

Abschrift.

ROBERT-KOCH-INSTITUT

Tagebruch Nr. 1735/42

Berlin N 65, den 19. Dezember 1942
Führerstr. 2

Anlage II.

G e h e i m !

Herrn

Standartenführer Dozent Dr. Krugowsky

B e r l i n W 15

Knesebeckstr. 43/44.

Sehr geehrter Herr Standartenführer!

Das Robert Koch-Institut stellt im Auftrage des Reichsministeriums des Innern und der Wehrmacht Gelbfieberimpfstoff nach dem in der Anlage beschriebenen Verfahren her. Es handelt sich, wie aus der Beschreibung ersichtlich ist, um einen Impfstoff, der zwar lebendes, aber nur für die Maus, nicht jedoch für den Menschen pathogenes Virus enthält. Diese Feststellung muss, da immerhin mit Veränderungen in der Pathogenität des zur Verfügung stehenden Gelbfieberstammes gerechnet werden muss, bei jeder Operationsnummer sowohl für die Maus wie für den Menschen gemacht werden.

Bisher wurden diese Probeimpfungen, die schon an hunderten von Personen ohne jeden Zwischenfall durchgeführt worden sind, in Wittenau vorgenommen. Aus Mangel an geeigneten Personen ist dies in Wittenau in Zukunft nicht mehr möglich. Ich würde es daher sehr begrüßen, wenn Sie mir die Durchführung des mir gegebenen Auftrages ermöglichen würden.

Es würde die Impfung von je 5 Personen ungefähr alle 14 Tage erforderlich sein. Um zu sehen, ob und in welchem Ausmaße die Arbeitsfähigkeit durch die Gelbfieberschutzimpfung beeinträchtigt wird, wäre ein einmaliger Versuch an 50 Personen erwünscht, da das Ergebnis dieses Versuches für die Truppe von größter Bedeutung ist. Zu jeder weiteren Auskunft bin ich selbstverständlich gern bereit.

Heil Hitler!

(gez.) Unterschrift

Vizepräsident,

mit der kommissarischen Leitung der Reichsanstalt
beauftragt.

Beilage I

Berlin N 65, den 19. Dezember 1942
Vorbereitung

Geheimes Nr. 1775/42
ROBERT-KOCH-INSTITUT
Berlin

Geheim

Herrn
Stabsarzt Dr. Krugmann
Berlin N 13
Krankenhaus

Sehr geehrter Herr Stabsarzt!

Das Robert Koch-Institut stellt im Auftrage des Reichsaufsichtsrats der Luftwaffe und der Reichswehr Goldschmelzwerke nach dem in der Anlage beschriebenen Verfahren her. Es handelt sich, wie aus der Beschreibung ersichtlich ist, um einen Goldschmelzwerk, der zwar lebendig, aber nur für die Luft, nicht jedoch für den Menschen pathogenes Virus enthält. Diese Verabreichung muss, da inwieweit die Verabreichung in der Pathogenität des zur Verfügung stehenden Goldschmelzwerkes gesichert werden muss, bei jeder Operationsumkleidung sowohl für die Luft als auch für den Menschen gesichert werden.

Hierzu wurden diese Goldschmelzwerke, die schon an anderen von Personen ohne jeden Schutzmaßnahmen durchgeföhrt worden sind, in Witterung vorgenommen. Aus Mangel an geeigneten Personen ist dies in Witterung in Zukunft nicht mehr möglich. Ich würde es daher sehr begrüßen, wenn Sie die Durchföhren des mit folgenden Auftrage ausföhren würden.

Es würde die Lieferung von je 2 Personen wöchentlich alle 14 Tage erforderlich sein. Um zu sehen, ob und in welchem Ausmaße die Arbeitsfähigkeit durch die Goldschmelzwerkung beeinträchtigt wird, wäre ein einmaliger Versuch an 50 Personen erwünscht, da das Ergebnis dieses Versuchs für die Gruppe von größter Bedeutung ist. Zu jeder weiteren Auskunft bin ich selbstverständlich gern bereit.

Hell Hitler!
(gez.) Weizsäcker
Vizepräsident
mit der kommissarischen Leitung der Reichsaufsicht
beauftragt.

111

Arbeitsanweisung zur Herstellung von Gelbfieberimpfstoff.
=====

Das von den Franzosen Feltier, Durieux, Jonchère und Arquie angegebene Verfahren zur Schutzimpfung gegen Gelbfieber kann als das zurzeit brauchbarste angesehen werden. Das Verfahren besteht in einer Kutanimpfung mit lebendem, aber für den Menschen völlig apathogenem Gelbfiebervirus, das auf der Maus in intracerebralen Passagen fortgezüchtet wird. Die Einfachheit der Impfung und die verhältnismässig leichte Herstellung grosser Impfstoffmengen ermöglichen eine Durchimpfung grosser Massen.

Bei den von Prof. Haagen im Robert Koch-Institut und später im Hygienischen Institut der Universität Strassburg durchgeführten Nachprüfung dieses Verfahrens kam nicht der französische Gelbfieberstamm, sondern der bekannte amerikanische Gelbfieberstamm "Asibi" zur Verwendung, der dem Institut von Prof. Schüffner, Amsterdam, zur Verfügung gestellt worden war. Auch dieser Stamm wird intracerebral auf Mäusen fortgezüchtet und ist ebenfalls für den Menschen völlig apathogen.

