen und nicht zuletzt auch an die noch ganz ungenügend erforschten grampositiven, fakultativ aeroben, α - und γ -hämolytischen Streptokokken der oralen und anderer Schleimhäute.

Trotzdem wird man wahrscheinlich zu der Erkenntnis kommen, daß nicht irgendeine einzelne Keimart die Ursache der Pathogenität dieser Flora darstellt, sondern daß eine Mischung von verschiedenen Arten bzw. das Zusammenwirken ihrer Fermentsysteme die bekannten Wirkungen der „fusospirochätären Symbiose“ hervorbringt. Die Ergebnisse der umfassenden Versuche von MACDONALD und Mitarbeitern in Toronto (Kanada) mit Mischungen von Reinkulturen verschiedener Anaerobier weisen bereits in diese Richtung.

Daß Fermentwirkungen auch durch die Zusammenarbeit mehrerer Symbionten entstehen können, zu denen sie einzeln nicht befähigt sind, läßt sich am Beispiel des Hyaluronsäureabbaues deutlich machen: hier wirken zumindest eine Polysaccharidase,

eine Glukuronidase und eine Hexosaminidase zusammen [243], von denen jede einer anderen Keimart entstammen kann. – Als ein weiteres, für die Pathogenese der fusospirochätären Läsionen bedeutsames Enzym gilt die Kollagenase. Daß hier ähnliche Verhältnisse wie bei der Hyaluronidase vorliegen könnten, ergibt sich aus den Arbeiten von SCHULTZ-HAUDT und seinem Kreis, die einen Abbau von Kollagen niemals in Reinkulturen oraler Keimarten, sondern immer nur in Mischungen von solchen nachzuweisen vermochten.

Wenn wir uns in der vorliegenden Schrift dennoch mit den Eigenschaften einer einzelnen Keimart der PLAUT-VINCENTSchen Flora beschäftigt haben, so deswegen, weil wir glauben, daß derartige Untersuchungen im Sinne einer logischen Reihenfolge vorangehen sollten. Wenn wir uns weiterhin die oralen Fusospirochätosen als Untersuchungsobjekt ausgewählt haben, dann liegt dies in der Häufigkeit dieser Krankheiten und in der leichten Zugänglichkeit ihrer Läsionen begründet. Wir möchten aber bei aller gebotenen Vorsicht annehmen, daß sich die Verhältnisse bei den oral und anderweitig lokalisierten Fusospirochätosen weitgehend gleichen, so daß gewisse Verallgemeinerungen der erzielten Ergebnisse erlaubt sind.

Das Manuskript dieser Arbeit war im Sommer 1955 abgeschlossen, konnte jedoch aus äußeren Gründen erst jetzt veröffentlicht werden. Es ließen sich deshalb aus der Literatur der letzten zwei Jahre nur solche Arbeiten berücksichtigen, die wesentlich Neues brachten. Leider mußten aus Gründen der Raumersparnis manche allgemeineren Erörterungen fortgelassen werden, die zum Verständnis des experimentellen Teils zwar nicht unbedingt erforderlich, aber im Zusammenhang vielleicht doch nicht ganz ohne Interesse gewesen wären.

Schließlich ist es mir eine angenehme Pflicht, allen denen zu danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft die Durchführung der beschriebenen Untersuchungen gefördert und damit das Zustandekommen der vorliegenden Schrift ermöglicht haben. Mein Dank gilt für die Überlassung von Bakterienstämmen Frau Dr. J. M. COFFEY, State of New York Dept. of Health, Albany (N. Y.), den Herren Prof. Dr. R. HAAS, ehemals Behringwerke Marburg/Lahn, Prof. Dr. H. LIPPELT, Tropeninstitut Hamburg, und Doz. Dr. F. FÜHNER, Hygiene-Institut Hamburg; für die Überlassung bzw. Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen den Herren Dr. R. H. A. SWAIN, Bacteriology Dept., University of Edinburgh, Dr. D. PETERS und R. GEISTER, Tropeninstitut Hamburg; für die Durchführung einiger Luesreaktionen Frau Dr. L. MOSER, Hygiene-Institut Hamburg; für Unterstützung bei der Gewinnung von Substraten für die Toxinversuche den Herren Dr. W. STÖCKENIUS, Pathologisches Institut, und Dr. BUSCH, Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik Hamburg; für die Anfertigung der Zeichnung Abb. 14 Herrn Dr. K. O. SCHMIDT-FÖHRE, Hamburg. Persönliche Mitteilungen verdanke ich der Freundlichkeit der Herren Dr. E. G. HAMPP und Dr. R. J. FITZGERALD, National Institute of Dental Research, Bethesda (Md.), sowie Herrn Dr. H. CHEMNITZ, Hygiene-Institut der Universität Kiel. Zu besonderem Dank schließlich bin ich den Herausgebern der Schriftenreihe, den Herren Prof. Dr. H. HABS und Prof. Dr. Dr. h. c. J. KATHE, für die Übernahme des Manuskripts und nicht zuletzt dem Verlag Johann Ambrosius Barth für das in vielen Fällen bewiesene Entgegenkommen verpflichtet.

Hamburg, im September 1957.

