

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin, Virusabteilung  
(1. Direktor und Professor Dr. HENNEBERG)

**Kritische Hinweise für die Beurteilung der Spezifität  
histologischer Reaktionen der Chorio-Allantois-Membran  
des Hühnchens im Rahmen der Virusdiagnostik\***

**II. Mitteilung**

**Die Reaktionen der Chorio-Allantois-Membran auf unspezifische Reize\*\***

Von

**HERBERT VOSS und GEORG HENNEBERG**

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. September 1956)

Die große Zahl der Arbeiten, welche sich mit der Züchtung von Erregern, insbesondere Viren, auf der Chorio-Allantois-Membran des Brutstieres befassen, ließ immer wieder die Frage nach der Spezifität der aufgedeckten Befunde laut werden. Als einzelnes Beispiel sei die Angabe von LASFARGUES (1953) erwähnt, daß bei Passagezüchtung des Carré-schen Virus der Hundestaupe sich auf der Chorio-Allantois auch dann Herdveränderungen fanden, wenn ein Beweis für die Anwesenheit des Virus nicht zu erbringen war, d. h. im vorliegenden Falle vor der 8. und nach der 34. Passage. Trotz dieser Tatsache ist die Zahl der Versuche, experimentell eine Klärung unspezifischer Abweichungen herbeizuführen, recht gering. Im deutschen Schrifttum liegt bei KNOTHE (1952) und SCHÜRMANN (1952) eine Erwähnung derartiger Möglichkeiten vor; und lediglich NAUCK und NASEMANN (1952) gehen, wenn auch im wesentlichen referierend, näher auf diese Dinge ein.

Wenn wir nun im folgenden das Problem noch einmal aufgreifen wollen, so darum, weil wir glauben, mit unserer in der ersten Mitteilung (Voss und VAUCK 1955) dargelegten Auffassung der normalen Histologie der Chorio-Allantois einige Beobachtungen der Literatur ihrem Wesen nach klären zu können. Es sei uns daher gestattet, die wichtigsten Daten der anglo-amerikanischen Literatur noch einmal kurz zu skizzieren.

GOULSTON und MOTTRAM (1932) untersuchen mit dem Ziel, einwandfreie Kontrollen für Bestrahlungsversuche zu gewinnen, den Einfluß der Fensterung der Eischale auf den Zustand der Eihäute. Sie finden nur dann Reaktionen, wenn die in einem Bereich von  $1 \times 1$  cm freigelegte Schalenmembran einige Zeit der Luft ausgesetzt und nicht für einen sofortigen sterilen Verschluß des Schalendefektes Sorge getragen wird. Dabei ist der Zeitpunkt einer zweistündigen Exposition der

\* Herrn Prof. Dr. R. RÖSSLER zum 80. Geburtstag gewidmet.

\*\* Vgl. Virchows Arch. 327, 127 (1955).

Schalenmembran, 6. oder 10. Tag, relativ gleichgültig. Die Veränderungen bestehen in einer Verdickung und Trübung der Chorio-Allantois oder in einer Verdünnung derselben mit Schwinden der Gefäßzeichnung oder in petechialen Blutungen. GREIFF und PINKERTON (1949) beobachten bei Untersuchungen über die Wirkung der Temperatur auf Wachstum und Sauerstoffverbrauch des Hühnchens nach Bebrütung bei 41° C in der Chorio-Allantois-Membran große Blasen, die mit einer viskösen Flüssigkeit gefüllt sind und führen auf diesen Befund einen starken Abfall der Sauerstoffaufnahme zurück. COVEY (1934) berichtet im Rahmen einer Züchtung von Pferdeencephalomyelitisvirus im Ei über ödematöse Schwellungen der Chorio-Allantois nach Aufbringen von normalem Pferdeserum bei Kontrollen. GOLDWORTHY und MOPPETT (1935) sehen nach steriles Verschluß einer mit Baumwolle, normaler oder veränderter Eihaut beschickten Schalenmembran keine nennenswerten Erscheinungen. Sie kommen auf Grund einer größeren Reihe von Experimenten zu dem Schluß, daß Luftkeime bakterieller Natur für die Entstehung unspezifischer Reaktionen keine wesentliche Rolle spielen. Sehr wichtig ist dagegen nach ihrer Erfahrung der Entzug von Wasser durch die freiliegende Schalenhaut. So verstärkt trockener Luftstrom unabhängig von seiner Temperatur die Veränderungen, während Wasserdampf unschädlich ist. Abkühlung an sich soll reaktionslos vertragen werden. Von zwei Schalenfenstern, die entgegengesetzt angelegt werden, zeigt das an der Oberseite des Eies befindliche die stärkeren Erscheinungen. An Reaktionsarten werden ein peripherer (A), ein hypertrophischer zentraler (B), ein sekundär atrophischer (C) und ein primär atrophischer (D) Typ aufgestellt.

Wegen der auch bei d'AUNOY und EVANS (1937), BURNET (1938) sowie BEVERIDGE und BURNET (1946) erwähnten Frage der Einschlußkörper sei auf unsere erste Mitteilung verwiesen. Unsere jetzigen Erfahrungen bestätigen, daß bei exakter Schnittführung Deutungsschwierigkeiten erheblich weniger eintreten, als es den eben genannten Literaturhinweisen nach scheinen möchte. Bei d'AUNOY und EVANS (1937) findet sich eine von NAUCK und NASEMANN (1952) übernommene Einteilung unspezifischer Reaktionen in 4 Typen: reine Mesenchymveränderungen, Beteiligung aller Schichten, reine Ektodermproliferationen, Ekto- und Entodermwucherungen ohne Beeinflussung des Mesenchyms. Der Handbuchartikel von BURNET (1938) und die weitgehend gleichlautende Monographie von

BEVERIDGE und BURNET (1946) bringen kurz zusammenfassende Darstellungen über unspezifische Veränderungen nach steriler Bouillon, Filtraten oder Emulsionen tierischer Gewebe, Seren. Ödem und Trübungen sind hier die Regel, während aufgetrocknete Blutungsreste und evtl. feine granuläre Trübungen gegenüber den Sägeschnitten der Schale vorkommen können. Als weitere Veränderung wird das „traumatische Ulcus“ hervorgehoben. Dieses soll, nicht ganz verständlich, bei 10tägigen Bruteiern stärker und häufiger als im Standard-Impfalter von 12 Tagen sein. Die Ränder werden als verdickt, weißlich beschrieben, mit strahliger Ausbreitung von Trübungen entlang den Gefäßen. Besonders große Ulcera wurden nach toxischen Seren gesehen. Verlust des Ektoderm über größere Flächen, Infiltration des Mesenchyms und Wucherung des Entoderms gehören zum histologischen Bild.

Von Bedeutung für Ausfall und Ausmaß der Reaktionen sind verschiedene zusätzliche Bedingungen. Der Einfluß des *Alters* der *Embryonen* wird von BURNET (1938) wie folgt charakterisiert: „... generally embryos inoculated earlier than the 12th day show a smaller number of primary foci from the same inoculum, but the

individual foci are larger and more diffuse.“ Hier ergibt sich eine gewisse Diskrepanz zum traumatischen Ulcus. Auf diese Dinge wird in der Besprechung der Ergebnisse noch näher einzugehen sein. Die Dauer der Nachbebrütung ist wesentlich für den gewünschten Entwicklungsgrad der Veränderungen. Zur Bebrütungs-temperatur kann grundsätzlich gesagt werden, daß nach BURNET (1938) niedrigere Grade die Empfänglichkeit für Viren steigern, aber auch die unspezifischen Reaktionen vermehren, während höhere Temperaturen, etwa um 39,5° C die Embryonen widerstandsfähiger machen. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Angaben von GREIFF und PINKERTON (1949) verwiesen.

### Material und Methoden

Die technischen Einzelheiten der Materialentnahme, Fixation, Einbettung, Färbung und Mikrophotographie entsprechen der ersten Mitteilung und mögen dort nachgelesen werden.

Das Gesamtmaterial belief sich auf etwa 3000 untersuchte Schnitte verschiedener Reaktionsgruppen, von denen rund 100 für die Mikrophotographie ausgewertet wurden bei etwa 120 verschiedenen Abbildungen. Es wurde grundsätzlich versucht, den gleichen Mechanismus sowohl bei jungen, 7—8tägigen Embryonen wie bei älteren, 10—12tägigen Bruteiern ablaufen zu lassen, um ein unterschiedliches Verhalten erkennen zu können. Vereinzelt wurden auch ältere Stadien, z. B. vom 18. Bruttag, herangezogen. Der Reaktionsablauf wurde je nach Stärke und Veränderlichkeit der Erscheinungen in verschiedenen Zeitabständen erfaßt, die zwischen 3 und 96 Std lagen. Die einzelnen nach Reaktionsart oder Zeitpunkt der Präparation bestimmten Gruppen wurden mit 5—10 Bruteiern besetzt. Die Zahl der zu den Versuchen benutzten Eier betrug rund 1000.

Die durchgeführten Experimente können kurz tabellarisch wie folgt zusammengefaßt werden. Die näheren Versuchsbedingungen werden dann bei der Besprechung der Befunde ergänzt.

I. Maßnahmen, die bei der Vorbereitung von Bruteiern für die Beimpfung von Bedeutung sein können:

1. Desinfektion der Eischale mittels Jodtinktur.  
2. Ansägen der Schale mit Hilfe eines Zahntechnikbohrgerätes und Diamantscheibe.

3. Fensterung der Eischale 1 × 1 cm, Dropping der Chorio-Allantois.

II. Einfluß verschiedener  $p_H$ -Werte auf die abgelöste Chorio-Allantois:

1. Salzsäure 1/10 n,  $p_H$  1,3.

2. m/15  $KH_2PO_4$ ,  $p_H$  4,5.

3. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN  $p_H$  7,0.

4. Natronlauge 1/10 n,  $p_H$  11,25.

III. Wirkung hypertoner Lösungen auf die abgelöste Chorio-Allantois:

1. Traubenzuckerlösung 20%ig.

2. Kochsalzlösung 20%ig.

## IV. Verschiedene Temperaturen:

1. Vorbrütung bei 40° C.
2. Vorbrütung bei 41° C.
3. Aufbringen von Kohlensäureschnee auf die abgelöste Chorio-Allantois.

V. Aufbringen von Substanzen mit reiner Fremdkörperwirkung auf die abgelöste Chorio-Allantios:

1. Tuscheaufschwemmung.
2. Schmirgelteilchen.

## VI. Beispiele chemischer Agentien:

1. Bleiacetat.
2. Formol.
3. Phenol.

VII. Wirkung biologischer Substrate auf die abgelöste Chorio-Allantois:

1. Aufschwemmung normaler Chorio-Allantios.
2. Menschliches Serum.
3. Menschliche Erythrocyten.

VIII. Herabsetzung der Sauerstoffzufuhr durch Abdecken der oberen Eihälfte mit Vaseline.

## Eigene Befunde

**I. Maßnahmen, die bei der Vorbereitung von Bruteiern für die Beimpfung von Bedeutung sein können**

*1. Desinfektion der Eischale mittels Jodtinktur*

Bei 10 Tage vorbebrüteten Eiern wurde in einem fünfmarkstückgroßen Bereich des oberen Poles dreimal im Verlaufe eines Tages die Schale mit konzentrierter Jodlösung bestrichen. Die Entnahme der Eihäute erfolgte zusammen mit der weißen Schalenhaut nach 12, 24, 36, 48, 72, 96 und 120 Std.