Mit dem aus dem Asibiastamm hergestellten Trockenimpfstoff sind in Deutschland bisher mehrere 100 Personen Schutzgeimpft worden. In keinem Fall sind im Anschluss an die Impfung Erkrankungen (Gelbfieber, Encephalitiden) oder schwerere Impfreaktionen beobachtet worden. Dagegen waren regelmässig spezifisch wirksame virulizide Antikörper im Serum der Schutzgeimpften durch den Mäuseschutzversuch nachweisbar.

I. Erhaltung und Kontrolle des Gelbfieberstammes.

Die Erhaltung und Kontrolle des Virusstammes erfolgt auf jungen, weissen Mäusen im Gewichte von 10 - 15 g.

An Instrumenten sind erforderlich:

1. Scheren, Pincetten, Spatel, Spritzen (s. Abbildung a).
 2. Porzellanmörser, Uhlenhuthsche Standgefässe, Pipetten.
- Ferner ist erforderlich 10 prcz. Menschenserum-Ringerlösung oder Tyrodelösung, die man sich zweckmässig zu je 5 ccm in Reagenzgläser abfüllt.

Als Ausgangsmaterial für die Fortführung des Stammes dient das Gehirn einer 3 - 4 Tage nach der intracerebralen Infektion typisch erkrankten Maus, die im kranken Zustand getötet werden muss. Mäuse, die an der Infektion gestorben sind, dürfen nicht verwendet werden.

Das Gehirn, dessen Durchschnittsgewicht 0,3 g zu betragen pflegt, wird im Mörser verrieben und mit 2,7 ccm der Serum-Ringerlösung zu einer möglichst homogenen Aufschwemmung verrührt. Von dieser im Standgefäss weiter mit Serum-Ringerlösung im Verhältnis

Robert Koch - Institut

Arbeitsanweisung zur Herstellung von Gelblieberstoff.

Das von den französischen Gelehrten Pasteur, Roux, Chamberland und Arloz angegebene Verfahren zur Schutzimpfung gegen Gelblieber kann als das kürzeste und einfachste angesehen werden. Das Verfahren besteht in einer Kultivierung des Virus in einem Nährboden, der für den Menschen völlig ungefährlich ist, das mit der Maus in intracerebralen Passagen fortgezüchtet wird. Die Klärbarkeit der Flüssigkeit und die Verhältnisse sind folgende: leichte Herstellung großer Mengen er-möglichen eine Impfung großer Massen.

Folgt dem von Prof. Hansen im Robert Koch-Institut und später im Hygienischen Institut der Universität Strassburg angegebenen Verfahren zur Herstellung dieses Virus, sondern der bekannte amerikanische Gelblieberstamm "Aldi" zur Verwendung, der dem Institut von Prof. Schillner, Amsterdam, zur Verfügung gestellt worden war. Auch dieser Stamm wird intracerebral auf Mäusen fortgezüchtet und ist ebenfalls für den Menschen völlig ungefährlich.

Mit dem aus dem Aaltestamm hergestellten Virusimpfstoff sind in Deutschland bisher mehrere 100 Personen geschützt worden. In keinem Fall sind in Ansehung an die Impfung Erkrankte (Gelblieber, Trenchantien) oder schwere Impfstoff-tionen beobachtet worden. Dagegen waren regelmäßig spezifisch wirksame virulente Antikörper im Serum der Schutzgeimpften durch den Mäuseversuch nachweisbar.

1. Erhaltung und Kontrolle des Virusstammes.

Die Erhaltung und Kontrolle des Virusstammes erfolgt auf folgende Weise: Mäusen im Gewicht von 10 - 15 g. An Instrumenten sind erforderlich:
1. Scheren, Pinzetten, Pipetten, Spateln (s. Abbildung a).
2. Porzellanküvetten, Uhrenstunde Standgläser, Pipetten.
Weiter ist erforderlich in jeder Versuchsanstalt eine Tyrodelösung, die man sich zweckmäßig zu je 5 cm in Reagenzglas abfüllt.
Als Ausgangsmaterial für die Fortführung des Stammes dient das Gehirn einer 3 - 4 Tage nach der intracerebralen Infektion typisch erkrankten Maus, die im kranken Zustand getötet werden muss. Mäuse, die an der Infektion gestorben sind, dürfen nicht verwendet werden.

Das Gehirn, dessen Durchschnittsgewicht 0,5 g zu betragen pflegt, wird im Würfel zerlegt und mit 5% von der Serum-Ringerlösung zu einer möglichst homogenen Aufschwemmung verrührt. Von dieser im Standglase weiter mit Serum-Ringerlösung im Verhältnis

1/2
1/4

1:100 zu verdünnenden Virus-(Hirn-)Aufschwemmung erhalten mindestens 6 Mäuse je 0,02 bis 0,03 ccm in der üblichen Weise intracerebral.