Der Verfasser

BEITRÄGE ZUR HYGIENE UND EPIDEMIOLOGIE

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HORST HABS · PROF. DR. DR. h. c. JOHANNES KATHE
HEIDELBERG ROSTOCK

HEFT 12

DIE TREPONEMEN DER MUNDHÖHLE UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE PATHOGENESE DER ORALEN FUSOSPIROCHÄTOSEN

VON

Dozent Dr. med. ULRICH BERGER
HAMBURG



1 9 5 8

JOHANN AMBROSIUS BARTH / VERLAG / LEIPZIG

Inhalt

Vorwort	V
A. Einführung	1
B. Systematik und Nomenklatur	11
C. Darstellung und Morphologie	13
I. Dunkelfeldmethode	14
II. Phasenkontrastverfahren	16
III. Tinktorielle Darstellung	16
IV. Elektronenoptische Darstellung	18
D. Züchtung	24
I. Feste Nährböden	24
II. Isolierung der Stämme	27
1. Beimpfung	27
2. Bebrütung	29
III. Haltung der Stämme	32
IV. Oberflächenzüchtung	33
V. Flüssige Nährböden	40
1. agarhaltiger Nährboden	44
2. agarfreie Nährböden	44
E. Biochemie	50
F. Resistenz	53
G. Toxinbildung	55
I. Gerinnungsgifte	56
1. Plasmakoagulase	57
2. Fibrinolysin	58
II. Zellgifte	61
1. Hämotoxin	61
2. Leukozidin	67
III. Bindegewebsgifte	70
1. Hyaluronidase	71
2. Kollagenase	78
H. Pathogenität	83
I. Mäuseversuche	84
II. Hamsterversuche	85
III. Versuche mit Hühnerembryonen	85
IV. Selbstversuch	88
J. Verhalten gegenüber den unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirts	93
I. Phagozytose	94
II. Serumbakterizidie	99
III. Lysozym	105
1. Lyseversuche	107
2. Abtötungsversuche	108
IV. Lipase	109
1. Hemmungsversuche	111
2. Abtötungsversuche	112
Zusammenfassende Schlußbemerkung	116
Literaturverzeichnis	120
Sachverzeichnis	130

A. Einführung

In den gleichen ereignisreichen Jahren, die in einer „Kettenreaktion“ die Entdeckung der Erreger fast aller großen klassischen Seuchen brachten, gelang – kaum beachtet – dem Zahnarzt-Bakteriologen W. D. MILLER ein Befund¹⁾, der nicht nur für die gesamte orale Pathologie von überragender Bedeutung werden, sondern in seinen späteren Auswirkungen auch die Erforschung der Syphilis befruchten sollte. MILLER zeigte damals (1883), daß bei Patienten mit ulzeröser Stomatitis zwei Bakteriengruppen nebeneinander in den Läsionen zu finden sind: lange, feine Stäbchen und Spirochäten. Die gleichen Keimarten trafen VERNEUIL und CLADO (1889) in einem sublingualen Abszeß, PLAUT (1894) bei diphtherieähnlichen Anginen, VINCENT (1896) bei Hospitalgangrän und bald darauf (1899) ebenfalls bei ulzero-membranösen Anginen an. Die offenbar schon vergessenen MILLERSchen Befunde bei Stomatitis ulcerosa wurden von BERNHEIM und POSPISCHILL (1898) aufs neue erhoben bzw. bestätigt. Nachdem aber die „fusospirilläre Symbiose“ durch ihr Auftreten bei so verschiedenartigen pathologischen Prozessen ein gewisses Aufsehen erregt hatte, erschienen nun in kurzer Folge zahlreiche weitere Arbeiten, in welchen die Erforschung dieser Affektionen schnell vorangetrieben und ihre Kenntnis um wesentliche klinische, bakteriologische und histologische Daten bereichert wurde. NICLOT und MAROTTE (1901) fanden Spirochäten und fusiforme Stäbchen ebenfalls bei Angina und Stomatitis, BUDAY (1905) darüber hinaus bei Noma und gangränöser Pharyngitis; ELLERMANN bestätigte noch im selben Jahre den Befund bei Noma, EICHMEYER (1905) traf die gleiche Flora auch bei marginaler Gingivitis und – wie RONA (1905) – bei der Stomatitis mercurialis, AZOULAY (1922) bei Stomatitis bismutica, MILLER (1906) und PAUL (1910) [315] bei gangränöser Pulpitis, KOLLE (1917) schließlich auch bei der „Alveolarpyorrhoe“. So konnten KRITCHEWSKY und SÉGUIN (1920) die bisherigen Befunde in dem Sinne zusammenfassen, daß ulzero-membranöse Angina, Gingivitiden und Stomatitiden der verschiedenen Formen, „Alveolarpyorrhoe“ und Noma eine nosologische Einheit (von ihnen als „orale Spirochätosen“ bezeichnet) bilden, deren Verschiedenheiten in Manifestation und Verlauf im wesentlichen durch Lokalisation, Sekundärinfektion und Resistenzgrad des Wirtsorganismus bedingt seien.

Die Regelmäßigkeit und Einheitlichkeit des bakteriologischen Bildes aller dieser Affektionen legten den Gedanken nahe, daß es sich hier um Infektionskrankheiten gleicher Ätiologie handeln dürfte. Man versuchte deshalb schon frühzeitig, sie durch Injektion von pathogenem Material experimentell zu erzeugen.

¹⁾ Dieser Befund ist nur noch aus der „Überlieferung“ zu zitieren, da ihn RONA und BØE ohne Stellenangabe nennen. Jedenfalls scheint MILLER selbst ihm so wenig Bedeutung beigelegt zu haben, daß er ihn in der ersten Auflage seines Buches „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“ (Leipzig 1889) nicht erwähnt.

Schon VINCENT (1896) hatte Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten Originalmaterial von Hospitalgangränfällen subkutan, intraperitoneal, intravenös und intramuskulär gespritzt, in der Regel jedoch ohne Erfolg; nur gelegentlich bildeten sich kleine Abszesse, hervorgerufen durch unspezifische Begleitkeime. Auch in einigen Menschenversuchen konnte er bei subkutaner Injektion nur ein einziges Mal eine kleine Pustel erzeugen. Bei infektiions- und hungergeschwächten Kaninchen dagegen erhielt er putride, exulzierende Abszesse. VINCENT durfte daraus schließen, daß die Mischflora des Hospitalbrandes nicht infektiös im üblichen Sinne ist; sie werde es erst bei Hinzutreten einer Resistenzschwächung des Organismus durch Krankheit oder Inanition. — NICLOT und MAROTTE hatten jedoch mehr Erfolg: impften sie Meerschweinchen oder Ratten mit Material einer Stomatitis oder Angina in die Leistenbeuge, so entwickelten sich Abszesse; bei intraperitonealer Injektion erhielten sie sogar tödliche Peritonitis. Diese Befunde wurden von allen späteren Untersuchern im wesentlichen bestätigt [102, 226, 316, 424], wobei sich auch Mäuse [316] und Affen [176] als empfänglich erwiesen. — In umfangreicheren, vergleichenden Versuchen wurde diese Frage in jüngerer Zeit schließlich noch einmal von ROSEBURY und Mitarbeitern aufgenommen. Diese Autoren konnten zeigen, daß sich mit fusospirochätärem Material, gleichgültig welcher Herkunft, außer Meerschweinchen und Maus auch der Goldhamster subkutan infizieren läßt; der Hühnerembryo dagegen erwies sich als allzu empfindlich gegenüber der unspezifischen Begleitflora. Als optimales Versuchstier galt ihnen das Meerschweinchen bei subkutaner Inokulation in die Leistenbeuge [118, 356, 392].