Zum Vergleich wurde mit derselben Jodlösung, die routinemäßig in der Virologie Verwendung findet, bei 7tägigen Bruteiern der entsprechende Schalenbezirk einmal jodiert. Die unerwartet starken Reaktionen bei den 10tägigen Bruteiern zwang zu einer Verringerung der Joddosis, die zudem mit dem üblichen Verfahren der Virologie in Einklang steht. Präparation der einzelnen Gruppen nach 12, 24, 36, 48, 72 und 96 Std.

*Befunde.* Wegen der Präparation der Chorio-Allantois (Ch.A.) zusammen mit der weißen Schalenhaut wurden keine makroskopischen Befunde erhoben. Mikroskopisch zeigten alle Schnitte 10tägiger Eier zum Teil erhebliche Veränderungen, die großenteils in Mehrzahl vorhanden, d. h. durch intakte Partien unterbrochen waren. Die herdförmige Natur der Reaktionen ist leicht durch die Anordnung der Schalenporen zu erklären.

Die Veränderungen wechseln außerordentlich an Intensität und Ausdehnung. Das erste Zeichen der Einwirkung ist eine Hypertrophie und Wucherung des Capillarschichtendothels zunächst nur der schalennahen,

dann auch der schalenfernen Capillarseite. Bei stärkerer Schädigung kommt es zur Nekrose des Endothels, welcher sehr oft eine Ablösung der Ch.A. von der Schalenhaut folgt (Abb. 1b, rechts unten). Diese Ablösung kann von einer mehr oder weniger massiven Blutung oder von einer serösen Exsudation in den entstehenden Spaltraum begleitet sein. Sehr bald kommt es weiter zur Durchtränkung des angrenzenden Mesenchyms mit eiweißreicher Flüssigkeit und zu einer Einwanderung meist

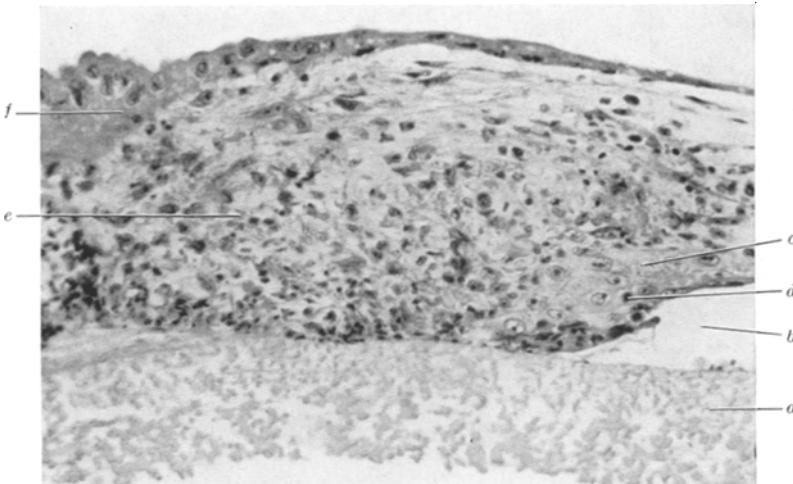


Abb. 1. Chorio-Allantois 10. Bruttag. Jodreaktion nach 36 Std. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 300×. a weiße Schalenhaut. Bei b Ablösung der Chorio-Allantois von der Schalenhaut infolge der Jodeinwirkung. c Gewuchertes Capillarschichtendothel mit eingeschlossenem eosinophilem Leukocyten (d). Das Mesenchym (e) ist stark zellig durchsetzt und enthält Erythrocyten, vermehrte Bindegewebszellen und eosinophile Leukocyten. f Gewuchertes Entoderm

eosinophiler Leukocyten. Die Zerstörung der Capillarschicht bedingt in den meisten Fällen auch eine Blutung ins Mesenchym, wonach Erythrophagien die Regel sind. Nicht selten sieht man Erythrocyten in den gewucherten Capillarschichtendothelen eingeschlossen. Das Entoderm reagiert teils vor dem Mesenchym, teils gleichzeitig oder auch später in Form einer oft tumorartig anmutenden Zellvermehrung (Abb. 1f, links oben). Nimmt der Herd eine größere Ausdehnung an, dann schießen nach 24—36 Std an seiner Grenze neugebildete Capillaren auf, die leukocytäre Infiltration wird dichter und das benachbarte Bindegewebsgerüst wird auf das Mehrfache verstärkt. In den späteren Stadien wird das Bindegewebe mitunter zu einer homogenen Masse umgewandelt, die sich im H.-E.-Schnitt rot, im Azan-Schnitt blau anfärbt und im letzteren Falle noch eine leichte parallelfaserige Struktur aufweisen kann (Abb. 3). Ist die Schädigung sehr starkgewesen, so wird der zentrale Teil oft bei

intakter Schalenhaut regelrecht verbrannt und nekrotisch. Die Abdichtung der Wundstelle erfolgt sehr rasch durch Blutungen sowie Endothel- und Entodermwucherungen (Abb. 2).

Gegenüber diesen regelmäßigen massiven Befunden sind die Veränderungen bei 7tägigen Bruteiern nach einmaliger Jodpinselung naturgemäß

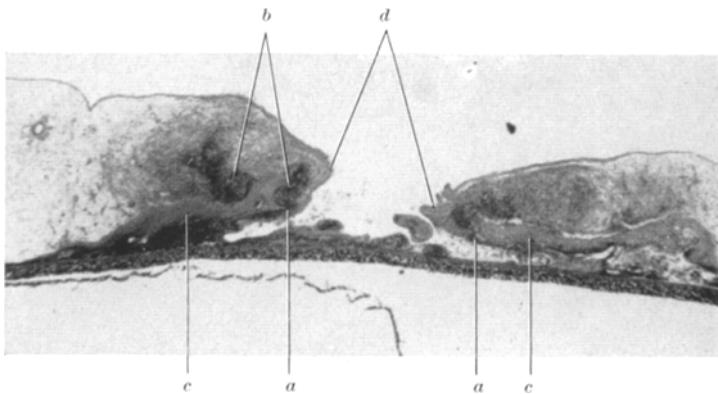


Abb. 2. Chorio-Allantois 10. Bruttag. Jodreaktion nach 96 Std. Susa, Paraffin, Azan. Vergrößerung etwa 30×. Übersichtsbild bei sehr starker Einwirkung mit zentralem Totaldefekt. Abschluß des Wundgebietes durch Endothelwucherungen und neugebildetes Entoderm. Endothel und Entoderm gehen nicht ineinander über. Die Lücke (a) zwischen beiden wird durch Blutcoagula geschlossen. b Blutungen. c Endothelmassen. d Entoderm

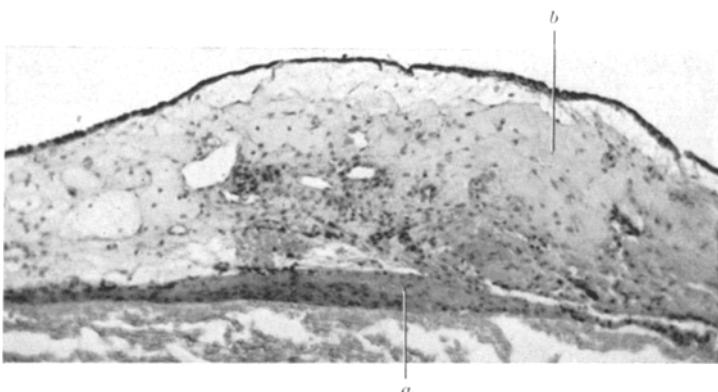


Abb. 3. Chorio-Allantois 10. Bruttag. Jodreaktion nach 96 Std. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 125×. Wucherung des Capillarschichtendothels (a). Umwandlung der mesenchymalen Grundsubstanz in eine mehr oder weniger homogene, acidophile, azanblaue Masse (b). Spätstadium

beträchtlich geringer. Immerhin finden sich nicht allzu selten kleinere Blutungen in das Mesenchym, mit Fragmenten roter Blutkörperchen beladene Bindegewebzellen, capillarschichtnahes Ödem, welches die Maschenweite des mesenchymalen Fasergerüstes stark vergrößert, gelegentlich auch größere leukocytäre Infiltrate und flächige oder knospenförmige Vermehrungen von Ektodermzellen bei verlagerter aber unveränderter Capillarschicht.

*2. Ansägen der Schale mit Hilfe eines Zahntechnikbohrgerätes  
und Diamantscheibe*

Das seit BURNET und FERRY (1934) allgemein üblich gewordene Verfahren hat den Vorteil einer großen Zeitersparnis. Die Kalkschale des Eies wird mit der auf der Kante angesetzten Diamantscheibe in den gewünschten Schnittlinien abgeschliffen. Die freigelegte weiße Schalenhaut darf dabei nicht verletzt werden, sollte aber auch keine Kalkreste mehr tragen. Die Rotationsgeschwindigkeit der Diamantscheibe sollte relativ hoch gewählt werden, damit Resonanzen, welche zu Verletzungen führen könnten, vermieden werden.

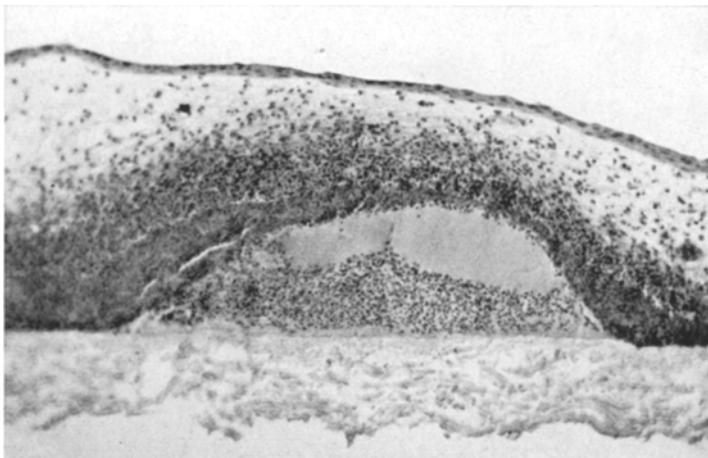


Abb. 4. Chorio-Allantois 11. Bruttag. 12 Std nach Ansägen der Eischale. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 135×. Typische massive Blutung unter die intakte weiße Schalenhaut. Bogenförmige Ablösung der Chorio-Allantois durch die Blutung. An Intensität rasch abnehmende Blutung in das capillarschichtnahe Bindegewebe. Mäßige eosinophile Infiltration des Mesenchyms

In unseren Versuchen wurde bei 7-, 11- und 18tägigen Bruteiern über der bei der Durchleuchtung festgestellten Mitte der Ch.A. ein Kreuz gesägt. Der sofortige sterile Verschluß geschah mittels Vaseline und Deckglas. Die Präparation der Ch.A. zusammen mit der weißen Schalenhaut erfolgte bei 7- und 18tägigen Eiern nach 24 und 48 Std, bei 11 Tage vorbebrüteten Eiern nach 12, 24, 36, 48 und 72 Std.

