

## Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen

### III. Mitteilung

#### Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren nach intrathalamischer Injektion, unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den Virustypen

F. UNTERHARNSCHEIDT, O. BONIN, K. SCHMIDT und I. SCHMIDT

Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max Planck-Institut) München  
(Direktor: Prof. Dr. G. PETERS), sowie Staatliche Anstalt für experimentelle  
Therapie „Paul Ehrlich-Institut“ zu Frankfurt am Main  
(Komm. Direktor: Prof. Dr. G. HEYMANN)

Eingegangen am 10. Oktober 1965

Im Anschluß an die in der II. Mitteilung erfolgte Besprechung der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren nach intralumbaler Injektion wird in der vorliegenden Studie über die Ergebnisse entsprechender Versuche mit intrathalamischer Injektionstechnik berichtet.

Die Injektionstechnik, die Technik der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und die Bewertungskriterien für die Einzelläsionen sind in der I. Mitteilung beschrieben.

#### Eigene Befunde

Die Befunde stützen sich auf die Untersuchung von insgesamt 704 Rhesusaffen, von denen 504 Tiere mit attenuiertem Poliovirus Typ I, 99 Tiere mit Typ II und 101 Tiere mit Typ III injiziert wurden.

Die Ergebnisse sind, wie in der II. Mitteilung für den intralumbalen Versuch, wiederum in Diagrammen dargestellt, die ein Bild von dem Ausbreitungsmuster und der Abhängigkeit der Läsionshäufigkeit von der Virusdosis vermitteln sollen.

Um die Unterschiede zwischen den Virustypen einigermaßen anschaulich zu machen, mußte für die Darstellung der Läsionshäufigkeiten auf der Ordinate ein anderer Maßstab gewählt werden. Die hier wiedergegebenen Diagramme sind also mit denen der II. Mitteilung nur nach Verkleinerung der Säulenhöhe auf ein Fünftel vergleichbar.

Ganz allgemein kann festgestellt werden, daß die Häufigkeit der geweblichen Alterationen beider Qualitäten (mesodermal-gliös und Nervenzelluntergang) nach intrathalamischer Injektion wesentlich geringer ist als nach intralumbaler Injektion. Dabei fällt zudem auf, daß sich die Tiere innerhalb der einzelnen Gruppen mit jeweils gleicher Virusdosis nicht so gleichförmig verhalten wie in den Gruppen des intralumbalen

Versuches. Vielmehr muß man nach intrathalamischer Injektion erwarten, daß Tiere derselben Gruppe überhaupt keine oder aber über das ganze Nervensystem verteilte, stark ausgeprägte gewebliche Veränderungen zeigen. Bei einer derartigen Verteilung der Läsionshäufigkeit in der einzelnen Gruppe, d. h. dem Befall von nur wenigen Tieren, muß man folglich mit einer größeren Streuung der Ergebnisse rechnen, wenn es sich um Einzelversuche mit relativ kleiner Tierzahl pro Gruppe handelt.

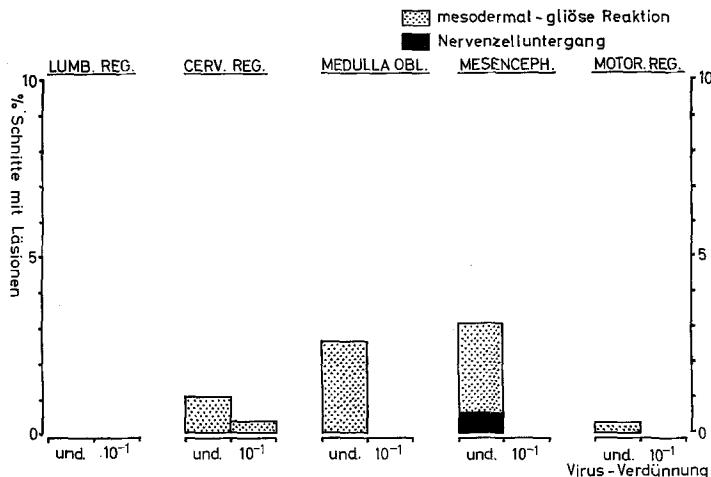


Abb. 1. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Läsionen im ZNS von Rhesusaffen nach intrathalamischer Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ II, Stamm P 712 Ch 2ab

Die Ergebnisse mit den einzelnen Virustypen werden, wie in der II. Mitteilung, in der Reihenfolge ihrer Schwere (Wertreihe der Neurovirulenz) beschrieben.