Wenn nun auch damit geklärt war, daß das eitriges Sekret der oralen Fusospirochätosen pyogenen Charakter aufweist, so berechtigt dies doch nicht gleichzeitig zu dem Schluß, daß es sich hier um eine spezifische Fähigkeit dieses Materials handelt, denn es gelang schon VERNEUIL und CLADO, durch Injektion von Speichel „des abcès spirillaires“, später auch HEMMENS und HARRISON mit Gingivabelag von Gesunden, Infektionen zu erzeugen, die — abgesehen von einem torpiden Verlauf — den Abszessen ähnlich waren, die sie mit paradentitischem Eiter hervorgerufen hatten. Diese Erfahrung bedeutet allerdings kaum eine Überraschung, wenn man sich daran erinnert, daß sich die mikrobielle Flora der Fusospirochätosen lediglich in den quantitativen Verhältnissen von der normalen Mundflora unterscheidet. Immerhin war es offenkundig, daß das bakterienreichere pathologische Exsudat auch eine deutlich größere Pathogenität aufwies als das Material aus der normalen Mundhöhle.

Der nächste Schritt mußte also darin bestehen, die Bedeutung der einzelnen, zu diesem pyogenen Mikrobiengemisch gehörenden Arten für dessen Pathogenität zu untersuchen. Diesen Arbeiten standen jedoch erhebliche Schwierigkeiten entgegen, da die wichtigeren der in Frage kommenden Keimarten als anspruchsvolle Anaerobier anfangs noch nicht zu züchten waren. Die Reinkultur der Fusobakterien gelang ja erst LEWKOWICZ (1903) und ELLERMANN (1904), der „Spirochaeta dentium“ wenig später MÜHLENS (1906). Zudem darf gleich vorweggenommen werden, daß es mit keiner der an der fusospirochätären Symbiose beteiligten und bisher reingezüchteten Arten möglich ist, eine Infektion zu erzeugen, die mit einer natürlichen Fusospirochätose Ähnlichkeit aufweist.

Von diesen sind die Fusobakterien, mit denen man bei Meerschweinchen und Kaninchen gelegentlich Abszesse, bei Mäusen tödliche Peritonitis hervorrufen kann, offenbar noch am stärksten pathogen. Ganz vereinzelt wurden solche Keime auch aus menschlichen Eiterungen, wie Pleuraempyem und Hirnabszessen, in Reinkultur isoliert [36, 89, 90].

Abgesehen von wenigen früheren Autoren – darunter übrigens auch PLAUT [326] und VINCENT [426] – die den Fusobakterien die eigentliche Verantwortung für die Pathogenität der anaeroben Mischflora zusprachen, erkannte man auf Grund ihres bakteriologischen, histologischen und therapeutischen Verhaltens sehr bald die wichtige, wenn nicht – immer im Rahmen der Mischflora – führende Rolle der Spirochäten.

In bakteriologischen Präparaten gehören die Spirochäten zu den Keimarten, die wegen ihrer Form und Beweglichkeit ohnehin am stärksten ins Auge fallen; dies gilt besonders seit der Einführung der Dunkelfeldtechnik durch LANDSTEINER und MUCHA (1906). KOLLE fand sie bei der Parodontitis suppurativa in der Tiefe der Zahnfleischtaschen praktisch in Reinkultur, und nach KLEIN [207, 208] soll bei den oralen Fusospirochätosen die Schwere des Prozesses geradezu von der Spirochätenzahl abhängig sein.

Bei histologischen Untersuchungen an oralen (und anderen) Fusospirochätosen wurde – ebenfalls mit Ausnahme weniger, vorwiegend früher Arbeiten – ein ganz einheitliches Verhalten der Spirochäten festgestellt. Während die unspezifische, aus Kokken und Stäbchen bestehende Mischflora die Zone des Gewebszerfalles beherrscht, dominieren an der Grenze von nekrotischem und normalem Gewebe Fusobakterien, oft in pallisadenförmiger Anordnung, während allein die Spirochäten mehr oder weniger tief ins offenbar gesunde Bindegewebe eindringen.

Zum ersten Male wurde dieser Befund wohl von PERTHES (1899) bei Noma erhoben, bald darauf bestätigt von KRAHN (1900), BUDAY (1905), ELLERMANN (1905) sowie KRITCHEWSKY und SÉGUIN (1921/1925). Die gleiche Anordnung der Bakterien in Gewebsschnitten fanden bei Stomatitis und gangränöser Pharyngitis BUDAY (1905), bei Angina ulcero-membranosa TUNNICLIFF (1919) sowie KRITCHEWSKY und SÉGUIN (1925), bei chronischer Tonsillitis KUNERT (1955), bei Parodontitis HEDDEMA (1926) und EICHNER (1954), bei anderen oralen Fusospirochätosen LEINER (1907), VESZPRÉMI (1907) und AZOULAY (1922), bei Lungengangrän schließlich MÜHLENS (1907), ARNHEIM (1911) und D. T. SMITH (1927). Auch in den Läsionen künstlich mit fusospirochätärem Exsudat infizierter Kaninchen und Meerschweinchen konnten PAUL (1910) [316], KRITCHEWSKY und SÉGUIN (1920/21), SMITH (1927) EHRENSHAUS (1940) und KLEIN (1950) das typische, nahezu alleinige Vordringen der Spirochäten ins offenbar unveränderte Gewebe nachweisen. – Während die Mehrzahl der genannten Autoren ihre Befunde mit schematisierenden und teilweise wohl auch stark übertreibenden Zeichnungen belegte, brachten vor allem EHRENSHAUS und auch KUNERT recht gute photographische Abbildungen dieser Verhältnisse von wirklicher Beweiskraft.