Am 3. oder 4. Tage nach der Infektion erkranken die Mäuse unter dem Bilde einer Encephalitis mit schlaffer Lähmung der hinteren Extremitäten (s. Abbildung b) als Hauptsymptom. Die Tiere pflegen bald nach der klinisch erkennbaren Erkrankung zu sterben. Bei dem zur Verfügung stehenden rassistisch inhomogenen Material schwankt der Prozentsatz der erkrankten Mäuse sehr. Man kann mit etwa 40 bis 80 % (ausnahmsweise nur bis 100 %) Erkrankungen rechnen.

Für die Weiterführung des Gelbfieberstammes ist es von Wichtigkeit, dass man als Material für die Passage nur die Gehirne von Mäusen auswählt, die typisch erkrankt sind. Alle irgendwie andersartig erkrankten Mäuse (mit spastischen Lähmungen, Durchfall usw.) dürfen zur Passage nicht verwendet werden.

Die klinische Diagnose der Gelbfieberecephalitis bei der Maus muss, bevor man an die Herstellung von Impfstoff herangeht, durch den histologischen Befund erhärtet werden. Typisch hierfür sind die perivaskulären Rundzelleninfiltrate und besonders die acidophilen Kerneinschlüsse in den Ganglienzellen der kranken Gehirne (s. Handbuch der Viruskrankheiten, Bd. I, Taf. 1 zum allgemeinen Teil). Hierzu sind Serienschritte des Gehirns in frontaler Richtung anzulegen und sorgfältig durchzumistern.

Für die Darstellung der acidophilen Kerneinschlüsse in den Ganglienzellen eignet sich am besten folgendes Vorgehen beim Einbetten und Färben der Schnitte:

Fixierung des Gehirns in Zenker-Formol 24 Std., Jodalkohol, Einbettung über Xylol (lange Einbettung). Die Schnitte sind ohne Hartmittel (nicht mit Erierglycerin) auf die Objektträger zu bringen.

Färben der Schnitte:

1. nach Wolbach mit Giemsalösung von Grüber:

Über Jodalkohol die Alkoholreihe herunter bis 70 % Alkohol, dann 1 Stunde Jodalkohol (kann auch länger), kurz wasserspülen, dann 10 min. in 0,25 %iger Natriumthiosulfatlösung, 10 min. in Aq. dest. unter 2 maligem Wechseln des Wassers. Dann mit der frisch hergestellten Giemsalösung 18-20 Stunden färben. (Giemsalösung: 5 ccm Giemsalösung von Grüber + 95 ccm gepuff. Aq. dest.)

2. nach Mallory mit Phloxin-Methylenblau:

Farblösungen: a) 2 g Methylenblau in 10 ccm 96 % Alkohol und 90 ccm gepuff. Aq. dest. lösen. Vor dem Gebrauch wird diese Methylenblaulösung mit 90 ccm einer 0,1 %igen Kaliumcarbonatlösung vermischt.

b) 2,5 % wässrige Phloxinlösung. Schnitte bis zur Färbung wie unter 1. Färben in Phloxinlösung 20 min., wässern in Aq. dest., 10 min. Methylenblaulösung.

Nach beiden Färbungen wasserspülen und differenzieren in 5 %iger Colophoniumlösung (in 96 % Alkohol). Weiter bis Kanadabalsam wie üblich. Die Verwendung von neutralem Aq. dest. ist für beide Färbungen erforderlich!

Erst nach histologisch gesicherter Diagnose der mit dem Virusmaterial erzeugten Mäuseencephalitis kann zur Herstellung des Impfstoffes geschritten werden. Die histologische Kontrolle muss alle 3 - 4 Wochen wiederholt werden. Ausserdem ist der Virusstamm mindestens einmal mit einem Gelbfieberimmenserum im Neutralisationsversuch an der Maus zu kontrollieren.

Auf diese Weise entsteht ein Impfstoff aus dem Gehirn eines kranken Mäusegehirns - etwa 30 Impfdosen.

1:100 zu verdünnen Virus-(Hirn-)Antikörpern erhalten nicht-
 stens 6 Wunde je 0,05 bis 0,10 cc in der halben Wunde later-
 cerebral.
 Am 7. oder 8. Tage nach der Infektion erkrankten die Mäuse
 unter dem Bilde einer Enzephalitis mit charakteristischer die die
 teren Extremitäten (u. a. Abbiegung) als Hauptzeichen. Die Tiere
 plagen bald nach der klinisch erkrankten Erkrankung zu sterben.
 Bei der Verlegung stehenden räumlich inhomogenen Material
 schneidet der Präparat der erkrankten Mäuse nicht. Das kann mit
 etwas 10 bis 20 (Antikörper) nach die 100 (Erkrankung)
 rechnen.