Mit *Virus Typ II* (Abb. 1) wurden 99 Rhesusaffen injiziert; davon erhielten 49 Tiere 1,0 ml unverdünntes Virus ( $10^{7,0} - 10^{7,5}$  Gewebe-  
kultur-Infektionsdosen = dim) und 50 Tiere das gleiche Volumen einer 1:10 Verdünnung des Virus. Das Virusmaterial entstammte fünf verschiedenen Vermehrungsansätzen des Impfvirus, Typ II von SABIN, Stamm 712 Ch 2ab, wobei mit jedem Ansatz etwa die gleiche Zahl Tiere injiziert wurde.

Nervenzelluntergang wurde bei diesen Tieren nur im Mittelhirn und der Cervicalregion beobachtet. Der Befund ist äußerst selten: Die Veränderungen im Mittelhirn (392 untersuchte Schnitte) und im Halsmark (1.174 untersuchte Schnitte) betrafen jeweils nur ein Tier. Beide Tiere boten in den übrigen Regionen des ZNS keinerlei Läsionen.

Auch die mesodermal-gliösen Reaktionen waren im Mittelhirn am häufigsten; sie wurden nach Injektionen von unverdünntem Virus in etwa 5% der histologischen Schnitte festgestellt. Zum Vergleich sei

erwähnt, daß diese Alterationen nach intralumbaler Injektion desselben Virus in etwa 45 % auftraten. Noch seltener wurden mesodermal-gliöse Reaktionen in der Medulla oblongata, der Cervicalregion und der motorischen Region gefunden; die Lumbarregion blieb bei sämtlichen Tieren frei.

Bemerkenswert erscheint uns, daß in allen Regionen, mit Ausnahme der unmittelbaren Nachbarschaft der Injektionsstelle, die *relativen*

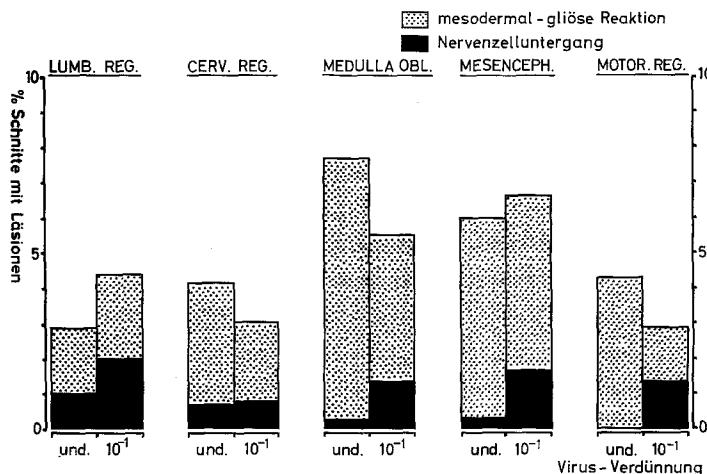


Abb. 2. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Läsionen im ZNS von Rhesusaffen nach intrathalamer Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ I, Stamm L Sc 2ab

Häufigkeiten mesodermal-gliöser Reaktionen nach intrathalamer und intralumbaler Injektion ungefähr gleich sind. Stets war das Mittelhirn am häufigsten betroffen, danach, in abnehmender Reihe, die Medulla oblongata, die Cervical- und motorische Region (vgl. Abb. 1 mit Abb. 1 der II. Mitteilung).

Mit *Virus Typ I* (Abb. 2) wurden insgesamt 504 Rhesusaffen injiziert, wobei wiederum etwa die Hälfte der Tiere unverdünntes, die andere Hälfte 1:10 verdünntes Virus erhielt. Das Material entstammte 13 verschiedenen Vermehrungsansätzen des Sabinischen Impfvirus Typ I Stamm LSc 2ab, von denen 11 nur einmal und 2 in wiederholten Versuchen mit jeweils 20 Tieren (je zur Hälfte mit unverdünntem und 10<sup>-1</sup> verdünntem Virus) getestet wurden.

Nervenzelluntergang kam in allen untersuchten Regionen in annähernd gleicher Häufigkeit vor (Abb. 3 und 4). Wie schon bemerkt, betrafen diese Veränderungen nur wenige Tiere, bei denen sie aber in sämtlichen Regionen zu finden waren.