Dem stehen im wesentlichen die Angaben von VINCENT (1896), RONA (1905), EICHMEYER (1905) sowie BERNHEIM und POSPISCHILL (1898) entgegen, von denen die drei ersten nur Fusobakterien, die letzteren ein plumpes, polgefärbtes Stäbchen ins Gewebe eindringen sahen. – Über fruchtlose Versuche, bei „VINCENT'S disease“ des Parodontiums Spirochäten im gesunden Gewebe nachzuweisen, berichteten in jüngster Zeit auch SCHAFFER (1953) und EMSLIE (1953).

Den dritten Hinweis schließlich auf die Rolle der Spirochäten im Rahmen der Fusospirochätosen gab das Ansprechen dieser Erkrankungen auf die Therapie mit Neosalvarsan.

Bereits PAUL EHRLICH (1910) berichtete über Heilung einer Angina ulcero-membranosa mit Salvarsan, PLAUT (1911) behandelte die Stomatitis ulcerosa mit dem gleichen Mittel erfolgreich intravenös. Die Lokalbehandlung der Angina PLAUT-VINCENT und des „trench mouth“ mit einer Glycerinlösung von Neosalvarsan wurde offenbar durch

ROLLESTON (1913) eingeführt. Später waren es dann besonders KOLLE (1917), BEYER (1917) und KÜMMEL (1917), die dieses Mittel für die Therapie der „Alveolarpyorrhoe“ empfahlen. Demgegenüber fanden LESSER und WITKOWSKI (1917) eine gute Wirkung des Neosalvarsan bei dieser Krankheit nur nach intravenöser Gabe, nicht aber bei lokaler Anwendung. In Frankreich setzten sich in den Jahren 1918–1921 KRITCHEWSKY und SÉGUIN für die Arsenbehandlung der oralen Fusospirochätosen ein [223, 224, 226] und stellten – als Vorläufer der ominösen Penicillinzahnpasten – eine Neosalvarsanzahnpaste zur häuslichen Pflege her [224]! – Diese optimistisch lautenden anfänglichen Erfahrungsberichte mußten jedoch bald einer kritischeren Einstellung weichen; aber auch wenn diese Therapie heute im allgemeinen aufgegeben scheint, so hat sich doch zumindest die Neosalvarsanpinselung der PLAUT-VINCENTSchen Angina bis weit in die antibiotische Ära hinein gehalten.

Selbst wenn also das Neovalvarsan in der Behandlung der oralen Fusospirochätosen nicht alles gehalten hat, was es zu versprechen schien, so steht doch außer Zweifel, daß damit vorübergehende Erfolge zu erzielen waren. Daß diese in der Tat auf einer direkten Schädigung der Spirochäten beruhen, darf aus der gleichen In-vitro-Empfindlichkeit von *T. pallidum* und *T. microdentium* gegen dieses Mittel [5] gefolgert werden.

Der Zusammenklang der bakteriologischen, histologischen und therapeutischen Befunde, die ein regelmäßiges, massenhaftes Vorkommen von Spirochäten in den fusospirochätären Läsionen, ein Eindringen dieser Keime in das noch unveränderte Gewebe und ein Schwinden der Symptome bei Behandlung mit dem spirochätiziden Neosalvarsan brachten, läßt bei aller gebotenen Vorsicht den Schluß zu, daß die Spirochäten eine führende, nicht anders zu besetzende Rolle in der Pathogenese der Fusospirochätosen spielen.

Dennoch wird man das Wirken der Spirochäten nicht so sehr überschätzen dürfen, daß man ihnen die (alleinige) Titelrolle bei diesen Krankheiten zugesteht, wie dies z. B. durch KRITCHEWSKY und SÉGUIN [224–227], BELDING und BELDING sowie KLEIN [208] geschah, die hier von „Spirochätosen“ sprachen; denn ohne Mithilfe von Fusobakterien und noch weiteren Keimarten sind auch die Spirochäten nicht in der Lage, eine Entzündung vom Typ der Fusospirochätosen zu erzeugen oder zu unterhalten, wie Tier- und Menschenversuche (s. u.) gelehrt haben. Hier wären noch die äußerst interessanten, minutiösen Untersuchungen von MACDONALD und Mitarbeitern [248, 249] aus neuester Zeit zu erwähnen, deren Ziel es war, durch Analyse und Rekombination der zur fusospirochätären Symbiose gehörenden Keimarten diejenigen zu ermitteln, die für den pyogenen Charakter dieser Mischflora verantwortlich sind. Die Autoren reinigten das fusospirochätäre Exsudat einer Gingivitis hypertrophicans durch Tierpassagen so weit, bis es „nur“ noch 17 verschiedene Arten enthielt, die reingezüchtet werden konnten; von diesen wiederum waren nur 4 in Kombination erforderlich, um beim Meerschweinchen einen typischen Abszeß zu erzeugen, und merkwürdigerweise gehörten zu diesen vier Arten (ein diphtheroides und ein gramnegatives, bewegliches, anaerobes Stäbchen sowie zwei verschiedene Bacteroidesarten) weder Spirochäten noch Fusobakterien. Dieses Ergebnis ist aber vielleicht doch nicht so merkwürdig, wie es zunächst erscheint; denn daran, daß es putride übertragbare Anaerobierinfektionen gibt, die ohne Mitwirkung von Fusobakterien und Spirochäten zustandekommen, bestand wohl niemals ein Zweifel. MACDONALD [249] selbst vertrat – unter Hinweis auf die Diskrepanz seiner Resultate mit denen der genannten früheren Autoren – die Ansicht, daß es offenbar weniger die Kombination bestimmter Bakterienarten als vielmehr die Kombination bestimmter Fermente bzw. Toxine ist, welche die Pathogenität einer derartigen Mischflora bedingt. Diese Auffassung ließ sich insofern auch experimentell stützen, als es möglich war, eine oder mehrere der vier beschriebenen Keimarten gegen Spirochäten oder an-

dere Mikroorganismen ohne Verlust des pyogenen Charakters der Mischflora auszutauschen.