Wir die Weiterführung des Gelblieberausens ist es von Wichtig-
 keit, dass man ein Material für die Färbung auf die Gehirne
 von Mäuse, z. B. die Gehirne, die typisch erkrankt sind. Die Färbung
 untere Extremitäten erkrankten Mäuse (mit typischen Läsionen, durch-
 fallig) durch eine Färbung nicht verwendet werden.
 Die klinische Diagnose der Gelblieberausens ist bei der
 Maus, bevor man zu der Herstellung von Schnittpräparaten
 durch die histologischen Befunde erkrankt werden. Typisch hier-
 für sind die perivaskulären Infiltrationen und besonders
 die nekrotischen Kernnekrosen in der Gehirnrinde der Kran-
 ken Gehirne (u. a. Handlung der Virusreaktionen, H.I., Teil I zum
 allgemeinen Teil). Hierin sind Serienschnitte des Gehirns in
 Frontaler Richtung anzulegen und sorgfältig durchzuschnitten.
 Für die Darstellung der nekrotischen Kernnekrosen in den
 Gehirnen eignet sich ein besonderes färbendes Verfahren beim
 Einbetten und Färben der Gehirne:

Färbung des Gehirns in Eosin-Formol 24 Std., Jodalkohol,
 Einbettung über Xylol (siehe Einbettung). Die Schnitte sind ohne
 Halbfärbung (nicht mit Karyoxyl) mit der Objektive zu prin-
 zipien.

Über die Schnitte:
 1. nach Wobach mit Gegenfärbung von Carbolanilin
 Über Jodalkohol die alkoholische Paraphenylendiamin 10% Alkohol,
 dann 1 Stunde Jodalkohol (dann auch länger), kurz wasserlöslich,
 dann 10 min. in 0,2%iger Karbunkarbolinsäurelösung, 10 min. in
 Ap. dest. oder 2 maligen Waschen des Gehirns. Dann mit der
 frisch hergestellten Eisenlösung 18-20 Stunden färben. (Gegen-
 färbung: 5% Eisenlösung von Carbolanilin + 0,5% von gepulv. Ap. dest.)
 2. nach Mallory mit Phloxin-Bismarck-Färbung
 Färbungsmittel: a) 2% Karbunkarbolinsäure in 10% von 96% Alkohol
 und 90% von gepulv. Ap. dest. lösen. Vor dem Gebrauch wird diese
 Färbungslösung mit 90% von einer 0,1%igen Kaliumkarbonat-
 Lösung versetzt.

b) 2,5% wässrige Phloxinlösung, Schnitte die
 zur Färbung wie unter 1. Färben in Phloxinlösung 20 min., wässern
 in Ap. dest., 10 min. Karbunkarbolinsäure.
 Nach beiden Färbungen wasserlöslich und differenzieren in
 5%iger Colophoninlösung (in 96% Alkohol). Färben die Schnitte
 dann wie üblich. Die Verwendung von neutralen Ap. dest. ist für
 beide Färbungen erforderlich.
 Erst nach histologisch gesicherter Diagnose der mit dem
 Virusmaterial erzeugten Enzephalitis kann zur Herstellung
 des histologischen Schnittes werden. Die histologische Kontrolle
 muss alle 3-4 Wochen wiederholt werden. Ausserdem ist der Vi-
 rusnachweis einmal mit einem Gelblieberausens in
 Neutralisationsversuch an der Maus zu kontrollieren.

1.
 2
 3

II. Instrumentarium zur Herstellung des Trockenimpfstoffes.

Sämtliche Instrumente, wie sie bei der Passagefortführung gebraucht werden, sind auch bei der Herstellung des Impfstoffes erforderlich.

Ausserdem kommen dazu:

1. Kapillarpipetten mit Gummihütchen und Reagenzgläser mit je 10 ccm sterilem Aq. dest.

2. Trockengefässe aus Jenaer Glas, in denen der Impfstoff getrocknet und aufbewahrt wird. Das Glas muss unbedingt alkalifrei sein, weil sonst das Virus durch Alkaliabgabe des Glases an den Inhalt zerstört wird. (Wir benutzen dazu Reagenzgläser aus Jenaer Glas, die in einer bestimmten Höhe vom Glasbläser eng ausgezogen fertig geliefert werden. Die Verengung erleichtert das Abschmelzen der Impfstoffampulle nach der Trocknung im Vakuum.)

3. Gummiabdichtungsscheiben (Flansche) für die Abdichtung der Verbindung von Reagenzglas und Trockenapparat.

4. Kohlensäureschnee und Methylalkohol zur Herstellung der Kältemischung. Der Kohlensäureschnee kann in Thermosflaschen als 5 kg - Blocks über mehrere Tage gehalten werden.

5. Trockenapparat (siehe Abbildung c) bestehend aus:

a) Hochvakuumpumpe,

b) Glasrampen mit Vakuumbahnen und Ansatzstutzen mit Mundstück für die Anbringung der Trockengefässe,

c) Absaugleitung von der Glasrampe zur Vakuumpumpe (Tombak-schlauch, oder Vakuumschlauch aus Gummi, oder bewegliche Kette aus gewinkelten Glasrohren mit Schliffen).

d) Vakuumeter nach Moser mit Glasschliff.

Achten auf genügend grossen Querschnitt von Hähnen und Absaugleitung! Anhaltspunkt für die Grösse des Querschnitts ist der Ansaugstutzen der Vakuumpumpe.