Dagegen fanden sich die mesodermal-gliösen Reaktionen in Mittelhirn und Medulla oblongata deutlich häufiger als in den übrigen Regionen.

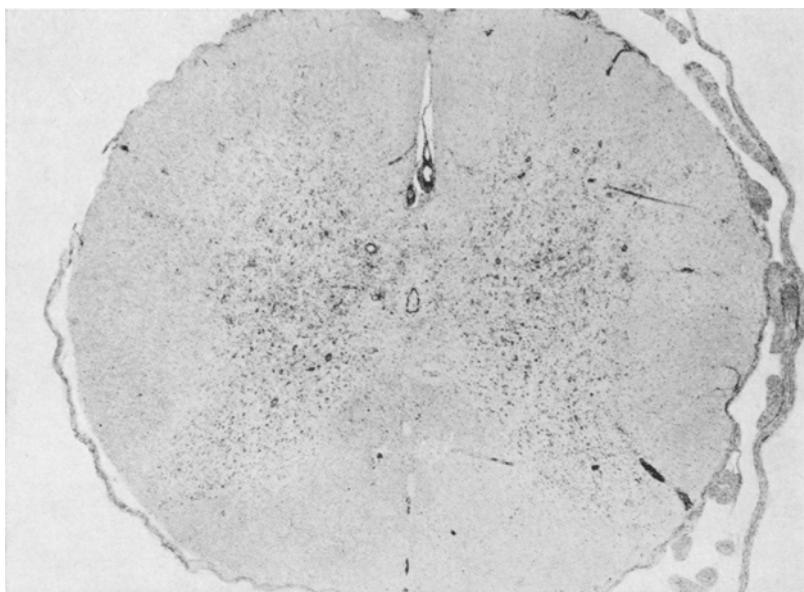


Abb. 3. Rhesusaffe, Lumbalregion. Intrathalamische Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ I. Fast vollständiger Ausfall der Nervenzellen in der grauen Rückenmarksfigur, besonders ausgeprägt in den Vorderhörnern. Fleckförmige und disseminierte Proliferation von Astro- und Mikroglia. In den weißen Strangarealen geringfügige lymphocytär-plasmacelluläre Gefäßsäume. In den weichen Häuten nur stellenweise Einlagerung von Rundzellen. Nissl; 16:1

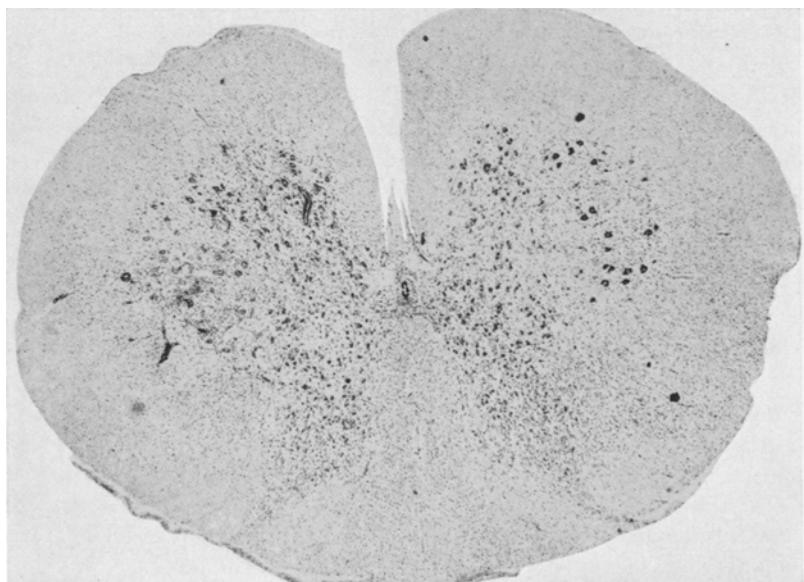


Abb. 4. Rhesusaffe, Cervicalregion, Intrathalamische Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ I. Neuronophagien an der Basis des linken Vorderhorns. Disseminierte und fleckförmige Reaktion der Glia. Geringgradige lymphocytär-plasmacelluläre Gefäßsäume. Nissl; 16:1