*Befunde.* In dem untersuchten Material konnten in allen Fällen im Bereich der Sägeschnitte Blutungen festgestellt werden. Diese sind teils punktförmig, teils nehmen sie längere Strecken ein. Das typische Bild der älteren 11tägigen Bruteier zeigt die Abb. 4. Über der unverletzt gebliebenen weißen Schalenhaut ist die Ch.A. bogenförmig abgehoben. Die Sehne des Bogens wird von der Grenzmembran der weißen Schalenhaut gebildet, an der keinerlei Zellen zu erkennen sind. Die Bogenfläche wird schalenwärts von einem breiten Band locker liegender Erythrocyten eingenommen, während der restliche Teil eine eiweißreiche, acidophile, homogene Masse zeigt, die wohl als Plasma zu deuten ist. Die Bogenlinie selbst wird von einer verschieden breiten Schicht massiert liegender

roter Blutzellen geformt, oberhalb welcher das Mesenchym eine wesentlich weniger dichte und rasch an Intensität abnehmende Blutungszone zeigt. An der Grenze der beiden letzten Schichten ist häufig noch Capillarendothel zu erkennen. Das Entoderm ist zunächst völlig unbeteiligt, weist aber oft bald zottige Wucherungen auf. Die Weiterentwicklung geht unter Leukocyteneinwanderung und Abgrenzung des Blutungsherdes durch neugebildetes Bindegewebe vor sich. Der ganze Prozeß ist durch die intakte Schalenhaut von außen auch nicht andeutungsweise zu sehen, auch dann nicht, wenn wie in Abb. 5 eine breite Fläche

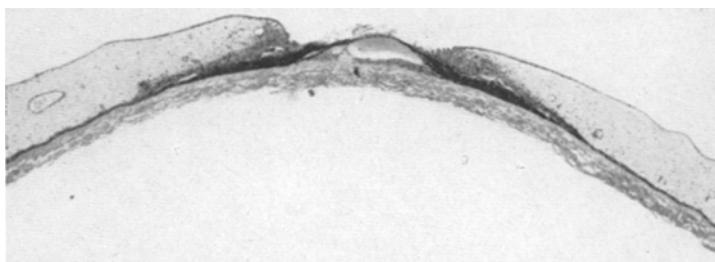


Abb. 5. Chorio-Allantois 11. Bruttag. 36 Std nach Ansägen der Eischale. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 30×. Zentrale Totalnekrose der Chorio-Allantois-Membran über dem Sägeschnitt bei völlig unveränderter weißer Schalenhaut. Abgrenzung des Defektes durch gewuchertes Entoderm und Blutcoagula

der Ch.A. völlig zerstört und in eine papierdünne Haut über einem Plasmasee umgewandelt ist. Die Abgrenzung der Wundfläche erfolgt ganz entsprechend der Jodreaktion durch Überwucherung mit Entoderm und Endothel.

18 Tage vorbebrütete Eier lassen grundsätzlich die gleichen Veränderungen erkennen. Die von den Blutungen eingenommenen Flächen sind aber durchschnittlich größer als bei den 11tägigen Eiern und weisen infolge Entmischungerscheinungen, d. h. Sedimentation der Erythrocyten und Bildung reiner Plasmaflächen, häufig mehrfache Unterteilungen auf.

Etwas anders verhalten sich die 7 Tage alten Bruteier. Bei ihnen ist ja die Verbindung der Ch.A. zur Schalenhaut noch nicht so fest wie später. Dadurch kommt es leichter zur Ablösung und zur massiven Blutung in den zwischen weißer Schalenhaut und Ch.A. entstehenden Spaltraum. In anderen Fällen tritt dagegen eine Lösung von der Schalenhaut nicht oder nur teilweise ein. Dann kann eine mehr oder weniger dichte Blutung aus der noch gut sichtbaren Capillarschicht die Folge sein oder man sieht im gleichen Schnitt eine Blutung zwischen Ch.A. und Schalenhaut, eine aneurysmatische Umbildung der Capillarschicht und eine massive Blutdurchsetzung des Mesenchyms in ganzer Breite.

### 3. Fensterung der Eischale $1 \times 1$ cm, „Droping“ der Chorio-Allantois

Die Fensterung der Eischale in der genannten Größe ist einmal Voraussetzung für das einwandfreie Anlegen unserer Glasklemme, zum anderen schafft sie einen genügend großen Raum zwischen den Sägeverletzungen, der frei von Veränderungen sein kann. Das Ablösen der Chorio-Allantois unter Schaffung einer künstlichen zweiten Luftkammer wurde nach BURNET und GALLOWAY (1934) durchgeführt. Es folgte der sofortige sterile Verschluß mittels Vaseline und Deckglas.

*Befunde.* Abgesehen von den obigen Sägeverletzungen konnten bei der reinen Fensterung der Eier keine regelmäßigen oder irgendwie nennenswerten Abweichungen aufgedeckt werden.

## II. Einfluß verschiedener $p_H$ -Werte auf die abgelöste Chorio-Allantois

### 1. Salzsäure $1/10$ n, $p_H$ 1,3

Der  $p_H$ -Wert eines Impfmaterials kann für die resultierende Reaktion von Bedeutung sein. Wir wählten extreme Werte, um evtl. typische Veränderungen erkennen zu können, die dann bei geringeren Abweichungen leichter ihrer Natur nach zu bestimmen wären. Bei der ganzen Gruppe wurde so vorgegangen, daß nach Fensterung der Schale je  $0,05$  cm $^3$  der jeweiligen sterilen Flüssigkeit auf die weiße Schalenhaut gebracht wurde. Nach Anlegen eines feinen Loches über der natürlichen Luftkammer sank dann durch vorsichtiges Auseinanderziehen der weißen Schalenhaut gegen die Faserrichtung der aufgebrachte Tropfen leicht ein und die künstliche Luftkammer wurde durch geringen Sog über der natürlichen fertiggestellt. Steriler Verschluß.

Die Präparation der einzelnen Stadien erfolgte sowohl bei 7- wie bei 10tägigen Eiern nach 3, 6, 9, 12, 36 und 60 Std.

*Befunde.* Makroskopisch wiesen die Eihäute bei einem  $p_H$  im sauren Bereich feinste, oft mit bloßem Auge kaum sichtbare petechiale Blutungen auf, die diffus über die ganze Fläche der Ch.A. verteilt waren. Die schwächere Reaktion lag bei jüngeren Eihäuten vor.

Mikroskopisch ist die Säurewirkung bei 10tägigen Bruteiern im Frühstadium durch scharf umschriebene kleine Blutungen charakterisiert, die zu einer leichten kugeligen Aufreibung des betreffenden Abschnittes führen. Das Capillarschichtendothel ist in diesen Bezirken meist mehr oder weniger vollständig zerstört. Im späteren Verlauf treten bald zahlreiche Bindegewebsphagocyten auf, die die roten Blutzellen in Ein- oder Mehrzahl einschließen. Besonders typisch aber ist eine starke Faserneubildung, durch welche die frei im Mesenchym liegenden Erythrocyten und die Phagocyten einzeln oder in kleinen Gruppen umschlossen und gegeneinander abgeteilt werden. Bei größeren Herden ist wieder mit einer starken Tendenz zur Abkapselung durch Capillarnеubildung, Infiltration und Faseranreicherung zu rechnen (Abb. 6).

Bei den jungen, erst 7 Tage vorbebrüteten Eiern bestätigt der mikroskopische Befund den makroskopischen Eindruck. Die ersten Erscheinungen bestehen in einer gewissen Quellung des dadurch besonders deutlichen und von der Capillarschicht klar abgegrenzten Ektoderms, weiter in einem capillarschichtnahen Ödem mit weitgehender Zerstörung

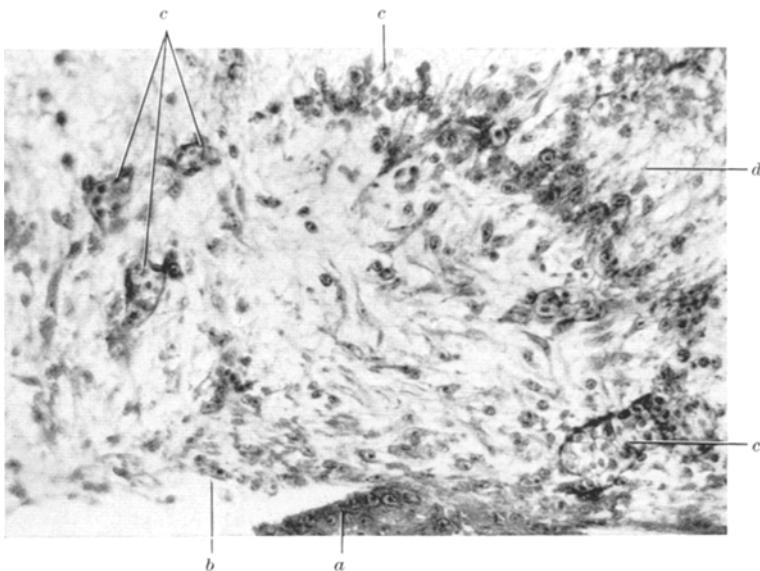


Abb. 6. Chorio-Allantois 10. Bruttag. 60 Std nach n/10 HCl pH 1,3. Susa, Paraffin, Azan. Vergrößerung etwa 300×. Umschriebene Zone stärkster Säurewirkung. Schalenseite unten. *a* Wucherung des Capillarschichtendothels. *b* Endotheldefekt. Versuch der Abschirmung des schädlichen Agens durch Bildung eines Walles aus neu sprossenden Capillaren (*c*) und vermehrten Mesenchymzellen. Im Innern des so abgegrenzten Herdes junge Fibroblasten. Jenseits des Walles verstärktes mesenchymales Fasergerüst (*d*)

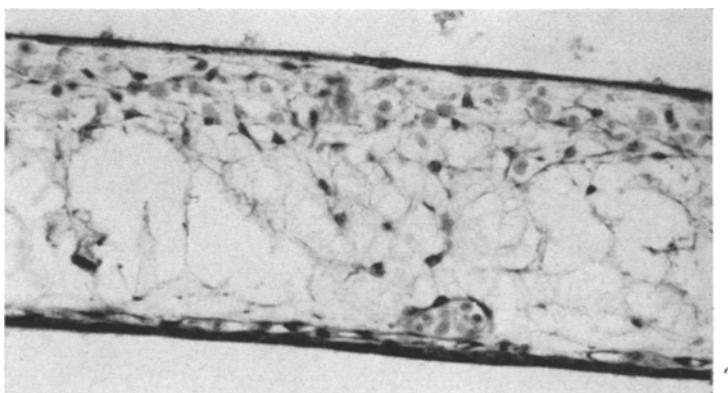


Abb. 7. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 3 Std nach n/10 HCl pH 1,3. Susa Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 315×. Quellung des Ektoderms (*a*). Capillarschichtnahes Ödem mit Vergrößerung des mesenchymalen Maschenwerkes. Spärliche Blutung in die ödemfreien Bindegewebsanteile

des bis dahin feinmaschigen Fasergerüstes und evtl. in spärlichen Blutungen ins Mesenchym (Abb. 7). In der Folge treten umschriebene Blutungen entsprechend den älteren Bruteiern auf, die ebenfalls die

ganze Ch.A. durchsetzen, aber im Gegensatz zur 10tägigen Eihaut durch Ektodermwucherungen gekennzeichnet sind. Die Ausdehnung des jetzt vielschichtigen Ektoderms entspricht der Blutungsfläche. Die Einzelzellen sind großenteils stark vacuolisiert und *ähneln stark den Befunden einer Virusinfektion*. Diffuse Blutungen und Infiltrate sind dagegen selten. Eine so starke bindegewebige Reaktion wie bei den älteren Eiern war nicht festzustellen.