Als Hochvakuumumpen werden am besten die Ölpumpen der Firma Leybold und Nachf. benutzt oder Diffusions-Pumpen. Bei der "Duplexpumpe", die ein sehr gut brauchbares Hochvakuum gibt, ist eine Zwischenschaltung von chemischen Trockenmitteln wie Phosphor-pentoxyd oder dergleichen oder aber eine Kältefalle unbedingt erforderlich, weil sonst die Pumpe durch das angesaugte Kondenswasser in kurzer Zeit zerstört werden kann. Die Gastballastpumpe von Gaede der Firma Leybold und Nachf. ist so konstruiert, dass sie ohne zwischengeschaltete Wasserdampfabsorption arbeiten kann. Diese letztere Pumpe hat sich gut bewährt.

III. Herstellung des Trockenimpfstoffes.

Bei laufender Impfstoffherstellung ist die Bereitung von Mischimpfstoff von mehreren Mäusegehirnen am zweckmässigsten.

Es werden 20 - 40 Mäuse mit dem Passagevirus wie oben beschrieben intracerebral infiziert. Von diesen erkranken am 3. bis 4. Tag nach der Infektion etwa 10 bis 20 bis 30 Mäuse. Je 10 an einem Tag erkrankte Mäuse werden zu einer Impfstoffserie verarbeitet. Auch hier sind nur die typisch encephalitisches kranken Tiere zu verwenden. 10 Mäusegehirne liefern etwa 1000 Impfportionen.

Nach Herausnahme der Gehirne aus der Schädelhöhle werden je 10 zusammen in einem Porzellanmörser sorgfältig zerrieben und mit je 7 ccm Aq. dest. zu einer Suspension verrührt. Mittels einer Kapillarpipette wird nun diese Hirnaufschwemmung zu Portionen von 0,5 ccm in die Trockengefässe eingefüllt (s. Abbildung d)).

Auf diese Weise enthält jede Impfstoffampulle Material von einem halben Mäusegehirn = etwa 50 Impfportionen.

II. Instrumentarium zur Herstellung des Trockenpräparates

Statische Instrumente, wie die bei der Passivierung zum Gebrauch werden, sind auch bei der Herstellung des Präparates erforderlich.

Außerdem kommen dazu:
1. Vakuumapparate zur Entwässerung und Trocknung als

2. Vakuumtrockner aus Jenaer Glas, in denen der Inhalt getrocknet und sublimiert wird. Das Glas muss unbedingt einwandfrei sein, weil sonst das Vakuum durch Alkaliabgabe aus dem Inhalt zerstört wird. Wir benutzen dazu Jenaer Glas aus Jena. Die in einer bestimmten Höhe von Glasbläsern aus Jena hergestellten werden. Die Verwendung erleichtert das Abnehmen des Inhaltsgewichts nach der Trocknung im Vakuum.

3. Gewichtsmessungen nach der Trocknung (z. B. für die Abwägung der Verdunstung von Wasser und Trocknungsgut).
4. Kontrollmessungen zur Kontrolle der Verdunstung als Kristalle. Die Kontrollmessungen kann in Thermostaten als 2 kg - Waage über mehrere Tage gehalten werden.
5. Trocknungsgut (siehe Abbildung a) bestehend aus:
a) Wasserkühler,
b) Glasröhren mit Vorwärmern und Anzeigegeräten für die Anbringung der Trocknungsgüter.

c) Abwägung von der Glasröhre zur Vermeidung von Verlusten, oder Vermeidung von Verlusten (siehe Abbildung b).
d) Vakuummeter nach Hoeser mit Genauigkeit.

Außerdem sind genügend grosse Geschwindigkeit von Hoeser und Abwägung: Anzahl der für die Größe des Geschwindigkeits für die Anzeigegeräte der Vakuumglocke.

Als Hochvakuumglocken werden am besten die folgenden der Firma Leybold und Nechtl benutzt oder Hiltner-Hungen. Bei der "Dübelglocke", die ein sehr gut brauchbares Hochvakuum gibt, ist eine Zwischenkammer von chemischen Trocknungsmitteln wie Phosphor pentoxid oder dergleichen oder einer Kältemischung unbedingt erforderlich, weil sonst die Pumpen durch das anwesende Kondensat in kurzer Zeit zerstört werden kann. Die Gasfallempfangs von jeder der Firma Leybold und Nechtl ist so konstruiert, dass sie eine zwischengeschaltete Wasserabsorption arbeiten kann. Diese letztere Lampe hat sich gut bewährt.

III. Herstellung des Trockenpräparates

Bei laufender Injektionsherstellung ist die Herstellung von Mischpräparaten von mehreren Kammern an zweckmäßiger. Es werden 20 - 40 Kammern als Passivierung als oben beschriebenen Injektionsinjektor. Von diesen erhalten wir 20 bis 40 nach der Injektion etwa 10 bis 20 bis 30 mm. In einem Tag erkrankte Kammern werden zu einer Injektionsverarbeitung. Auch hier sind nur die typisch ausgeprägten Kammern Tiere zu verwenden. In Museen für Tiere etwa 100 Injektionsportionen.

Nach Herannah der Götter aus der Schilddrüse werden sie zusammen in einem Porzellantrichter sorgfältig zerlesen und mit je 7 cm Ap. dest. zu einer Suspension vermischt. Misch einer Kapillarpipette wird nun eine kleine Menge Suspension zu Portionen von 0,5 cm in die Trocknungskammer eingebracht (siehe Abbildung d)). Auf diese Weise enthält jede Injektionsportion Material von einem halben Kammern - etwa 50 Injektionen.