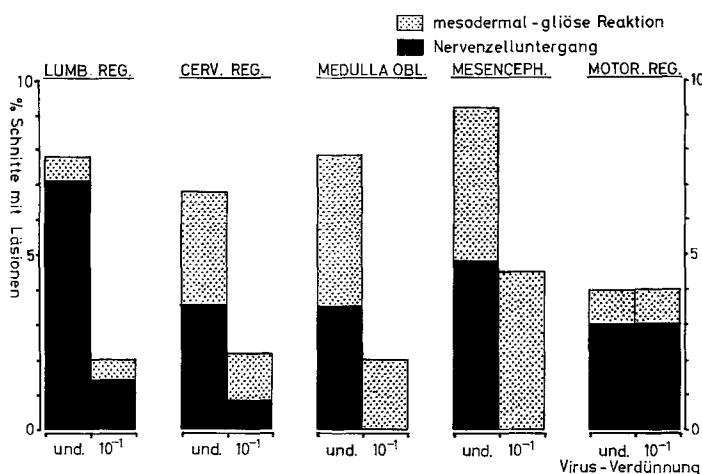


Abb.5. Prozentsatz der Schnitte mit histologischen Läsionen im ZNS von Rhesusaffen nach intrathalamischer Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ III, Stamm Leon 12a,b

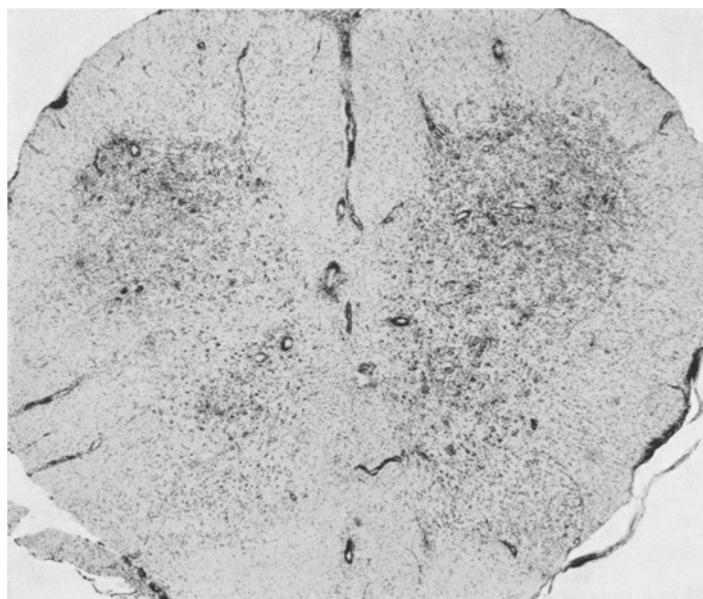


Abb. 6. Rhesusaffe, Lumbalregion. Intrathalamische Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ III. Fast vollständiger Nervenzelluntergang mit massiver Gliazellproliferation. Mäßiggradige Gefäßinfiltrate im Entzündungsfeld und in den weißen Strangarealen. Ebenfalls Proliferation der Glia in der weißen Substanz. In den weichen Häuten stellenweise massive Einlagerung von Lymphozyten und Plasmazellen. Nissl; 16:1

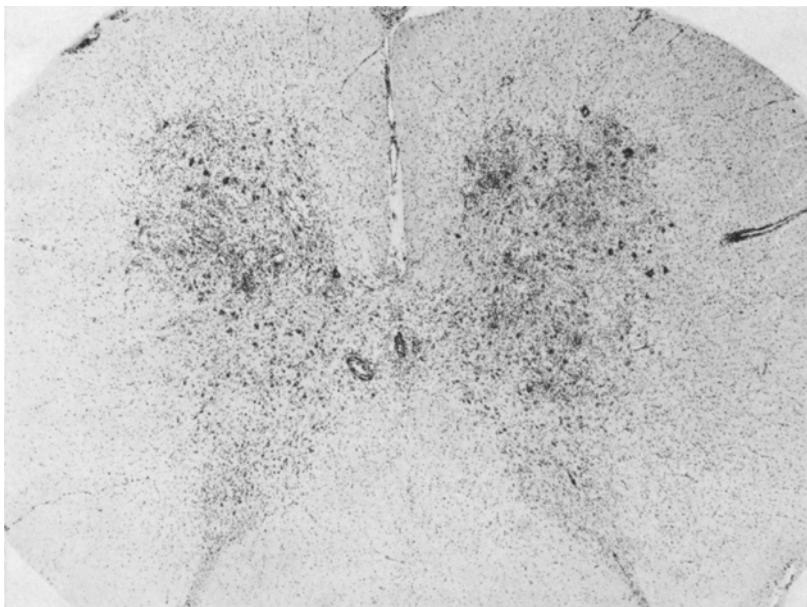


Abb. 7. Rhesusaffe, Cervicalregion, Intrathalamische Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ III. In der grauen Substanz beiderseits, jedoch am ausgeprägtesten in den Vorderhörnern, ausgedehnte Neuronophagien. Herdförmige und disseminierte Proliferation der Glia. Nur geringgradige adventitielle Säume von Lymphocyten und Plasmazellen. Nissl; 16:1