Da man heute mit einiger Sicherheit drei Typen von Mundspirochäten unterscheiden kann [164], von denen zwei zur Gattung *Borrelia* (*B. buccalis*, *B. vincentii*) und einer zu *Treponema* („orale Treponemen“) gehört, war es erforderlich zu prüfen, ob ein einzelner und gegebenenfalls welcher dieser Typen für die Rolle der Spirochäten verantwortlich gemacht werden kann.

Noch heute gilt in den Lehrbüchern *B. vincentii* als Symbiontin der Fusobakterien bei der ulzero-membranösen Angina. Diese Angabe dürfte einmal darauf beruhen, daß *B. vincentii* (neben *B. buccalis*) wegen ihrer besseren Färbbarkeit leichter erkannt wird, zum anderen darauf, daß Borrelien im bakteriologischen Präparat von Fusospirochätosen gegenüber den Treponemen tatsächlich oft dominieren, schließlich aber wohl auch einfach auf der Assoziation: Angina Vincenti-Spirochaeta vincenti. Es soll zwar nicht verschwiegen werden, daß dieser Spirochätenart wegen ihrer Augenfälligkeit im gefärbten Präparat z. B. von JELINEK und noch heute von KLEIN [207, 208] die Hauptbedeutung bei der Entstehung von Stomatitis, ulzero-membranöser Angina und entzündlichen Parodontopathien zugesprochen wird; doch stehen den Angaben dieser wenigen Autoren die Befunde zahlreicher anderer Untersucher entgegen. So meinten bereits KRITCHEWSKY und SÉGUIN [224] auf Grund ihrer Erfahrungen, daß es eine „Sp. vincenti“ (als spezifischen Erreger der Angina Vincenti) nicht gebe; es handle sich hier um ein Zusammenwirken mehrerer Spirochätenarten. MASSIA und GRIGORAKIS hielten die Infektion mit „Sp. dentium“ (*Treponema*), nicht mit „Sp. vincenti“ (*Borrelia*), für die Ursache der Gingivostomatitis. – Im Rahmen histologischer Untersuchungen fand VESZPRÉMI [424, 425] bei gangränösen Metastasen einer Kieferosteomyelitis die Gewebsspirochäten als zum Typ „Sp. gracilis“ (= *T. dentium* [344]), BUDAY [49] bei Lungengangrän zum Typ „Sp. dentium“, EHRENHAUS ebenfalls zum eng gewundenen Typ (also *Treponema*) gehörig. – In Tierversuchen zeigten übereinstimmend ROSEBURY und FOLEY [356], WICHELHAUSEN und WICHELHAUSEN sowie HEMMENS und HARRISON, daß nach einigen Meerschweinchenpassagen im übertragbaren, pyogenen Abszeßleiter die Borrelien verschwunden waren und allein Treponemen (neben anderen Keimarten) persistierten. Schon VINCENT [428] hatte übrigens gefunden, daß sich bei Einführung eines mit fusospirochätärem Exsudat getränkten Tupfers in die Bauchhöhle eines Meerschweinchens von allen Spirochäten allein „Sp. dentium“ vermehrt.

Diese Ergebnisse zeigen wohl deutlicher als bakteriologische Präparate, deren einheitliche Beurteilung infolge der verschiedenen Färbbarkeit der vorhandenen Keimarten sowie der Unmöglichkeit eines gleichen Entnahmzeitpunktes und einer gleichen Entnahmetechnik sehr erschwert ist, welche Spirochätenart bei der Ausbildung der fusospirochätären Läsionen die Führung haben dürfte: es sind mit großer Wahrscheinlichkeit die Treponemen.

Um diese, auf die Auswertung indirekter Methoden gestützte Vermutung zu bestätigen, bedurfte es allerdings unmittelbarer Untersuchungen an Reinkulturen der Treponemen selbst. Eine Reihe von Hindernissen, zu denen in erster Linie die strikte Aerophobie, die hohen Nährbodenansprüche und die regelmäßige Anwesenheit zahlreicher, viel vitalerer Keime im Originalmaterial gehören (die einerseits zum Überwuchern neigen, andererseits aber infolge Bildung wachstumsfördernder Stoffe den Spirochäten schwer entbehrlich sind), stellte sich den Zuchtversuchen zwei Jahrzehnte lang entgegen.

Endlich gelang jedoch MÜHLENS im Jahre 1906 die erste Isolierung oraler Treponemen in Reinkultur. Er benutzte dazu einen Pferdeserumagar (1:3) unter Anwendung der Anaerobiertechnik von VEILLON (Schüttelkul-

tur in hoher Schicht); nach 9–12tägiger Bebrütung wurden die Röhren zerschlagen und verdächtige Kolonien in gleicher Weise weiter verimpft. So konnte er die Treponemen bereits in der vierten Passage von ihrer Begleitflora befreien.