1
10

Sterilitätskontrollen werden aus der Schädelbasis jeder einzelnen Maus sowie aus dem gesamten Mischimpfstoff angesetzt.

Der im Fräser verbliebene Impfstoffrest wird zur Gewinnung von neuem Ausgangsmaterial für den Impfstoff sowie gleichzeitig als Kontrolle der Mäusepathogenität des bereiteten Impfstoffes mit Menschenserum-Ringerlösung weiter 100 fach verdünnt und neuen Mäusen intracerebral wie beschrieben verabfolgt.

Beim Einfüllen des suspendierten Impfstoffes in die Reagenzgläser ist darauf zu achten, dass der enge Hals des Reagenzglases nicht beschmutzt wird, weil sonst das Abschmelzen der Ampulle im Vakuum Schwierigkeiten macht.

Das Trocknen des mit Aq. dest. 1 - 2,5 fach verdünnten Mäusegehirnmaterials findet nach dem im Prinzip von Flosdorf und Kudd angegebenen Verfahren nach Tiefkühlung im Hochvakuum 4 an der Trockenapparat statt. Das am Ende des Trockenprozesses wieder erzielte Vakuum ist etwa 10^{-2} bis 10^{-3} mmHg.

In einer Kältemischung (Kohlensäureschnee und Methylalkohol) werden die Trockengefäße mit dem eingefüllten Impfstoff vorsichtig tiefgefroren, wobei man durch Drehen und Wenden des Gefäßes den Inhalt in möglichst dünner Schicht an der Glaswand anfrieren lässt. Durch diese Oberflächenvergrößerung wird der Trockenprozess erheblich beschleunigt. Nachdem der Impfstoff gut durchgefroren und die Vakuumpumpe unter Kontrolle des erreichten Vakuums am Vakuumeter in Gang gesetzt worden ist, werden nun die Trockengefäße mittels der abdichtenden Gummi-Flanschen an die Mundstücke der Glasrampe möglichst in Abständen von 5 - 10 Minuten nacheinander angebracht. Dabei sinkt das Vakuum etwas ab, etwa auf 2 mmHg. Der Trockenprozess dauert etwa 2 - 4 Stunden. Das Vakuum hat wieder seine ursprüngliche Höhe erreicht, der Inhalt der Ampullen springt auf leichtes Beklopfen von der Glaswand ab, die Ampullen haben etwa die Umgebungstemperatur wieder angenommen.

Nun werden die Ampullen im Hochvakuum vorsichtig abgeschmolzen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Abschmelzstelle frei von Impfstoffresten ist, weil sonst leicht im Anfang nicht bemerkbare Risse im Glas durch Spannungsunterschiede entstehen, die das Vakuum illusorisch machen. Das Abschmelzen muss sehr gleichmäßig, ohne dass tiefe Einziehungen entstehen, vorgenommen werden.

Die Aufbewahrung des Trockenimpfstoffes im Vakuumröhrchen hat nach den bisherigen Erfahrungen tiefgekühlt bei einer Temperatur von -7° bis -9° Cels. zu erfolgen. Unter diesen Bedingungen bleibt der Impfstoff mindestens 6 Monate lang, wahrscheinlich aber auch länger brauchbar.

IV. Prüfung des Impfstoffes.

Als bald nach seiner Herstellung hat eine Prüfung des Trockenimpfstoffes bezüglich seiner Mäusepathogenität und eine Prüfung am Menschen zur Feststellung der Unschädlichkeit für ihn zu erfolgen.

Wenn die Prüfung des Impfstoffes Pathogenität für Mäuse und Unschädlichkeit für den Menschen ergeben hat, kann der Impfstoff abgegeben werden.

Die Prüfung des Gelbfieberstammes auf immunisierende Eigenschaften ist von Zeit zu Zeit am Menschen vorzunehmen.

7. Das benutzte Glasstab sofort nach Gebrauch in den Sterilizer einlegen zur Vernichtung des an ihm befindlichen Impfmateriales.

8. Ampulle mit dem gebrauchsfertigen Impfstoff in den Reagenzglas in die Schachtel stellen.

V. Versand des Trockenimpfstoffes.

Nach den bisherigen Erfahrungen muss der hergestellte Impfstoff kühl transportiert werden. Kühlhaltegefässe (Thermosflaschen mit Trockeneisbeschickung und andere Gefässe) werden zurzeit ausprobiert.

Eine Trockenimpfstoffampulle enthält etwa mindestens 50 Impfdosen. Sie ist einzeln in einer kleinen Pappschachtel zusammen mit den Utensilien zur Herstellung des gebrauchsfertigen Impfstoffes sowie zur Durchführung der Impfung verpackt (Näheres s. Gebrauchsanweisung).

Der Impfstoff muss durch Kurier in einem Kühlhaltegefäss von dem Herstellungs- und Aufbewahrungsort (Tiefkühltruhe) abgeholt werden. Jede Impfstoffampulle hat eine Aufschrift über den Hersteller, die Seriennummer und die Gebrauchszeit zu erhalten.