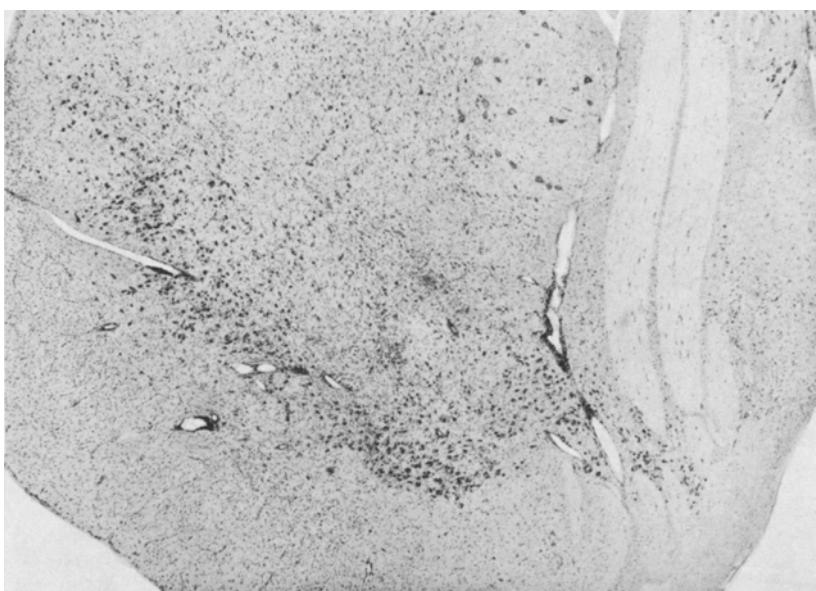


Abb. 8. Rhesusaffe, Mittelhirn, Intrathalamische Inoculation von attenuiertem Poliovirus Typ III. In der Substantia nigra Nervenzelluntergang mit Reaktion der Glia und mäßiggradigen adventitiellen Infiltraten. Nissl; 16:1

Hier besteht ein ähnliches Verteilungsmuster wie nach intralumbaler Injektion des Virus (vgl. Abb. 2 mit Abb. 3 der II. Mitteilung), wo allerdings die Lumbalregion häufig befallen ist.

Mit *Virus Typ III* (Abb. 5) wurden insgesamt 101 Rhesusaffen injiziert; 51 Tiere erhielten unverdünntes Virus, 50 Tiere eine 1:10 Verdünnung. Das Material entstammte fünf verschiedenen Vermehrungsansätzen des Sabinischen Impfvirus Typ III, Stamm Leon 12a<sub>1</sub>b.

Virus Typ III verursachte noch häufigeren Nervenzelluntergang als Virus Typ I (Abb. 6, 7 und 8). Während wir bei Typ I nach intrathalamischer Injektion keine Abhängigkeit zwischen Häufigkeit des Nervenzelluntergangs und Virusdosis feststellten, war diese Beziehung bei Typ III eindeutig. Die einzelnen Regionen des ZNS unterschieden sich nicht deutlich hinsichtlich der Häufigkeit und Schwere des Befalls; nur die motorische Region war etwas weniger oft betroffen.

Wie in den Versuchen mit intralumbaler Injektion, nahm die Häufigkeit mesodermal-gliöser Reaktionen — bezogen auf die Ergebnisse mit den anderen Virustypen — nicht im gleichen Verhältnis mit der Häufigkeit des Nervenzelluntergangs zu. Das charakteristische Verhältnis beider Qualitäten geweblicher Veränderungen in der Wertreihe der Neurovirulenz (siehe II. Mitteilung, S. 469) läßt sich also auch mit dem intrathalamischen Versuch zeigen. Im Gegensatz zu Virus Typ I fand sich bei Typ III bezüglich der mesodermal-gliösen Reaktionen eine deutliche Dosisabhängigkeit (wobei sich die motorische Region wieder etwas anders zu verhalten schien als die übrigen Bereiche).