Als zweiter erhielt mit der gleichen Methode PAUL (1908) eine derartige Reinkultur; nach einigen Passagen gelang ihm die Übertragung der Keime auch als Stiehkultur. – Der dritte, dem die Isolierung oraler Treponemen glückte, war SEMAMINE (1910); er benutzte die gleiche Technik wie PAUL [314], d. h. die Schüttelkultur zur Reinzüchtung und die Stiehkultur zur weiteren Übertragung, ohne aber offenbar dessen Veröffentlichungen zu kennen. Da das Arbeiten mit Serumagar, der wegen der stets in der Begleitflora vorhandenen Gasbildner regelmäßig platzt, recht schwierig war, verwandte er daneben auch den gallertigen, von SCHERESCHEWSKY für die Spirochätenzüchtung angegebenen Nährboden, der aus transparent koaguliertem, gering autolytischem Pferdeserum bestand, mit geringen Modifikationen. Auf diese Weise scheint ihm auch die Reinzüchtung eines kaninchenvirulenten Stammes von *T. pallidum* gelungen zu sein.

Die ersten umfangreicheren systematischen Züchtungsversuche mit Spirochäten verdanken wir jedoch NOGUCHI (seit 1911) [298–302]. Dieser Autor benutzte zwei verschiedene Isolierungsmethoden: Anfangs bediente er sich der Fähigkeit der Spirochäten, durch BERKEFELD-Filterkerzen hindurchzuwachsen, später verwandte er die technisch einfachere Stiehkultur, in der die Spirochäten vom Stiehkanal weg in den Agar hinein vordringen und so von der Begleitflora zu trennen sind. Als Nährboden benutzte er für die Filterversuche Serumwasser (1:4), für die Stiehkultur Serumagar (1:3). Unentbehrlich war in jedem Falle die Anwesenheit eines Stückchens frischen Gewebes im Kulturröhrchen; als optimal gab NOGUCHI [298] Niere und Testis vom Kaninchen an, aber auch Herz war brauchbar. Anaerobiose erzielte er in einem Spezialgefäß, aus dem die Luft durch Wasserstoffgas vertrieben und der restliche Sauerstoff nach dem BÜCHNERSCHEN Pyrogallol-Alkali-Verfahren abgeunden wurde. So erhielt NOGUCHI [298, 299] eine *T. pertenuis* und sechs *T. pallidum*-Kulturen, von denen sich einige als kaninchenpathogen erwiesen. Die adaptierten Stämme ließen sich in paraffinüberschichtetem Hochschicht-Serumagar fortführen. – Mit den gleichen Nährböden, durch Anreicherung in Gewebe-Serumwasser und folgende Stiehbeimpfung von Gewebe-Serumagar gelang NOGUCHI kurz darauf die Reinzüchtung von drei verschiedenen Mundspirochäten, die er als *T. microdentium*, *T. macrodentium* [300] und *T. mucosum* [301] bezeichnete. Bei der letzten dieser Arten hatte er seine Technik so weit vereinfacht, daß er das Originalmaterial mit einer Kapillare direkt in besonders lange Röhren von 2 × 20 cm Dimensionen (NOGUCHI-Röhren) mit 15 ml Aszites-(Serum-)Agar 1:3 im Stieh einimpfte und mit Paraffin überschichtete.

Die etwa gleichzeitigen Isolierungen von Mundspirochäten durch REPACT (1912) sind weniger bedeutend, da dieser Autor die seit NOGUCHI überholte Methode nach VEILLON anwandte und weil auf Grund von Morphologie und Nährbodenansprüchen erhebliche Zweifel an der Spirochätennatur seiner Züchtungen bestehen. – Ein ähnliches Prinzip wie NOGUCHI benutzte ARNHEIM (1914), der über die Reinzüchtung von *T. pallidum*, *B. refringens* und auch eines Stammes der „Angina-Vincenti-Spirochäte“ (*B. vincentii*?) berichtete. Dieser Autor ließ 3 ml Serumagar im Röhren erstarren, gab darauf das Impfmateriel und überschichtete mit Serumagar. Von der zweiten bis dritten Passage an, d. h. nach kritischer Verdünnung des eingeimpften Originalmaterials, war ein Zusatz von frischem Gewebe erforderlich. Bei dieser Technik wachsen die Spirochäten

in den unteren Teil des Agars ein und lassen sich so von der Begleitflora abtrennen. – Wenig Neues brachte die Arbeit von OZAKI (1915), der seine Reinkultur in einer unten zugeschmolzenen, mit halbstarrem Serum gefüllten und im Stich beimpften Glaspipette erhielt. Später erwies sich auch ihm Aszitesagar 1:2 oder 1:3 als geeigneter Nährboden.

Zum ersten Male wieder seit NOGUCHI und (teilweise) mit dessen Technik wurden Züchtungsversuche in größerem Ausmaß, die sich über mehr als 20 Jahre (1920–1941) erstreckten, durch eine französische Forschergruppe (KRITCHEWSKY, SÉGUIN, VINZENT, DAUFRESNE) unternommen. SÉGUIN [385] gelang zwar die Isolierung von Mundspirochäten, doch konnte er die Stämme – wegen ihrer starken Abhängigkeit von wachstumsfördernden Substanzen der Begleitflora – niemals über mehr als drei Passagen in Reinkultur halten. Diese Schwierigkeit ließ sich dadurch überwinden, daß er in ein mit Spirochäten frisch beimpftes Aszitesagarröhrchen ein Kollodiumsäckchen einhängte, das eine Fusobakterienkultur enthielt. Die Spirochäten wuchsen dann mit wolkiger Trübung in der Umgebung des Säckchens. – Etwa zur gleichen Zeit berichteten KRITCHEWSKY und SÉGUIN [224–226] über die Isolierung von drei verschiedenen Arten, nämlich *Sp. dentium* (= *T. microdentium*), *Sp. tenuis* (= *T. macrodentium*?) und *Sp. acuta* (= *B. vincentii*?). Später konnten VINZENT und DAUFRESNE in Gewebeserumagar unter Vaselinöl elf Spirochätenstämme aus der Mundhöhle züchten, die sie unbenannt in sechs Gruppen (A–D, F, G) einteilten, um die schon damals in der Nomenklatur bestehende Verwirrung nicht noch zu vermehren; darunter befanden sich neben Treponemen offenbar auch eine Leptospire (*Sp. trimerodonta*) und *B. vincentii* (*Sp. acuta*). Diese Arbeiten wurden von SÉGUIN und VINZENT fortgeführt, die sich in ausgedehnten Untersuchungen mit Morphologie, Züchtungsbedingungen, biochemischen Eigenschaften, serologischem Verhalten und Tierpathogenität von *T. microdentium* [386, 387], *Sp. ambigua*, *Sp. comandoni*, *Sp. skolidonta* und *Sp. trimerodonta*, [386] beschäftigten. Sie benutzten zur Isolierung wie VINZENT und DAUFRESNE 25 % Serumagar mit Hammelniere, beimpften die Röhrchen mit einer Kapillare im Stich in der Nähe des Gewebsstückes und bebrüteten unter Vaselinöl. Überwucherte die Begleitflora zu stark, dann erwies sich ihnen der Zusatz von zwei Tropfen 2 % Malachitgrünlösung oder einfach längere Bebrütung als nützlich, da sie gelegentlich – wie übrigens schon NOGUCHI [300] – in 4–5wöchigen Kulturen als einzige überlebende Keimart Spirochäten gefunden hatten.