VI. Gebrauchsanweisung für den Gelbfieberimpfstoff.

Getrocknetes, lebendes, abgeschwächtes Virus enthaltendes Material im Vakuumröhrchen zur Selbsterstellung des gebrauchsfertigen Impfstoffes für die kutane prophylaktische Schutzimpfung.

Inhalt der Packung:

- 1.) 1 Vakuumröhrchen mit Trockenimpfstoff (Inhalt entweder schollig oder pulverig, weiss oder bräunlich) für etwa 50 Personen.
- 2.) 1 Ampulle mit 2 ccm Aq.dest.steril.
- 3.) 1 Ampullenfeile
- 4.) 1 Drahtschlinge zum Öffnen der Impfstoffampulle
- 5.) 2 Glasstäbe zum Verrühren des Impfstoffes (in Tüte)
- 6.) 5 Impffedern (in Tüte)
- 7.) 5 Impffederhalter
- 8.) Eine Gebrauchsanweisung.

Zur Durchführung der Impfung sind ein Sterilisierapparat (Kocher) sowie eine Gas- oder Spiritusflamme bereitzustellen.

A. Herstellung des gebrauchsfertigen Impfstoffes:

1. Nach Entleeren der Packung Deckel und Schachtel mit der gelochten Pappzunge bereitstellen.
2. Aq.dest. mit steriler Spritze (Auskochen! Nicht mit Alkohol oder ähnlichen Desinfektionsmitteln behandeln!) aufziehen.
3. Impfstoffampulle an markierter Stelle leicht mit Ampullenfeile ersritzen und durch Anlegen der glühenden Drahtschlinge den oberen Ampullenteil absprenge. Die glühende Drahtschlinge muss genau in Höhe der angeritzten Stelle eng um die Ampulle anliegen. Vorsicht! Keine Gewalt anwenden, da Vakuum! Den oberen abgesprengten Ampullenteil in den Kocher legen.
4. Das sterile Aq.dest. unter sterilen Bedingungen mit der Spritze in die Impfstoffampulle einfüllen.
5. Glasstab durch die Flamme ziehen zum Zwecke der Sterilisation an der Luft abkühlen lassen (duvert lange).
6. Mit dem wieder abgekühlten, sterilen Glasstab den Impfstoff mit dem sterilen Aq.dest. unter sterilen Bedingungen sorgfältig verrühren, bis eine trübe Aufschwemmung mit möglichst wenigen gröberen Teilchen entstanden ist. Der Glasstab darf unter keinen Umständen erst in der Impfflüssigkeit abgekühlt werden, da sonst der Impfstoff durch Hitze zerstört wird.
7. Den benutzten Glasstab sofort nach Gebrauch in den kochenden Sterilisator einlegen zur Vernichtung des an ihm haftenden Impfmateri als.
8. Ampulle mit dem gebrauchsfertigen Impfstoff in das Loch der Pappzunge in die Schachtel stellen.

Nach den bisherigen Erfahrungen muss der hergestellte Impfstoff nicht inaktiviert werden. ...

VI. Gebrauchsanweisung für den Impfstoff

Getrocknetes, lebendes, abgeschwächtes Virus enthaltendes Material im Vakuumfläschchen zur Selbstverteilung des Gebrauchsfertigen Impfstoffes für die humane prophylaktische Schutzimpfung.

Inhalt der Packung

- 1. 1 Vakuumfläschchen mit Impfstoff (Inhalt entweder einmaltig oder zweimalig, wies oder bräunlich) für eine Person.
2. 1 Ampulle mit 2 cm Ap. dest. steril.
3. 1 Ampulle sterile
4. 1 Instruktion zum Gebrauch des Impfstoffes
5. 2 Glasstäbe zum Verreiben des Impfstoffes (in 1/2 cm)
6. 2 Impflöffel (in 1/2 cm)
7. 2 Impflöffelster
8. 1 eine Gebrauchsanweisung.

Zur Durchführung der Impfung sind ein Sterilisationsapparat (Kocher) sowie eine Gas- oder Spirituslampe erforderlich.

A. Herstellung des keimvermehrten Impfstoffes

- 1. Nach Artieren der Packung Deckel und Schachtel mit der Gaslampe sorgfältig zu sterilisieren.
2. Ap. dest. mit steriler Spritze (Auskopfen) in die Ampulle oder in die Impfstoffampulle (Ampulle) einfüllen.
3. Impfstoffampulle an geeigneter Stelle in die Ampulle einfüllen und durch Anlegen der Ampulle die Impfstoffampulle abdecken.
4. Das sterile Gas. dest. unter sterilen Bedingungen mit der Spritze in die Impfstoffampulle einfüllen.
5. Glasstab durch die Öffnung des Impfstoffes (Ampulle) in die Ampulle einfüllen.
6. Mit der wieder eingelegten, sterilen Glaslampe den Impfstoff in der Ampulle sterilisieren.
7. Den sterilen Glasstab sofort nach Gebrauch in den Kocher sterilisieren.
8. Ampulle mit dem keimvermehrten Impfstoff in das Loch der Packung in die Schachtel einfüllen.

B. Durchführung der Impfung:

Die Impfung erfolgt wie bei der Pockenschutzimpfung an Oberarm.