### Diskussion

Obwohl bei den Versuchen mit intrathalamischer Injektion ein größeres Virusinoculum ( $10^{7,0}$ — $10^{7,5}$  dim/Tier) verabreicht wurde, traten Läsionen bloß bei weniger als einem Fünftel der Tiere auf, die lediglich  $10^{6,3}$ — $10^{6,8}$  dim des gleichen Virus intralumbal erhalten hatten.

Auffällig war dabei die Tatsache, daß in den Versuchen mit intrathalamischer Injektionstechnik nur einzelne Tiere in praktisch allen Regionen des ZNS stärkere Läsionen zeigten, wogegen alle anderen Tiere aus einer gleichbehandelten Versuchsgruppe keine oder nur äußerst geringfügige Alterationen aufwiesen. Die Reaktion des Einzeltieres auf die intrathalamische Virusinjektion ist also bei weitem nicht so gleichmäßig wie nach intralumbaler Injektion. Die Befunde nach intrathalamischer Injektion erinnern an eine Alles-oder-Nichts-Reaktion: Wenn es in wenigen Fällen zur Ausbreitung der Erkrankung kommt, dann reicht diese praktisch über das gesamte ZNS, wobei die Alterationen in allen untersuchten Regionen etwa gleich schwer sind. Es hat den Anschein, daß sogar die Seitendifferenzen im Befall der Lumbalregion geringer als nach intralumbaler Inoculation sind.

SABIN hatte versucht, diese Unterschiede mit der Hypothese zu erklären, daß es nach intrathalamischer Virusinfektion nur dann zu einer Ausbreitung der Poliomyelitis komme, wenn das Virus die relativ unempfindlichen Zellen von Hirnstamm und Halsmark überwunden habe. In unseren Versuchen erwiesen sich aber gerade Mittelhirn und Medulla oblongata als häufig befallen.

Im Mittelhirn wurden nach Inoculation von unverdünntem Virus Typ II bei 3 Tieren gewebliche Alterationen gefunden, in der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zeigten alle Tiere ein unauffälliges Bild.

Von diesen 3 Affen zeigte einer Nervenzelluntergang mit Gliazellreaktion und Gefäßinfiltraten in der Substantia nigra beiderseits und in den Pyramidenbahnarealen; die anderen Tiere wiesen Gefäß- und Gewebsinfiltrate in der Substantia nigra einseitig auf.

Im Mittelhirn lagen nach intrathalamischer Inokulation des unverdünnten Virus vom Typ I bei 17 Affen gewebliche Alterationen vor.

Bei 2 Tieren bestand Nervenzelluntergang mit konsekutiver Gliazellproliferation, einmal disseminiert in der Mittelhirnhaube, einmal in der Substantia nigra einseitig. Die restlichen 15 Tiere zeigten nur mesodermal-gliöse Alterationen. Bei 7 Tieren war die Substantia nigra einseitig befallen, wobei einmal die Veränderungen bis in die Pyramidenbahnareale reichten. Ein beidseitiger Befall der Substantia nigra wurde nicht beobachtet. Im zentralen Höhlengrau waren bei 3 Tieren Veränderungen nachweisbar. Die Vierhügelplatte war bei einem Affen, die Formatio reticularis bei 3 Tieren betroffen.

In der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zeigten insgesamt 25 Affen gewebliche Veränderungen im Mittelhirn.

Bei 8 Tieren bestand Nervenzelluntergang mit konsekutiver Gliazellproliferation, in 2 Fällen disseminiert in Mittelhirnhaube und -fuß, besonders im Nucleus oculomotorius, Nucleus troclearis und den Nuclei pontis. Bei einem weiteren Tier war die Substantia nigra beiderseits befallen, bei 4 Tieren einseitig und je einmal war außerdem der Nucleus oculomotorius und die Formatio reticularis befallen. Bei den übrigen 17 Affen bestanden nur mesodermal-gliöse Alterationen. Davon in 8 Fällen in der Substantia nigra einseitig, einmal mit zusätzlichen Veränderungen im Nucleus troclearis, einmal in der Formatio reticularis und einmal in den Nuclei pontis. Bei 3 Affen war die Substantia nigra beidseitig befallen, einmal auch das Pyramidenbahnareal einer Seite. Die Formatio reticularis war in 2 Fällen betroffen. Bei 2 Tieren fanden sich einseitig im Nucleus ruber gewebliche Veränderungen, jeweils verbunden mit Veränderungen in der Formatio reticularis, bzw. in der Mittelhirnhaube. Einmal wurden doppelseitige Veränderungen im Nucleus ruber beobachtet, einmal disseminierte Veränderungen in der Mittelhirnhaube.