*2.  $m/15\ KH_2PO_4$ ,  $p_H\ 4,5$*

Die Versuchsanordnung wurde unter II, 1 erläutert. Die Stadieneinteilung war ebenfalls die gleiche (3, 6, 9, 12, 36 und 60 Std).

*Befunde.* Die Erscheinungen entsprechen qualitativ durchaus denen der Salzsäureeinwirkung. Das Ausmaß ist dagegen etwas schwächer. Auf eine Ausführung im einzelnen kann verzichtet werden.

*3. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN  $p_H\ 7,0$*

Versuchsanordnung und Präparationsstadien s. unter II, 1.

*Befunde.* Entsprechend der reinen Fensterung nach I, 3 konnten in dieser Reihe keine nennenswerten Abweichungen nachgewiesen werden. Diese Schnittserie stellt damit gewissermaßen eine Normalkontrolle zu den übrigen  $p_H$ -Experimenten dar.

*4. Natronlauge 1/10 n,  $p_H\ 11,25$ .*

Versuchsanordnung und Entnahmetermine wie unter II, 1.

*Befunde.* Schon makroskopisch ist der Befund klar und eindeutig. Es kommt sowohl bei 10- wie bei 7tägigen Embryonen zu recht zahlreichen, diffus verteilten Punktblutungen, die derber als bei Säureeinwirkung sind. Häufig findet sich eine gewisse ödematöse Schwellung und Starrheit. Zu späteren Terminen werden die vorherigen Blutungen trüb und weißlich infiltriert. Nicht ganz selten konfluieren verschiedene Blutpunkte.

Mikroskopisch fällt bei 10 Tage alten Bruteiern häufig eine starke Verquellung und eine verwaschene Zeichnung der gesamten Capillarschicht ins Auge. Diese Colliquationsnekrose greift oft rasch auf das angrenzende Mesenchym über, das dann einschließlich darin enthaltener Blutungen und größerer Gefäße undeutlich verschmiert aussieht. Wenn nicht eine größere Erythrocytenmasse die alte Form in etwa aufrecht erhält, bricht die ganze Ch.A. dann leicht zu einer papierdünnen Schicht zusammen. Das ist besonders in den Strecken zwischen größeren Blutpunkten der Fall. In späteren Stadien findet man entweder infolge ödematöser Quellung starre Eihäute mit spärlicher leukocytärer Infiltration oder Blutungsherde, die durch einwandernde Phagozyten und Leukocyten zumindest an den Rändern aufgeschlossen und

durch faserreiches Bindegewebe voneinander getrennt werden. Dabei ist die Bindegewebsentwicklung nie so reichlich wie bei Säureeinwirkung.

Bei der mikroskopischen Überprüfung 7tägiger Eihäute sieht man ähnlich wie im sauren  $p_H$ -Bereich wieder eine Schwellung des Ektoderms, die aber jetzt nicht gleichmäßig ist, sondern fleckig und unterbrochen erscheint. Damit verbindet sich eine starke Hyperämie der Capillarschicht, die prall gefüllte und erweiterte Schlingenteile aufweist. Hier

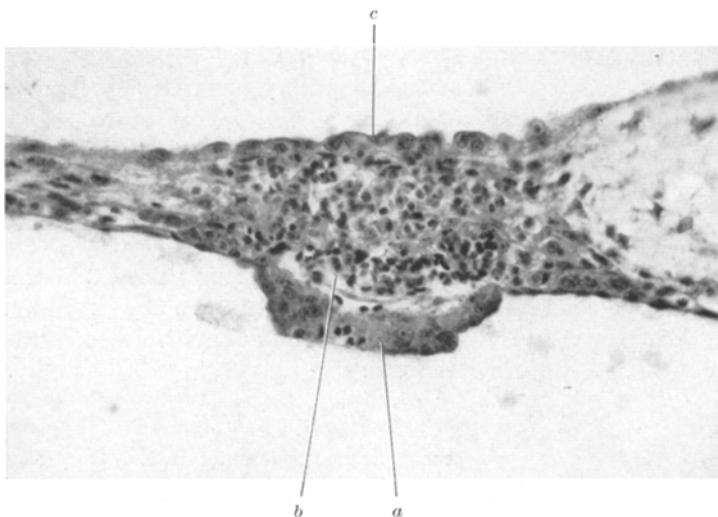


Abb. 8. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 6 Std nach n/10 NaOH  $p_H$  11,25. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 330×. Umschriebene Wucherung des von Leukocyten durchsetzten Ektoderms (a). Petechiale Blutung ins Mesenchym aus der stark erweiterten und prall gefüllten Capillarschicht (b). Hypertrophie der Entodermzellen (c)

besteht dann auch die Möglichkeit des Austrittes von roten Blutzellen, teils in geringer Menge mit rasch einsetzender Erythrophagie, teils diffus und mehr oder weniger in ganzer Breite die Ch.A. durchsetzend. Häufiger ist aber eine mehr herdförmige Reaktion, zu der eine gewisse Auftreibung der Ch.A. durch Blutung und Infiltration sowie eine Ektodermwucherung gehört (Abb. 8). Das durch Phagocytose von Erythrocyten- und Leukozytenträmmern stark beanspruchte Ektoderm hält dann häufig der Belastung nicht stand und reißt über der größten Höhe der Auftreibung ein. Sich aneinanderreihende größere Blutungen verleihen der Ch.A. im Schnitt gelegentlich das Aussehen einer ungleichmäßig gestopften Wurst. Eine Art bindegewebiger Organisation, zu der Ansätze bei den älteren Eihäuten häufig angetroffen werden, sieht man bei den jüngeren kaum. Regelmäßiger scheint die restitutio ad integrum zu sein.

### III. Wirkung hypertoner Lösungen auf die abgelöste Chorio-Allantois

#### 1. Traubenzuckerlösung 20% ig

Abweichungen von der Isotonie sind gelegentlich erwünscht oder erforderlich, wenn man einem Virus die optimalen Bedingungen zum Angehen schaffen will. Eine gewisse leichte Schädigung des Bruteies ist dabei u. U. nicht von Nachteil, weil dadurch evtl. gegenüber dem Virus wirksame Abwehrkräfte durchbrochen werden können. Im Rahmen der Versuchsgruppe III wurden nun 12tägige Bruteier mit 20%iger Traubenzucker- bzw. Kochsalzlösung beschickt und 48 Std bei 35° C weiter bebrütet. Andere Stadien kamen bei diesen beiden Serien nicht zur Untersuchung. Menge des Inoculums 0,1 cm<sup>3</sup>.

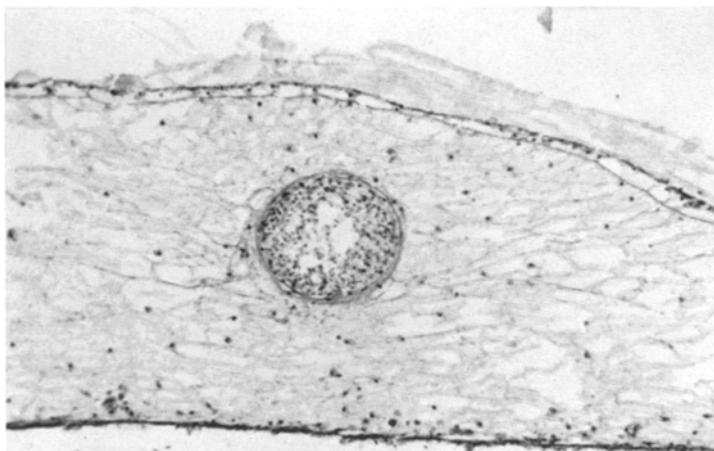


Abb. 9. Chorio-Allantois 12. Bruttag. 48 Std nach NaCl 20 % ig. Formol, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 125 ×. Starkes mesenchymales Ödem mit Verquellung des Fasergerüstes. Blasige Auftriebung der Entodermzellen. Verquellung der Gefäßwand. Intravasale Hämolyse

*Befunde.* Neben einer mäßigen, teils capillarschichtnahen, teils gleichförmigen ödematösen Verdickung der Ch.A. bildete eine regelmäßig anzutreffende, diffuse, teils schüttete, teils dichte Einlagerung von eosinophilen Leukocyten den Hauptbefund der Traubenzucker-versuche. Andere nennenswerte Abweichungen fanden sich nicht.

#### 2. Kochsalzlösung 20% ig

Versuchsanordnung wie unter III, 1.

*Befunde.* Die Schäden der Ch.A. sind bei der hochprozentigen Kochsalzlösung entsprechend der größeren osmotischen Wirksamkeit viel weitgehender als bei dem Traubenzuckerversuch. Das äußere Capillarschichtendothel ist geschrumpft und vielfach nekrotisch. Das innere Endothelblatt hat mitunter knospenförmige Wucherungen. Blutungen

aus der stark veränderten Capillarschicht sind relativ häufig, erreichen aber niemals größeres Ausmaß. Das Maschenwerk der Mesenchymfasern ist vergröbert, verwaschen und verquollen. Die eingelagerten Zellen sind klein und dicht. Besonders auffällig und typisch ist aber einmal die starke Quellung der Entodermzellen, die nur noch große helle Blasen mit zentral schwimmendem oder randständigem Kern darstellen, zum anderen der Zustand der Gefäße (Abb. 9). Auch in größeren Arterien und Venen scheinen die Erythrocyten im Lumen hämolysiert zu sein. Die Wände sind verquollen, das Endothel ist vielfach aufgesplittert. Um die Gefäße herum verlaufen oft mehr oder weniger konzentrische, sich aber gegenseitig verflechtende acidophile Ringe mit gelegentlichen flächigen Verbreiterungen. Mitunter ist das ganze Mesenchym ödematos durchtränkt.

#### IV. Verschiedene Temperaturen

##### 1. Vorbrütung bei 40° C

Ohne weitere Maßnahmen wurden die Eier nach üblicher 7—8tägiger oder 10tägiger Bebrütung 6, 12, 24, 36 und 60 Std bei 40° C gehalten. Die Entnahme der Ch.A. erfolgte zusammen mit der weißen Schalenhaut.

*Befunde.* Die Ch.A. sieht vielleicht im ganzen etwas zarter aus. Neben Blutungen unter die weiße Schalenhaut, die nicht unbedingt auf die erhöhte Bruttemperatur zurückgeführt werden müssen, sind aber sonst keine auffälligen Veränderungen vorhanden. Zwischen 7- und 10tägigen Eiern besteht kein Unterschied.

##### 2. Vorbrütung bei 41° C

Versuchsanordnung und Präparationsdaten entsprechen IV, 1.

*Befunde.* Der Eindruck einer gewissen Zerbrechlichkeit der Eihäute ist noch verstärkt. Entoderm und Capillarschichtendothel bilden ganz schmale Bänder. Die Mesenchymzellen sind klein und dicht. Ablösungen der Ch.A. von der Schalenhaut mit Blutung in den Spaltraum werden ebenso wie Blutungen ins Mesenchym häufiger. Wichtiger und regelmäßiger scheinen aber Flüssigkeitseinlagerungen ins Mesenchym zu sein, die zu blasigen Abhebungen des Entoderms führen. Größere Unterschiede zwischen jungen und älteren Eihäuten fehlen.

##### 3. Aufbringen von Kohlensäureschnee auf die abgelöste Chorio-Allantois

Bei 12tägigen Bruteiern wurde die abgelöste Ch.A. mit einer Messerspitze voll Kohlensäureschnee beschickt. Die weitere Bebrütung erfolgte 48 Std bei 35° C. Neben der lokalen Kältewirkung ist bei diesem Vorgehen aber die Wirkung der hohen CO<sub>2</sub>-Spannung in der künstlichen Luftkammer zu berücksichtigen.