Inzwischen fand in den USA ROBINSON (1923) eine etwas komplizierte, aber dennoch interessante Methode zur Reinzüchtung der Mundspirochäten, die auf dem Prinzip aufgebaut war, daß diese Keime Filterpapier zu durchdringen vermögen. Die technische Lösung gelang in der Weise, daß in ein weites Reagenzglas ein engeres Röhrchen, dessen unteres, offenes Ende mit Filterpapier überzogen war, eingestellt wurde; sowohl auf das Filterpapier des inneren wie auf den Boden des äußeren Röhrchens wurde ein Stück Kaninchen- oder Meerschweinchenniere gebracht, beide Röhrchen mit weichem (1 %) Serumagar gefüllt, das innere in der Nähe des Gewebes beimpft, beide mit Paraffinöl überschichtet und bebrütet. Die Spirochäten konnte man dann nach etwa dreitägiger Bebrütung aus dem äußeren Röhrchen in NOGUCHI-Nährböden übertragen, während andere bewegliche Keime das Filterpapier in der Regel erst nach 5–7 Tagen, unbewegliche gar nicht penetrierten. So erhielt ROBINSON Reinkulturen von ulzero-membranösen Anginen, Gingivitiden und aus normalen Mundhöhlen.

In Deutschland gelang kurz darauf REITER (1925) in koaguliertem, zu gleichen Teilen mit Normosal verdünntem Pferdeserum mit einem Stück frischen oder gekochten tierischen Gewebes am Boden die Reinzüchtung einiger Stämme von „*Sp. dentium*“. Die Röhrechen wurden etwa in Höhe des oberen Drittels beimpft, anschließend mit etwas flüssigem Agar überschichtet. Die Spirochäten wuchsen dann wie bei ARNHEIM [11] nach unten auf das Organstück zu; ihre völlige Trennung von der Begleitflora erzielte er einmal schon nach drei, oft aber erst nach mehr als zehn Passagen.

Die nächsten Isolierungen von Mundspirochäten erfolgten wiederum in den USA, wo D. T. SMITH (1927–1932) die Züchtung von *T. microdentium*, *T. mucosum* und *T. macrodentium* bekanntgab. Er reinigte das fusospirochätäre Exsudat durch einige Meerschweinchenpassagen von den gasbildenden Keimen der Begleitflora und beimpfte mit diesem Passagematerial 30% Aszites-(Pleuraexsudat-)Agarröhrechen mit einem Stück Kaninchenniere im Stich; bebrütet wurde nach Überschichtung mit Paraffinöl. Die ebenfalls von SMITH [395] behauptete Reinzüchtung von *B. buccalis* auf der Oberfläche von Blutagarplatten muß dagegen mit großer Zurückhaltung aufgenommen werden, da es als ganz unwahrscheinlich gilt, daß diese am schwersten züchtbare Mundspirochäte unter den genannten Bedingungen wächst.

Ein neues Prinzip für die Trennung der Spirochäten von ihrer Begleitflora führten ECKER und WEED (1931) ein, nachdem sie bemerkt hatten, daß nach dem Zentrifugieren von Hoden-NaCl-Suspensionen luetischer Kaninchen die Treponemen auf der Oberfläche schwimmen. Danach zerkleinerten und suspendierten sie einen Teil treponemenhaltiger Mischkultur in koaguliertem Serum in drei Teilen NaCl-Lösung und zentrifugierten 30 min bei 3000 r. p. m. Die Spirochäten wurden vorsichtig von der Oberfläche des Überstandes abpipettiert und in eine Reihe von kleinen Reagenzgläsern mit einem Stück frischer Meerschweinchenleber und 2 ml bei 70 °C koaguliertem Menschenserum geimpft; Verschluß durch Paraffinstopfen. Drei von sechs solchen Röhrechen erhielten Reinkulturen von *T. microdentium*, die durch Dunkelfeldkontrolle und weitere Passagen gesichert wurden.

PROSKE und SAYERS (1934) konnten nach Vorreinigung des Impfmateri als durch Tierpassagen mit der Technik von NÖGUCHI [299], aber bei Verwendung eines modifizierten Kalbsherzagars nach HUNTOON, die gleichen Spirochätenarten in Reinkultur gewinnen wie kurz vorher D. T. SMITH [394, 395]. Zur Isolierung von *B. buccalis* durch diese Autoren auf der Oberfläche fester Nährböden muß jedoch die gleiche Bemerkung wie zu den entsprechenden Angaben bei SMITH [395] gelten.

Noch einmal wurden in diesen Jahren in Deutschland durch OKABE (1936) Reinkulturen von „*Sp. dentium*“ gezüchtet. Dieser Autor wandte ebenfalls die Stichbeimpfung nach NÖGUCHI [299] an, benutzte aber einen Nährboden von aparter Zusammensetzung: Pferdehodenagar mit Ziegenserum. Die Röhrechen wurden nach dem Erstarren beimpft, mit Paraffin überschichtet und bebrütet. Mit diesem Nährboden erhielt OKABE nach 2–6 Passagen seine Reinkulturen.