Nach intrathalamischer Inokulation von unverdünntem Virus Typ III zeigten 7 Affen im Mittelhirn Nervenzelluntergang mit Gliazellreaktion bzw. mesodermal-gliöse Infiltrate.

1 Tier wies massiven beiderseitigen Befall von Substantia nigra, Nucleus troclearis und zentralem Höhlengrau auf. 2 andere Tiere zeigten beidseitige Veränderungen in der Substantia nigra, einmal auch entzündliche Alterationen in der

Formatio reticularis. Einseitiger Befall der Substantia nigra fand sich noch dreimal, und ein Tier zeigte Veränderungen lediglich im zentralen Höhlengrau.

In der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zeigten 3 Affen entzündliche Alterationen, jedoch bestand kein sicherer Nervenzelluntergang.

Einmal lagen Gefäß- und Gewebsinfiltrate im Nucleus trochlearis, in der Radix mesencephalica nervi trigemini und in der Substantia nigra einseitig vor. In zwei weiteren Fällen war die Substantia nigra beiderseits betroffen, einmal außerdem das zentrale Höhlengrau.

Es zeigte sich also, daß — im Gegensatz zur Auffassung von SABIN — praktisch alle Kerngebiete des Mittelhirns für attenuierte Polioviren empfindlich sind. Man muß daher versuchen, die Unterschiede in der Läsionsverteilung nach beiden Injektionsarten auf andere Weise zu deuten. So ist es vorstellbar, daß eine massive Virusausbreitung ausgelöst wird, wenn an der Injektionsstelle in der Thalamusregion oder in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft eine hochgradige Virusvermehrung stattfindet, mit der eine bestimmte Schwellenkonzentration überschritten wird. Für eine solche Annahme würde die in unseren Versuchen gemachte Beobachtung sprechen, daß nach intrathalamischer Injektion von Virus Typ I keine ausgesprochene Abhängigkeit der Läsionshäufigkeit von der Virusdosis festzustellen war.

Wir haben eingangs ausgeführt, daß nach intralumbaler, wie nach intrathalamischer Injektion attenuierter Polioviren aller drei Typen die relativen Häufigkeiten gewöhnlicher Alterationen im Mittelhirn ungefähr gleich groß sind. Die einzelnen Kerngebiete des Mittelhirns waren aber je nach Injektionstechnik in verschiedenem Maße befallen. Auf diese Befunde wollen wir näher eingehen.

Nach intralumbaler Injektion war der Nucleus ruber besonders oft befallen; es zeigten sich Alterationen bei 31 von 38 Affen, die unverdünntes Virus des attenuierten Typs II erhalten hatten. In der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  verursachte Typ II noch bei 12 von 33 Tieren Veränderungen im Nucleus ruber, in der Verdünnung  $10^{-2}$  bei 6 von 37 Tieren und in der Verdünnung  $10^{-3}$  nur noch bei einem von 37 Tieren. Entsprechendes gilt für den Virus Typ I nach intralumbaler Injektion. Bei gleicher Injektionstechnik bestanden außerdem vereinzelt entzündliche Veränderungen im zentralen Höhlengrau, im Nucleus oculomotorius, Nucleus trochlearis, in der Substantia nigra und in der Formatio reticularis.

Nach intrathalamischer Injektion der drei Typen attenuierter Polioviren des Sabin'schen Satzes war dagegen die Substantia nigra bevorzugt befallen; die Veränderungen im Nucleus ruber traten weit zurück. Daneben waren im Mittelhirn Nucleus oculomotorius, Nucleus trochlearis, das zentrale Höhlengrau, die Vierhügelplatte, die Radix mesencephalica nervi trigemini, die Formatio reticularis und die Nuclei pontis betroffen.

Diese Veränderungen traten jedenfalls gegenüber dem häufigen und ausgeprägten Befall der Substantia nigra in den Hintergrund.