*Befunde.* Die ödematos aufgetriebene Ch.A. ist häufig diffus mit eosinophilen Leukocyten durchsetzt. Wucherungen des Capillarschichtendothels, kleinere Infiltrate und Blutungen ins Mesenchym aus kleinen Arterien ergänzen das Bild.

**V. Aufbringen von Substanzen mit reiner Fremdkörperwirkung  
auf die abgelöste Chorio-Allantois**

*1. Tuscheaufschwemmung*

Gewöhnliche Ausziehtusche wurde durch Membranfilter mittlerer Porenweite, Nr. 10, filtriert und 1:10 verdünnt auf die abgelöste Ch.A. 7- und 10tägiger Brut-eier gebracht. Die Tropfengröße war 0,05 cm<sup>3</sup>. Die Präparation der Ch.A. wurde bei den 10tägigen Eiern nach 12, 24, 36, 48 und 72 Std, bei den 7 Tage alten Brut-eiern nach 12, 36 und 60 Std vorgenommen.

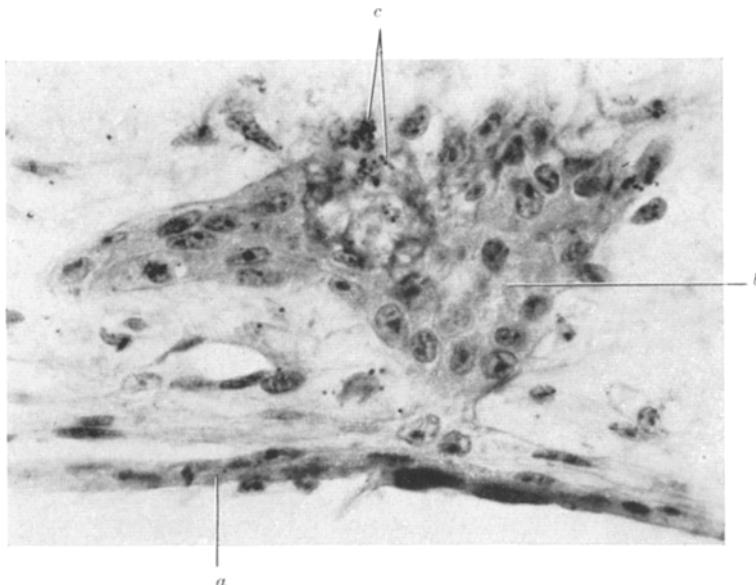


Abb. 10. Chorio-Allantois 10. Bruttag. 48 Std nach Tuscheaufschwemmung. Susa, Paraffin, Azan. Vergrößerung etwa 790×. Starke Sprossung von Capillarschichtendotheliem ins Mesenchym. Phagocytose von Tusche-körnchen. *a* Capillarschichtendothel. *b* Massive Endothelsprossung. *c* phagocytierte Tuscheteilchen

**Befunde.** Die Reaktion der 10tägigen Ch.A. ist auch bei sehr geringer Korngröße der Tuscheteilchen und relativ geringer Gesamtmenge unerwartet stark. Es kommt sehr bald zu einer Phagocytose von Tuscheteilchen durch das Endothel der Capillarschicht. Das letztere wird zu starken Sprossungen in das Mesenchym hinein veranlaßt (Abb. 10). Dabei werden Tusche-körner mitgeschleppt. Nach Zerfall tuschebeladener Endotheliem gelangen die Körnchen in den freien Blutstrom und werden als solche oder wieder phagocytiert durch Blutelemente weitertransportiert. Eine andere Möglichkeit ist die Umwandlung tuschebeladener Endotheliem oder Bindegewebszellen in mobile Phagocyten, die dann die Beseitigung des Fremdmaterials übernehmen. Sehr schnell wird auf diese Weise die Chorio-Allantois häufig in ihrer ganzen Breite durchsetzt. Imponierend ist die massive Entwicklung neuen Bindegewebes, an dessen

Grenze Capillarsprossen mit größeren soliden Endothelzapfen auftreten, während das anliegende, an der Herdbildung nicht beteiligte Mesenchym

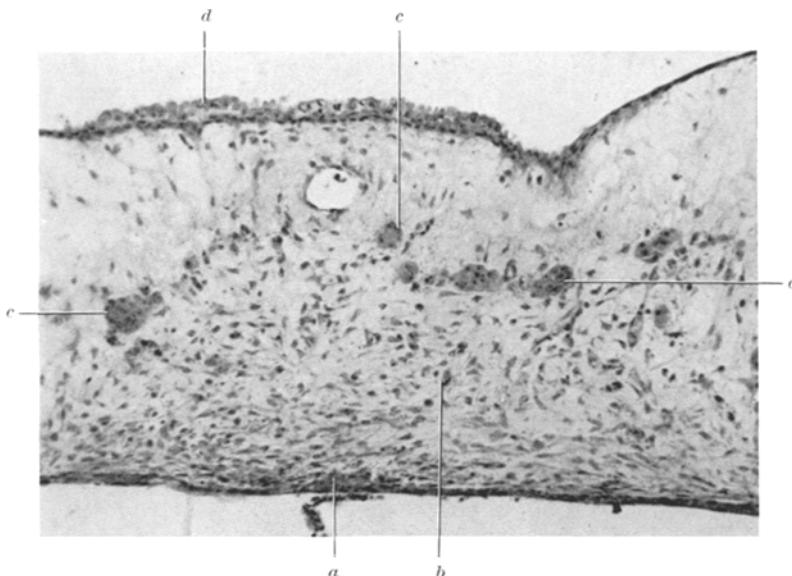


Abb. 11. Chorio-Allantois 10. Bruttag. 48 Std nach Tuscheaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 180  $\times$ . Wucherung des Capillarschichtendothels (a). Entwicklung eines zellreichen, jungen Bindegewebes (b), das von tuschebeladenen Phagocyten durchsetzt ist. Aufschließen von neugebildeten Capillaren und soliden Endothelsprossen (c) an der Grenze des Fibroblastenbereiches. Faservermehrung des angrenzenden Mesenchyms. Entodermwucherung (d)

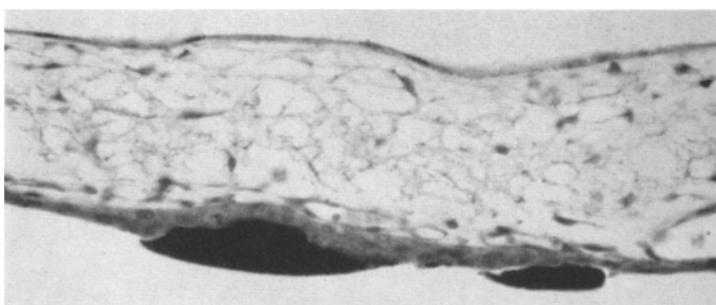


Abb. 12. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 36 Std nach Tuscheaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 315  $\times$ . Hypertrophie und Wucherung des Ektoderms bei massiver Auflagerung von Tusche. Capillarschicht unbeteiligt

eine beträchtliche Vermehrung des azanblauen Fasergerüstes aufweist (Abb. 11). Eine entzündliche Komponente fehlt vollständig, Leukozyten sind nicht anzutreffen.

Ganz anders ist bei gleicher Versuchstechnik die Reaktion der jungen Eihäute. Über größeren Tuscheballen findet sich lediglich eine mäßige Verstärkung der Ektodermzellen, die sich wiederum deutlich von der verlagerten Capillarschicht abgrenzen lassen (Abb. 12). Bei feinerer Aufteilung des Tuschematerials ist häufig eine starke Proliferation des Ektoderms die Folge (Abb. 13). Dabei ist in den meisten Fällen trotz großer Ausdehnung des Prozesses weder die Capillarschicht noch das Mesenchym oder das Entoderm an den Veränderungen beteiligt. Die

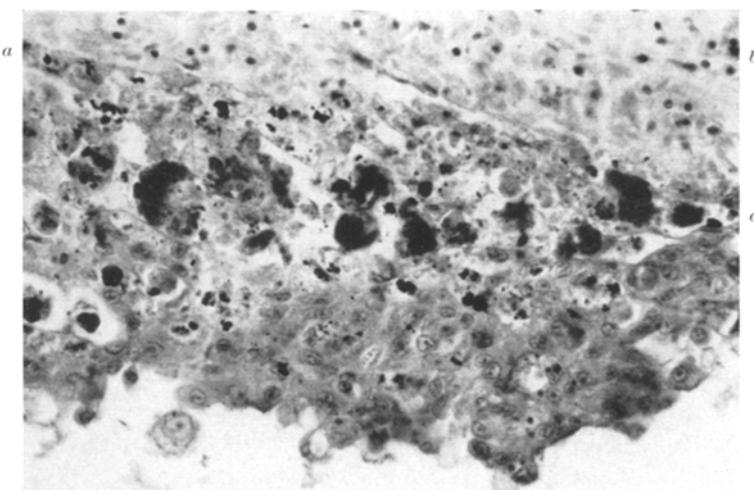


Abb. 13. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 60 Std nach Tuscheaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 335×. Stark gewuchertes Ektoderm mit größeren oder kleineren Tuscheballen beladen. Einzelne vacuolierte Zellen lösen sich aus dem Verband. *a*—*a* Capillarschichtgrenze. *b* Blutung ins Mesenchym

Ektodermzellen gehen teilweise durch Vacuolisierung des Cytoplasmas und Chromatolyse zugrunde und werden an der Oberfläche abgestoßen. Blutungen ins Mesenchym sind gelegentlich vorhanden. Eine BindegewebSENTWICKLUNG wie bei den älteren Eiern sieht man im allgemeinen nicht.

## 2. Schmirgelteilchen

In zwei Versuchsreihen wurden Schmirgelkörnchen der Papiersorten 1 und 2 abgelöst, sterilisiert, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und je  $0,1 \text{ cm}^3$  auf die abgelöste Ch.A. 12 Tage alter Bruteier gebracht. Die Weiterbebrütung geschah 48 Std bei  $35^\circ \text{C}$ .

*Befunde.* Die BindegewebSENTWICKLUNG ist bei Aufbringen von Schmirgelteilchen auf die Ch.A. noch erheblich stärker als bei Tusche. Die Faserbildung im Herdbereich ist sehr stark. Blutungen sind häufig. Die Schmirgelteilchen erweisen sich im polarisierten Licht als doppelbrechend.

## VI. Beispiele chemischer Agentien

### 1. Bleiacetat

Bleiacetat gehört zu den Substanzen, welchen man die Anregung zur Bildung intranukleärer Einschlüsse zuspricht. Um einen Einblick in den Wirkungsmechanismus zu bekommen, brachten wir je  $0,05 \text{ cm}^3$  einer 0,1-, 0,5-, 1-, 2-, 5- und 10%igen Lösung auf die Ch.A. 10 Tage vorbebrüteter Eier. Die Entnahme erfolgte nach 48 Std.