Von nun an ging die Entwicklung der Isolierungstechnik der Mundspirochäten völlig in amerikanische Hände über. KAST und KOLMER (1940) erhielten Reinkulturen oraler Treponemen noch auf recht umständliche Weise. *T. microdentium* versuchten sie mit der Filterpapiertechnik von ROBINSON zu isolieren, doch gelang ihnen die völlige Trennung von anderen beweglichen Keimen nicht; dazu bedurfte es einer Reihe weiterer Passagen über flüssige und feste Nährböden verschiedener Zusammensetzung, letztere vom Typ des SCHERESCHEWSKY-Substrats. Für die Reinzüchtung von *T. macrodentium* benutzten sie einen ähnlichen, 0,01% Gentianaviolett enthaltenden und in U-Röhrechen abgefüllten Nährboden. Es wurde nur einer der Schenkel beimpft und mit Vaseline überschichtet, dann beide Öffnungen mit Paraffinstopfen verschlossen. Bei der Bebrütung drangen die beweglichen Anaerobier schnell zum tiefsten Punkt des Röhrechens vor und konnten nach einer Woche aus dem unbeimpften Schenkel entnommen werden. Nach einigen derartigen Passagen wurde in Aszitesherzbouillon mit Kaninchenniere überimpft, wo schließlich im Verlauf einer protrahierten Bebrütung die letzten begleitenden

Stäbchen abstarben. – Umständlich war auch noch bei WICHELHAUSEN und WICHELHAUSEN [437, 438] die Reinzüchtung der Spirochäten. Sie verwandten dafür verschiedene Methoden. Als Ausgangsmaterial diente entweder fusospirochätäres Exsudat direkt oder nach Reinigung durch Meerschweinchenpassagen. Damit wurden nun entweder Schüttelkulturen in weichem Aszitesherzagar (1%) mit 0,1% Zystein-HCl hergestellt oder CHAMBERLAND-Filterkerzen L₉ (und L₅), die in geeignet ausgezogene Reagenzgläser mit dem gleichen Agar eingelegt waren, beimpft und in einem Anaerobiergefäß bebrütet. Die Treponemen wuchsen dann in der Regel in 2–3 Tagen durch das Filter hindurch und bildeten eine wolkige Trübung in dessen Umgebung.

Entscheidende technische Verbesserungen brachten erst wieder die Arbeiten von ROSEBURY und seinen Schülern (seit 1941). ROSEBURY und FOLEY (1941) verwendeten als Kulturgefäße nicht mehr Röhren, sondern kleine Petrischalen. Als Nährböden dienten ihnen die Substrate von NOGUCHI [298] (Aszitesagar 1:3) und von PROSKE und SAYERS. Auf den Boden der Schale brachten sie nicht mehr ein Organstück, sondern etwas fein gehackten Organbrei. In der Mitte des in hoher Schicht ausgegossenen Agars wurde ein Loch ausgehoben, in dieses das Impfmateriale mit einer Kapillare eingetropft und zugleich ein Stück schräg in den Nährboden hineingestochen. Bebrütung erfolgte im Anaerobiergefäß mit 5% CO₂-Gehalt. Später wurden die Petrischalen durch kleine Becher ersetzt [358], für Nährböden ausschließlich die in umfangreichen vergleichenden Untersuchungen als optimal erkannte „Hormon“-Basis nach PROSKE und SAYERS mit 1,2% Agar, 30% Aszitesflüssigkeit und 0,1% Zystein-HCl verwendet. Das Impfmateriale wurde teilweise nur noch in das Loch eingetropft, nicht mehr eingestochen [361]. – Die großen Vorzüge dieser Methode gegenüber der Stichelkultur in Röhren nach NOGUCHI [299] bestehen einmal in einer bedeutenden Ersparnis an Material und Arbeit. Es brauchen mit dem Originalmaterial nur noch 1 bis 2 Becher statt einer größeren Zahl von Röhren beimpft zu werden. Bei Übertragungen erübrigt sich das Zerschlagen der Röhren (und damit die Vernichtung der Kulturen); man entnimmt durch schrägen Einstich mit einer Kapillare durch die sterile Agaroberfläche hindurch vom Rande des wolken Spirochätenwachstums und kann so nach einigen Passagen Reinkulturen erhalten. Außerdem entfällt bei dieser Art der Lochbeimpfung das lästige Platzen der Agarsäule im Röhren infolge der Gasbildung durch die Begleitflora, das die Gewinnung von Reinkulturen außerordentlich erschwert.

Die von ROSEBURY [357, 358, 361] angegebene Technik wurde von HAMPF (1943/1945) übernommen und teilweise abgeändert. Dieser Autor benutzte als Kulturgefäße 25-ml-Bechergläser, als Nährboden ebenfalls das von PROSKE und SAYERS modifizierte HUNTOON-Substrat mit 1,2% Agar, Thiotone BBL (statt Bacto-Pepton), 0,1% Glutathion (statt Zystein) und nur 10% Aszitesflüssigkeit (oder inaktiviertes Serum bzw. kristallisiertes Serumalbumin). Die Gegenwart von frischem tierischem Organgewebe erwies sich ihm als entbehrlich. Auf diese Weise gelang es HAMPF [163, 164] nicht nur Treponemen, sondern auch einige Stämme von *B. vincentii* reinzuzüchten.

Schließlich sind noch die Arbeiten von KLEIN (1943/44; 1950) zu nennen, dem ebenfalls die Isolierung von *T. microdentium*, *T. macrodentium* und *B. vincentii* gelang. Er entwickelte dafür in Anlehnung an das FORTNER-Verfahren [122] eine eigene Methode: der Boden einer kleinen, flachen Petrischale mit Nähragar wird mit *Serratia marcescens* bespatet und auf einer Glasplatte befestigt. Darüber wird, mit der Oberfläche nach unten, der Boden einer großen Petrischale gestülpt, die den beimpften Spirochätennähr-