1. Haut mit Alkohol, Aether oder Benzin reinigen (nicht mit Jod- oder Sepsotinktur!). Vor der Impfung muss das Reinigungsmittel wieder vollständig verdunstet sein.
2. Impffedern vor jeder Impfung ausglühen und an der Luft abkühlen lassen (nicht im Impfstoff!). Am besten legt man sich die ausgeglühten Impffedern mit ihren Haltern so bereit, dass die Impffedern zum Abkühlen über den Deckelrand überstehen.
3. Mit der in den Impfstoff eingetauchten Impffeder zwei oberflächliche Hautschnitte im Abstand von 1-2 cm am Oberarm anlegen und den an der Feder befindlichen Impfstoff gut mit der Feder einreiben.
4. Impfstoff eintrocknen lassen. Kein Verband.
5. Nach Öffnen der Vakuumampulle muss der Impfstoff sofort verbraucht werden, da der zubereitete Impfstoff nicht über mehrere Stunden haltbar ist.
6. Impfstoffreste sind unbedingt sofort nach Durchführung der Impfung durch mindestens 10 Minuten langes Kochen der benutzten Ampullen und Glasstäbe im Kocher zu vernichten. Auf keinen Fall für Späterkommende aufbewahren!

C. Erfolg der Impfung:

Die technisch richtig durchgeführte Impfung hinterlässt einen sicher 1 Jahr dauernden Schutz vor der für den Europäer meist tödlich verlaufenden Erkrankung. Örtliche Hautreaktionen nach der Impfung treten nicht auf. Eine Nachschau erübrigt sich daher. Allgemeinreaktionen fehlen meistens. Gelegentlich treten leichtere Kopfschmerzen, Körperliches Unbehagen mit Temperatursteigerungen bis $38,5^{\circ}$ zwischen dem 4. - 8. Tag nach der Impfung auf. Schwere Allgemeinreaktionen, insbesondere Gelbsucht oder Nierenreizung (Eiweiss im Urin) sind unter Angabe der Operationsnummer der Inspektion des Sanitätswesens der Luftwaffe unmittelbar und auf dem Dienstwege zu melden. Ferner ist bei derartigen Fällen der zuständige Hygieniker und ein Fachinternist hinzuzuziehen. Der positive Impferfolg ist weder an äusseren noch an allgemeinen Reaktionen erkenntlich, sondern nur durch eine serologische Untersuchung festzustellen, sozu jedoch bei technisch richtig durchgeführter Impfung kein Bedürfnis besteht.

Impfschutz ist 3 Wochen nach der Impfung eingetreten.

B. Durchführung der Impfung:

- Die Impfung erfolgt wie bei der Kochenimpfung im Oberarm.
1. Haut mit Alkohol, vorher oder danach rasieren (nicht mit Jod- oder Saponinlösung). Vor der Impfung muss das Feinwundmittel erster vollständig verworfen sein.
 2. Impfstoff vor jeder Impfung anschauen und an der Luft abkühlen lassen (nicht im Impfstoff). An dessen Ort man sich die entsprechenden Impfstoffe mit einem Keimern so bereit, dass die Impfstoffe zum Abkühlen über den Leichter und abkühlen.
 3. Mit der in der Impfstoff abgekühlten Impfstoff zwei oberflächliche Hautschnitte im Abstand von 1-2 cm im Oberarm anlegen und den an der Feder befindlichen Impfstoff gut mit der Feder einbringen.
 4. Impfstoff einbringen lassen. Kein Verband.
 5. Nach 5-10 Minuten der Vakuumkammer man der Impfstoff sofort verworfen werden, da der abgekühlte Impfstoff nicht über mehrere Stunden haltbar ist.
 6. Impfstoffreste sind unbedingt sofort nach Impfung der Impfung durch mindestens 10 Minuten langem Kochen der benutzten Ampullen und Gläser in Wasser zu vernichten. Bei keinem Fall für Späterkommende zu verwenden!

C. Erfolg der Impfung:

Die Impfung erfolgt durch die Impfung des Impfstoffes in einen einen 1 Jahr dauernden Schutz vor der für den Impfstoff meist rechtlich verbotenen Keimimpfung. Die Impfstoffe nach der Impfung treten nicht auf. Eine Reaktion erfolgt sich daher. Allgemeine Reaktionen treten meistens gelegentlich treten leichter oder schwere, Körperliche Unbehagen ist festgestellt. Steigerung bis 38,5° zwischen dem 4. - 6. Tag nach der Impfung auf. Schwere Allgemeinreaktionen, insbesondere Gelenks- oder Nervenreaktion (Erythema im Urin) sind unter Angabe der Dosisnummer der Impfung des Impfstoffes der Impfstoffe unmittelbar vor und auf dem Wege zu sein. Ferner ist bei der Impfung zu prüfen der zusätzliche Erythema und ein Erythema nach 2-3 Wochen. Der positive Impfstoff ist weder an Wasser noch an anderen Reaktionen erkennbar, sondern nur durch eine solche gleiche Untersuchung festzustellen, wenn jedoch bei technischer Impfung durchgehender Impfung kein Bedauern besteht.

Impfstoffe ist 3 Wochen nach der Impfung einzuimpfen.