*Befunde.* Das Wesen der Bleiacetatwirkung scheint uns in einer sehr starken Anregung von Wachstum und Differenzierung zu liegen. Unter

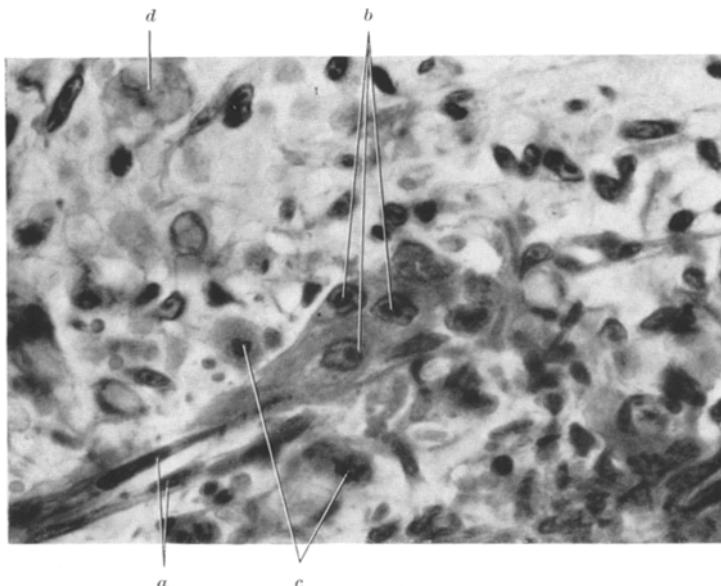


Abb. 14. Chorio-Allantois 10. Bruttag. 48 Std nach Bleiacetat 0,1 %. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa  $790 \times$ . *a* langgestreckte Fibrocyten. *b* Intranukleäre Einschlüsse. *c* Mitosen. *d* Mit Erythrocyten beladene Bindegewebszelle

diese Begriffe lassen sich alle Befunde einordnen. Im Übersichtsbild findet man in der Zone der Capillarschicht eine mächtige Bindegewebsentwicklung. Wir haben unter keinen anderen Umständen eine derartig starke Umwandlung der gewöhnlich sternförmigen Mesenchymzellen in langgestreckte Fibroblasten und Fibrocyten gefunden (vgl. Abb. 14a, links unten). Damit ist auch die Faserbildung wesentlich verstärkt. Die Zahl der Mitosen ist außerordentlich erhöht. Es treten auch atypische Mitosen auf, zum Teil mit Verklumpung der Chromosomen und Bildung ein- oder mehrkerniger Riesenzellen. Ist die Konzentration des Bleiacetats zu hoch, dann kommt es zu ausgedehnten Nekrosen, in welche leukocytäre Elemente und Makrophagen einwandern. Die Abgrenzung dieser Zone stärkster Einwirkung gegen das übrige, weniger

stark, wenn auch gleichsinnig veränderte Mesenchym geschieht durch breite Bänder hypertrophischer Mesenchymelemente, die zum Teil die Zusammensetzung aus Einzelzellen erkennen lassen, großenteils aber auch syncytial anmuten (Abb. 14 b, Mitte). Blutungen ins Mesenchym mit anschließenden Erythrophagien treten auf Grund der gestörten Gefäßverhältnisse, insbesondere im Bereich der Capillarschicht, leicht ein. Das Entoderm zeigt ebenfalls zahlreiche Mitosen und wird vielschichtig. Gelegentlich sind Kerneinschlüsse vorhanden.

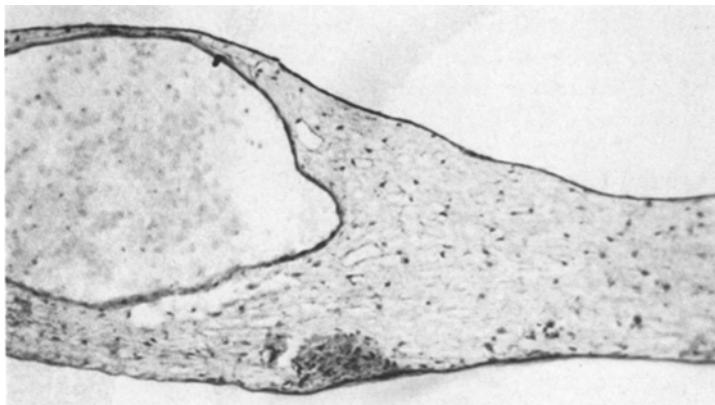


Abb. 15. Chorio-Allantois 12. Bruttag. 48 Std nach Formol 0,25 % ig. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 135 ×. Kleines, der Capillarschicht aufsitzendes Granulom aus Mesenchymzellen, Leukocyten und mehrkernigen Elementen. Ödem, Erythrophagien und spärliche eosinophile Leukocyten im Mesenchym

## 2. Formol

Bei Desinfektionsversuchen an Viren mit biologischem Nachweis auf der Ch.A. kann die Unterscheidung zwischen Herdbildungen durch schlecht adaptierte oder geschädigte Erreger und nicht genügend ausgewaschene oder neutralisierte Formalinreste schwierig werden. Es wurde daher eine nähere Charakterisierung der Formalinwirkung angestrebt. Bei 10 Tage alten Bruteiern brachten wir je  $0,05 \text{ cm}^3$  einer 0,25%igen Formol-Kochsalzlösung auf die abgelöste Ch.A. Die Präparation nahmen wir nach 48 Std vor.

*Befunde.* Nach Einwirkung von Formalin zeigt die Ch.A. makroskopisch eine sehr große Zahl feinster, meist etwas verwaschener Trübungen. Die Größe dieser Herdchen erreicht noch nicht Stecknadelkopfumfang. Histologisch sieht man häufig Endothelsprossungen der schalenfernen Capillarschichtseite. Aus diesen entwickeln sich zusammen mit mesenchymalen Fibroblasten und mitunter mehrkernigen Riesenzellen sowie auswandernden Leukocyten kleine Granulome, das Substrat der makroskopischen Herdchen. Sehr regelmäßig findet man außerdem eine gleichmäßige, teils spärliche, teils stärkere Durchsetzung des Mesenchyms mit eosinophilen Leukocyten (vgl. Abb. 15).

### 3. Phenol

Die Versuchsanordnung und Entnahmemezeit der Ch.A. entspricht V, 2. Verwendet wurden 1- und 2%ige Phenol-Kochsalzlösungen.

*Befunde.* Die Erscheinungen sind bei 1%igem Phenol recht gering. Eosinophile Leukocyten treten nur vereinzelt auf. Das Fasergerüst des Mesenchyms ist namentlich um Gefäße herum vergröbert. Leichte Verquellungen des Capillarschichtendothels kommen vor.

Bei 2%igem Phenol beobachtet man stärkere Veränderungen. Diese bestehen in Blutungen geringeren Ausmaßes, flächigen Wucherungen der Capillarschichtendothelien und vereinzelten Herden, die sich durch Endothelwucherungen, Faservermehrung, Fibroblastenbildung und Einwanderung leukocytärer Elemente auszeichnen. Mitunter sind kleinere Nekrosen vorhanden. Die Herde durchsetzen die ganze Breite der Ch.A.

## VII. Wirkung biologischer Substrate auf die abgelöste Chorio-Allantois

### 1. Aufschwemmung normaler Chorio-Allantois

Ch.A.-Membranen 12 Tage vorbebrüteter Eier wurden zermörserzt, mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünnt. Von der Suspension wurde je  $0,1 \text{ cm}^3$  auf die Ch.A. 12tägiger Eier gebracht. Die Entnahme erfolgte nach 48stündiger Bebrütung bei  $35^\circ \text{ C}$ . Entsprechend vorbereitete 7-Tage-Eier wurden nach 24, 48 und 72 Std präpariert.

*Befunde.* Die Zahl der Eihäute mit Veränderungen nach Aufbringen von normaler Ch.A. in Kochsalzsuspension ist recht groß. Sie betrug in unserer Versuchsserie über 50%, wobei das Ausmaß der Reaktionen natürlich sehr wechselte. 12tägige Bruteier zeigten durchweg die stärkeren Erscheinungen. Diese bestanden in Wucherungen der Capillarschichtendothelien, kleineren Blutungen und leukocytären Infiltraten, in einzelnen Fällen auch sehr starken Reaktionen nach Art der Abb. 16. Es handelt sich hier um ein relativ dichtes, junges Bindegewebe an der Herdbasis mit entodermwärts aufschiebenden Capillaren. Die Dichte des Fibroblastengeflechtes nimmt zum Entoderm hin ab, so daß sich am Rande eine hellere Zone ergibt. Es folgt eine Grenzschicht zum unveränderten Mesenchym, die durch zahlreiche Capillaranschnitte und eine im Azanschnitt stark hervorgehobene Vermehrung des Fasergerüstes ausgezeichnet ist. Im Bereich des Herdes finden sich sehr zahlreiche, vorwiegend acidophile, seltener basophile, meist verwaschene Gebilde, die teils frei liegen, größtenteils aber von Bindegewebselementen phagocytiert sind. Es kann sich dabei nur um das aufgebrachte Material der Chorio-Allantois-Kochsalzaufschwemmung handeln.

Das Bild der 7tägigen Eier weicht von dem vorher skizzierten ganz erheblich ab. Stärkere Reaktionen fehlen. In den meisten Fällen findet sich lediglich eine mehr oder weniger starke Wucherung des deutlich von der evtl. verschobenen Capillarschicht getrennt sichtbaren Ektoderms

(Abb. 17). In einem Falle lag halb eingebettet in eine verstärkte Ektodermschicht eine sequesterartig von einem Spaltraum umgebene Zellgruppe, die vielleicht dem aufgebrachten Material zuzuschreiben ist.

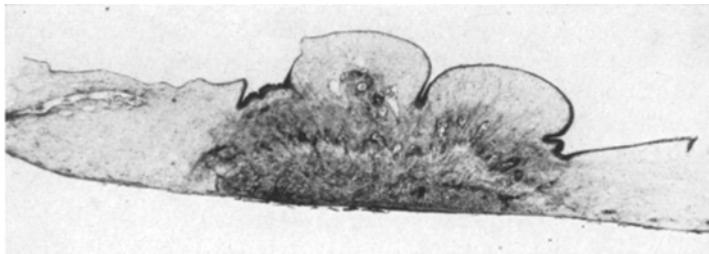


Abb. 16. Chorio-Allantois 12. Bruttag. 48 Std nach Chorio-Allantois-Suspension. Susa-Paraffin, Azan. Vergrößerung etwa 30×. Geringe Proliferation des Capillarschichtendothels. Stärkste Entwicklung von gefäßreichem jungem Bindegewebe, das zahlreiche mit Fremdmaterial beladene Phagocyten enthält. Abgrenzung des Herdgebietes durch einen Wall aus vermehrten Mesenchymzellen in einem sehr dichten Fasergerüst. Auch hier viele Capillaranschnitte

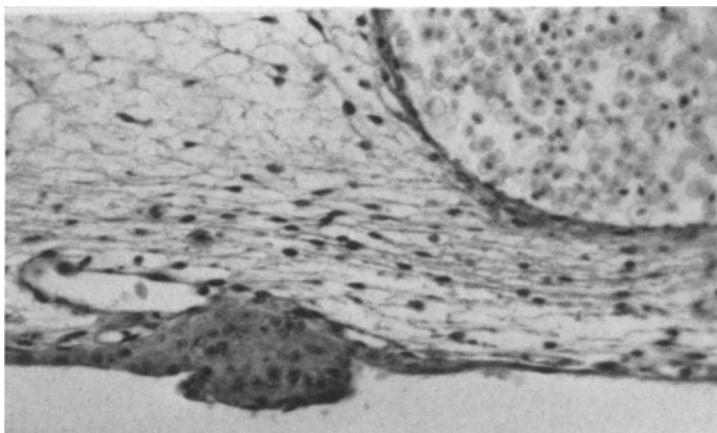


Abb. 17. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 24 Std nach Chorio-Allantois-Suspension. Susa-Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 315×. Reine Ektodermwucherung bei unveränderter Capillarschicht

## 2. Menschliches Serum

Unverdünntes menschliches Serum wurde in einer Menge von 0,1 cm<sup>3</sup> auf die abgelöste Ch.A. 12 Tage alter Bruteier gebracht. Die Präparation der Eihäute erfolgte nach 48stündiger Bebrütung bei 35°C. Gleich behandelte 7tägige Eier wurden nach 24 und 48 Std verarbeitet.

*Befunde.* Im ganzen konnten bei 12tägigen Eihäuten ähnliche Veränderungen beobachtet werden wie unter VII, 1 beschrieben wurde. Endothelsprossungen der Capillarschicht, kleine Blutungen und Infiltrate waren ebenso zu finden wie bindegewebige Reaktionen im Mesenchym.

Die Schwere der Erscheinungen trat hinter denen bei Ch.A.-Aufschwemmung eher etwas zurück. Dafür war eine stärkere Ödemneigung vorhanden, die vielleicht auf die größere Fremdheit des menschlichen Serums zurückzuführen ist.

Der Unterschied zu den 7 Tage vorbebrüteten Eiern war nicht so klar wie unter VII, 1. Ektodermquellungen und -wucherungen waren zwar vorhanden, aber meist mit anderen Erscheinungen kombiniert, wie z. B. ektodermnahem Ödem, Blutungen, eher spärlicher diffuser Leukocyteinwanderung ins Mesenchym. Auf Abbildungen wurde verzichtet.

### 3. Menschliche Erythrocyten

Gewaschene menschliche Erythrocyten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 1:2 verdünnt und in einer Menge von je  $0,1 \text{ cm}^3$  auf die abgelöste Ch.A.

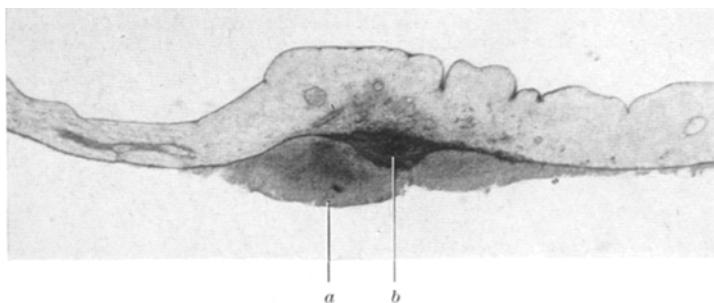


Abb. 18. Chorio-Allantois 12. Bruttag. 48 Std nach Erythrocytenaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 30×. Übersichtsbild. a Aufgelagerte menschliche Erythrocyten. b Endothelwucherung. Im angrenzenden Mesenchymbezirk mäßige Ödembildung, Entwicklung von Fibroblasten, Phagocytose von Erythrocyten durch Bindegewebelemente

12 Tage vorbebrüteter Eier gebracht. Die Präparation erfolgte nach 48 Std. Zum Vergleich herangezogene 7 Tage alte Bruteier erhielten eine Erythrocytenaufschwemmung 1:10 und wurden nach 24 und 48 Std verarbeitet.

**Befunde.** Die Reaktionen bei den 12 Tage alten Bruteiern sind zahlreich und stark. Die menschlichen Erythrocyten sind neben den kernhaltigen der Ch.A. meist recht gut zu erkennen, namentlich in den oft massiven Auflagerungen an der Oberfläche. Endothelwucherungen der Capillarschicht sind fast stets vorhanden, in vielen Fällen sehr imponierend (vgl. Abb. 18, dunkler linsenförmiger Kern im Übersichtsbild). Ein junges lockeres Bindegewebe mit neu aufschießenden Capillaren ist um die Abgrenzung des Prozesses bemüht. Die sehr zahlreichen Bindegewebsmakrophagen sind überladen mit Anteilen roter Blutkörperchen. Leukocyten fehlen oder sind spärlich. In Abb. 18 stellt die dunkelgraue Masse an der Basis der Ch.A. die aufgelagerten Blutmassen dar. Jenseits

der Endothelwucherung erkennt man die bindegewebige Reaktion im Mesenchym.

Die Veränderungen bei 7tägigen Eiern entsprechen wieder weitgehend denen der Gruppe VII, 1. Es handelt sich vorwiegend um



Abb. 19. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 24 Std nach Erythrocytenaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 315×. Proliferation des Ektoderms mit Verdrängung der unbeteiligten Capillarschicht

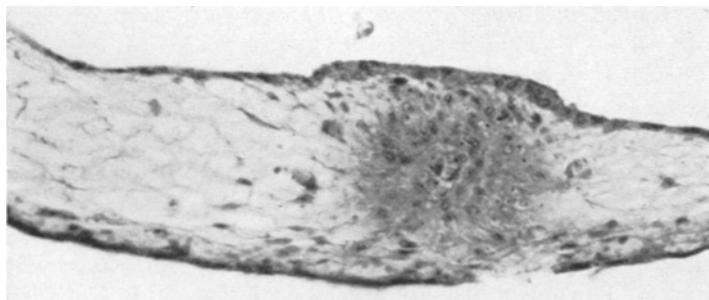


Abb. 20. Chorio-Allantois 7. Bruttag. 48 Std nach Erythrocytenaufschwemmung. Susa, Paraffin, H.E. Vergrößerung etwa 315×. Perivasale Nekrose. Herdförmige Verquellung des Entoderms. Diffuse Quellung des Ektoderms

Quellungen, Hypertrophie und Wucherungen des Ektoderms, wobei letzteres sich häufig buckelförmig vorwölbt und die Capillarschicht entodermwärts verdrängt (vgl. Abb. 19). In einem Falle (Abb. 20) lag eine verwaschene Zeichnung des an einer Stelle unterbrochenen Ektoderms und der Capillarschicht vor. Das Mesenchym wurde in ganzer Breite von einer kreisflächigen, anscheinend um ein kleines Gefäß angeordneten Nekrose eingenommen, während das Entoderm über dem Nekroseherd eine gewisse Hypertrophie zeigte.

### VIII. Herabsetzung der Sauerstoffzufuhr durch Abdecken der oberen Eihälfte mit Vaseline

Bruteier des 10. und 7. Tages wurden zur Hälfte mit Vaseline abgedeckt und 24 bzw. 48 Std weiterbebrütet. Die Versuche wurden unternommen, um Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, ob der Ausfall eines gewissen Schalenanteils für die Sauerstoffversorgung, wie er auch durch eine größere Fensterung mit Deckglasersatz gegeben ist, zu Veränderungen führen kann, die erst von einer gewissen Intensität ab klarer zu erkennen sind.

**Befunde.** 10 Tage alte Bruteier zeigen vielfach eine Hyperämie der Capillarschicht. Gelegentlich treten kleinere Blutungen unter die weiße Eihaut auf. Das mesenchymale Fasergerüst erscheint in einigen Fällen zerrissen; die Bindegewebszellen sind dann klein, die Kerne etwas pyknotisch. Bei den jüngeren Eiern fiel gelegentlich ein blasiges Ödem unmittelbar unter dem Entoderm auf. Das übrige Mesenchym erschien zusammengedrängt, das Ektoderm und die Capillarschichtendothelien etwas gequollen.

#### Besprechung der Ergebnisse

Will man zu einer einigermaßen sicheren Entscheidung der Frage kommen, wie weit unspezifische Reaktionen mit virusbedingten Veränderungen interferieren können, dann muß man wohl zuerst feststellen, welche im Rahmen des jeweiligen Verfahrens üblichen Maßnahmen nach Zahl und Intensität ausreichende Veränderungen setzen können. Die zweite Frage wäre, ob die nicht virusbedingten Erscheinungen genügend typisierbar sind, um von den spezifischen Schäden abgrenzbar zu werden. Schließlich ist zu untersuchen, ob die Art der Reaktion in ihrer Modifikation durch die zusätzlichen Bedingungen wie Alter der Embryonen und Bebrütung Anhaltspunkte für besonders günstige Vermehrungsumstände verschiedener Viren und damit wieder für die Klärung der Spezifität geben kann.

Prüfen wir die Liste unserer Experimente hinsichtlich Punkt 1, so ist zu sagen, daß die Vorbereitungsmaßnahmen nach I, 1—3, IV, 1—2 und VIII als erste Berücksichtigung finden müssen. Das *Jodieren* der Schale wird am ehesten bei älteren Bruteiern zu Reaktionen führen müssen, da bei ihnen die im Laufe der Bebrütungszeit fortschreitende Verdünnung der Schale mit der gleichzeitigen Vermehrung der Poren und die hohe Reaktionsbereitschaft jenseits des 10. Tages wirksam werden. Die Erscheinungen müßten am ehesten in einer Hypertrophie und Vermehrung der Capillarschichtendothelien bestehen, die um so stärker sein könnten, je längere Zeit bis zur Ablösung der Ch.A. verstreicht, d. h. je länger die direkte Jodeinwirkung dauern kann. Es ist also auf feine flächige Trübungen zu achten. Die *Sägespuren* werden am wenigsten diagnostische Schwierigkeiten verursachen. Die frischen Blutungen oder die späteren weißen Infiltrate sind schon makroskopisch

bei der aus dem Ei entfernten Ch.A. auf Grund ihrer Anordnung leicht als solche zu erkennen. Die *Fensterung* der Schale und die Ablösung der Ch.A. nach II, 3 unter Verwendung isotoner Lösungen im richtigen  $p_H$ -Bereich wird gewöhnlich keinen Anlaß zu Veränderungen geben. Zu beachten ist lediglich, daß nach VIII die Größe des Fensters nicht zu beträchtlich werden darf, wenn nicht bei jüngeren Eihäuten Sauerstoffmangelerscheinungen auftreten sollen.

Die *Temperatur* des Vorbrüters sollte regelmäßig kontrolliert werden, damit nicht Schäden im Sinne von IV, 2 eintreten. Durch längeres Verweilen der Eier bei überhöhter Temperatur bedingte Ödeme könnten etwa eine toxische Wirkung des Impfmaterials vortäuschen.

Alle anderen unspezifischen Reaktionsmöglichkeiten liegen in der Natur des Impfmaterials begründet. Will man etwa für ein spezielles Virus ein  $p_H$ -Optimum einstellen, das von dem üblichen Bereich 7,0—7,4 abweicht, so hat man sich daran zu erinnern, daß unspezifische, u. U. ringförmige Blutungen mit allen Folgeerscheinungen auftreten können. Entsprechendes gilt für Abweichungen von der *Isotonie*, die Ödemwirkungen verstärken oder Hämolyse bedingen mögen. Der Zusatz *chemisch wirksamer Mittel* ist evtl. in Kontrollversuchen auf unspezifische Reaktionen zu testen. Das gilt z. B. für Prüfungen von Desinfektionsmitteln an Viren. Bringt man *corpusculäre Elemente*, z. B. Zellmaterial oder *Eiweißstoffe* auf die Ch.A., so hat man mit Bindegewebsreaktionen zu rechnen, zu denen grundsätzlich auch Proliferationen am Endothel des gesamten Capillarsystems gehören. Dabei scheint nach den Befunden von V (Fremdkörper) und VII (biologisches Material) weniger die Verwandtschaft oder Fremdheit des aufgebrachten Eiweiß zum Ei als vielmehr die Menge des angebotenen Stoffes eine Rolle zu spielen, der beseitigt werden muß. Stärkere toxische Wirkungen sind hiervon selbstverständlich unberührt. Es wird jedenfalls die Beschränkung der Ballaststoffe in einem Impfmittel wesentlich dazu beitragen können, unspezifische Reaktionen zu verringern.

Von der Menge des Impfmaterials und der Größe der künstlichen Luftkammer, d. h. dem Umfang der Ablösung der Ch.A. von der weißen Schalenhaut, ist die Reaktionsweise der Eihaut bekanntlich auch in gewissem Grade abhängig. Ein nicht unbeträchtlicher Teil des Inoculums wird nämlich infolge Capillarwirkung an den äußersten Ring der künstlichen Luftkammer gezogen und führt hier u. U. eher und stärker zu Herden als im an sich besser zugänglichen Mittelteil. Mit dieser Beobachtung ist vielleicht die Einteilung der Reaktionstypen von GOLDSWORTHY und MOPPETT (1935) in einen peripheren und einen zentralen hypertrophen Typ zu erklären.

Damit ist die Frage der Typisierbarkeit unspezifischer Reaktionen der Ch.A. bereits angeschnitten. Die Auffassung von GOLDSWORTHY

und MOPPETT (1935) ist hinsichtlich der Bezeichnung „hypertrophisch“ oder „atrophisch“ wohl eher eine Angelegenheit der Dosierung und in bezug auf die Einteilung „peripher“ und „zentral“ wohl eher eine mechanische Bedingung als eine qualitative Entscheidung über den Wirkungsmechanismus, abgesehen davon, daß die „Atrophie“ unserer Erfahrung nach in den meisten Fällen ein technischer Versager ist. Die in der Einleitung abgekürzt wiedergegebene Einteilung von D'AUNOY und EVANS (1937) gibt die theoretischen Möglichkeiten wieder, ohne der Praxis ganz gerecht zu werden. Wir möchten nun eine etwas abgeänderte Typenbildung vorschlagen, die es gestattet, unsere Befunde ohne Zwang einzuordnen und evtl. bei der Auffindung unspezifischer Reaktionskomponenten helfen kann:

1. Mehr oder weniger reine *Ödeme*.

Sie können durch Abweichungen von der Isotonie, erhöhte Temperaturen, Sauerstoffmangel, chemische Agentien herbeigeführt und durch  $p_H$ -Verschiebungen verstärkt werden.

2. Reine *Proliferationsvorgänge*.

Sie betreffen in typischer Weise den Gefäß-Bindegewebsapparat, können aber auch das Ekto- und Entoderm einbeziehen. Das ist zum Teil eine Frage der Dosierung, zum anderen abhängig vom Bebrütungsstadium. Man findet derartige Vorgänge einerseits bei Fremdkörperaufschwemmungen wie Tusche, andererseits auch bei corpuskulären Elementen biologischer Natur wie Erythrocyten, Gewebezellen, schließlich bei Eiweißlösungen. Wie erheblich die ausgelösten Prozesse sein können, zeigen die Tuscheversuche. Sie sind ein Beispiel für die rasche Verbreitung eines biologisch inaktiven, bewegungsunfähigen Materials und bilden vielleicht ein Modell für einen Teilmechanismus bei Virusinfektionen, nämlich die aktive Mitwirkung des Wirtsgewebes bei der Ausbreitung des Prozesses. Dabei ist im Falle des Hühnchens das Endothel von ausschlaggebender Bedeutung. Eine Beteiligung des Entoderms an den Proliferationsvorgängen ist möglich, aber für die Beurteilung nicht ausschlaggebend. Sie hat eine Bedeutung für die Impfung in die Allantoishöhle oder bei Reaktionen nach Typ 3, wenn größere Defekte abgedeckt werden sollen.

3. Verletzungen und ihre Folgen.

Wir möchten hierunter einmal mechanische Einwirkungen verstanden wissen. Die beschriebenen Blutungen nach Ansägen der Schale gehören in diese Gruppe, aber auch das regelmäßige Aufreißen der Capillarschicht bei der Ablösung der Ch.A. älterer Eier. Zum anderen gehen gleichartige Prozesse vor sich, wenn die akute Zerstörung der Ch.A.-Deckschichten durch Abweichungen des Impfmaterials in bezug auf den  $p_H$ -Wert oder chemische Mittel und Toxine veranlaßt wird. Die erste

Folge ist regelmäßig eine Blutung mit anschließender Entwicklung ortsständiger oder mobiler Phagocyten. Die weiteren Veränderungen sind Abgrenzungen der Herde durch neugebildetes Bindegewebe und sekundär-entzündliche Erscheinungen. Eine gesonderte Besprechung ist in diesem Zusammenhang für den Begriff des traumatischen Ulcus nach BEVERIDGE und BURNET angezeigt. Er ist unseres Erachtens höchstens dann berechtigt, wenn ein reaktionsfähiges Ektoderm tatsächlich vorhanden ist, d. h. nach den Ergebnissen unserer ersten Mitteilung nur in den frühen Bebrütungstagen. Führt aber die Ablösung der Ch.A. etwa ab 10.—11. Bruttag regelmäßig zu einem Aufreißen der Capillarschicht, wie schon makroskopisch an den zahlreichen Blutpunkten der frisch entfernten Ch.A. zu sehen ist, dann liegt primär ein eröffnetes Gefäßsystem mit stark reaktionsfähigem Endothel vor, das selbst bei völlig erhaltener schalenferner Endothellage einen Defekt darstellt. Für diesen Fall aber wurde der Begriff des traumatischen Ulcus nicht geschaffen. Es wäre daher vielleicht besser, ganz auf ihn zu verzichten. Für das Verständnis des beimpften Substrates und seiner Reaktionsmöglichkeiten aber ist unserer Meinung nach die Freilegung des hochempfindlichen Endothels beim üblichen Verfahren und Termin entscheidend.

#### 4. Primär entzündliche Reaktionen.

Diese würden Ödeme, leukocytäre Infiltrationen und Granulombildungen umfassen. Sie finden unter den geprüften Einwirkungen kaum ein Beispiel, wenn man nicht so weit gehen will, die Durchsetzung der Ch.A. mit eosinophilen Leukozyten bei Traubenzucker und Formalin unter diese Gruppe zu bringen. Typ 4 wäre damit vorwiegend den bakteriellen Infektionen zuzuordnen, von denen in unserer Arbeit nicht die Rede ist.

In dem vorgeschlagenen System finden die Virusinfektionen keinen festen Platz. Sie würden am besten eine Kombination der Reaktionsarten 2 und 3 darstellen, d. h. bei ihrer Genese sind hypertrophische, degenerative und sekundär-entzündliche Prozesse miteinander gekoppelt. Damit wäre aber von vornherein eine gewisse Unterscheidungsmöglichkeit gegeben.

Schließlich ist auf die zusätzlichen Bedingungen kurz einzugehen, welche den Ablauf der Reaktionen beeinflussen können. Die allergrößte Bedeutung hat das *Alter der verwendeten Bruteier*. Es scheint uns aus den beigebrachten Befunden hervorzugehen, daß bei allen in der Dosierung richtig gewählten Einwirkungen, d. h. bei solchen, die nicht auf Grund ihrer Schwere alle Schranken durchbrechen, die jüngeren Embryonen grundsätzlich anders reagieren als die älteren Bebrütungsstadien. Die Ursache ist darin zu sehen, daß bei den jungen Eihäuten das reaktionsträchtige Ektoderm noch vorhanden ist und durch seine Proliferation

Schäden weitgehend abzufangen und eine Allgemeinreaktion zu verhindern vermag. Die angeführte Beobachtung von BURNET (1938) über die träge Reaktion jüngerer Embryonen mit etwas größeren, aber an Zahl wesentlich geringeren Herden findet in dieser ektodermalen Proliferation ihre Erklärung. Damit ist aber wohl auch gleichzeitig gegeben, daß bei den jüngeren Eiern Ulcera, Ektodermdefekte also, nur in weit geringerer Zahl auftreten können als bei Stadien jenseits des 10. Bruttages. Die Ektodermreaktion hat noch in anderer Hinsicht eine Bedeutung. Es wäre doch zu erwägen, ob man nicht abweichend von der bisher üblichen Methodik epitheliotrope Viren wie Vaccine oder Herpes besser grundsätzlich auf frühe Stadien verimpfen sollte, um zu einer Form der Herdbildung zu kommen, die einwandfreiere Ergebnisse gestattet und weniger atypische Befunde nach sich zieht. Den älteren Bebrütungsstadien wären dann solche Viren vorbehalten, die in stärkerem Maße das Reticulo-Endothel bevorzugen. So kann u. U. der Reaktionstyp eine weitere Spezifizierung erfahren. Über die Wahl der *Temperatur bei Vor- und Nachbebrütung* ist bei BEVERIDGE und BURNET genügend nachzulesen. Darauf soll hier nicht näher eingegangen werden.

### Zusammenfassung

In 8 Gruppen mit 21 Reihen von Experimenten wurde versucht, im Rahmen des Verfahrens der Ch.A.-Beimpfung oder in der Natur des Impfmaterials liegende Möglichkeiten des Auftretens unspezifischer Veränderungen zu erfassen und ihrer Natur nach zu klären.

Die nach Intensität und Regelmäßigkeit wichtigen Reaktionen wurden auf drei Typen zurückgeführt, von denen primär entzündliche Vorgänge einerseits und virusbedingte Veränderungen als Kombination verschiedener Teilprozesse abzugrenzen wären.

Die damit gewonnenen Anhaltspunkte für die Erkennung unspezifischer Erscheinungen werden ergänzt durch den Einfluß des Alters der Eihäute auf den Ablauf der Reaktionen. Es wird vorgeschlagen, die Ektodermproliferationen der jungen Stadien mehr als bisher für die epitheliotropen Viren zu reservieren, während die älteren Membrane anderen Formen vorbehalten werden sollten, die das Reticulo-Endothel bevorzugen. Es ist zu hoffen, daß durch weitere spezielle Untersuchungen mit einzelnen Viren noch zusätzliche Differenzierungen gelingen werden.

### Literatur

BEVERIDGE, W. I. B., and F. M. BURNET: The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. Med. Res. Council Spec. Rep. Ser. 1946, 256. — BURNET, F. M.: In DOERR-HALLAUERS Handbuch der Virusforschung, S. 419—446. Wien: Springer 1938. — BURNET, F. M., and J. D. FERRY: Brit. J. Exper. Path.

15, 56—64 (1934). — BURNET, F. M., and I. A. GALLOWAY: Brit. J. Exper. Path. 15, 105—113 (1934). — COVELL, W. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 82, 51—53 (1934). — d'AUNOY, R., and F. L. EVANS: J. of Path. 44, 369—377 (1937). — GOLDSWORTHY, N. E., and W. MORPETT: J. of Path. 41, 529—551 (1935). — GOULSTON, D., and J. C. MOTTRAM: Brit. J. Exper. Path. 13, 175—182 (1932). — GREIFF, D., and H. PINKERTON: Anat. Rec. 105, 483—484 (1949). — KNOTHE, H.: Zbl. Bakter. I Orig. 158, 383—397 (1952). — LASFARGUES, E.: Ann. Inst. Pasteur 84, 703—710 (1953). — NAUCK, E. G., u. TH. NASEMANN: Z. Tropenmed. u. Parasitol. 3, 271—283 (1952). — SCHÜRMANN, R.: Virchows Arch. 321, 395—410 (1952).

Dr. HERBERT VOSS, Robert-Koch-Institut, Virusabteilung,  
Berlin, N 65, Führerstr. 2