Wir können also zusammenfassen, daß nach intralumbaler wie nach intrathalamischer Inokulation das Mittelhirn zwar je nach Virus in verschiedenem Maße, aber doch stets bevorzugt beteiligt ist. Die intralumbale Inoculation begünstigt den Befall des Nucleus ruber, die intrathalamische den Befall der Substantia nigra. Das Auftreten von Prädilektionsstellen in Abhängigkeit der Inoculationsstelle findet sich nur bei den von uns untersuchten attenuierten Polioviren des Sabinischen Satzes. Nach intralumbaler Injektion des neuropathogenen Poliovirus Typ III (Stamm Saukett) ließ sich kein bevorzugter Befall von bestimmten Mittelhirnteilen feststellen. Hier waren die geweblichen Veränderungen gleichmäßig auf die verschiedenen Regionen verteilt, Ruberkerne und Substantia nigra waren etwa gleich häufig befallen. Hinsichtlich der Verteilung geweblicher Alterationen im Mittelhirn nach intrathalamischer Injektion des Stammes Saukett liegen uns keine Erfahrungen vor.

Aus den geschilderten Eigentümlichkeiten der Läsionshäufigkeit und -verteilung nach intrathalamischer Injektion, ergeben sich für die Bewertung von Einzelversuchen erhebliche Schwierigkeiten. Die hier beschriebenen charakteristischen Ausbreitungsmuster der verschiedenen Virustypen werden zwar dann deutlich, wenn man ein großes Tiermaterial zusammenfassend bewerten kann; im Einzelversuch mit nur zehn Tieren pro Virusverdünnung wird jedoch infolge der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Einzeltiere eine erhebliche Schwankung sichtbar.

So haben wir beispielsweise unter 65 Affen, die intrathalamisch mit dem US-amerikanischen Bezugsvirus NIH-NA2 injiziert wurden, kein Tier mit einer Ausbreitung vom mittleren Schweregrad 2 oder darüber gefunden, während wir diese Stufe mit dem deutschen Bezugsvirus OP 2 bei 3 von 70 Tieren feststellten. In einem Wiederholungsversuch mit je 30 Tieren zeigte jedoch Virus NA2 in 2 Fällen schwere Ausbreitung, wogegen sie dieses Mal mit Virus OP2 nicht beobachtet wurde.

Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, daß das erstgenannte Versuchsergebnis trotz der relativ großen Tierzahl doch zufällig bedingt war. Aufgrund gleichartiger Erfahrungen hat das US-amerikanische Prüfinstitut die Anzahl der intrathalamisch zu injizierenden Tiere für jeden Impfstoff auf 30 erhöht und, um den Versuch nicht untragbar auszuweiten, den intralumbalen Versuchsteil entsprechend verkleinert.

Die schwankungsbedingte geringere Empfindlichkeit des intrathalamischen Affenversuchs, die sich darin äußert, daß wir bei Versuchen mit Virus Typ III nicht häufiger eine Überschreitung der doppelten Standardabweichung der mittleren Gruppenbewertungsziffern finden als bei Versuchen mit Typ I-Virus, ist unseres Erachtens nur Ausdruck eines allgemeinen biologischen Prinzips: Bei intralumbaler Injektion genügen offensichtlich geringere Virusmengen als bei intrathalamischer Injektion, um in einem bestimmten Prozentsatz aller Versuchstiere Läsionen hervorzurufen. Mit unserer Versuchsanordnung und den verwendeten Virus-

dosen, deren relativ enge Grenzen ja die in der Viruszüchtung erreichbaren Konzentrationen festlegen, befinden wir uns in bezug auf den intralumbalen Versuch im steilen Teil der S-förmigen Dosis-Wirkungskurve, in bezug auf den intrathalamischen Versuch dagegen im flach ansteigenden Anfangsteil dieser Kurve, wo wir mit einem großen, zufallsbedingten Meßfehler rechnen müssen. Außer durch drastische Erhöhung der Tierzahl, läßt sich diese Schwierigkeit wahrscheinlich nur durch eine starke Erhöhung der Virusdosis pro Tier umgehen.

### Zusammenfassung

Es wird die Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren nach intrathalamischer Inoculation unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den drei Typen des Sabin-schen Satzes von Impfviren beschrieben.

Aufgrund der Untersuchungen eines großen Tiermaterials können die histologischen Charakteristika dieser Viren erkannt werden. Sie unterscheiden sich durch Qualität der Läsionen und Ausbreitung des Prozesses. Im Einzelversuch mit Gruppen von nur zehn Tieren werden die Unterschiede infolge der großen individuellen Schwankung jedoch nicht im gleichen Maße deutlich und erscheinen dann zufallsbedingt.

### Literatur

- BONIN, O., u. F. UNTERHARNSCHEIDT: Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen. I. Mitteilung: Grundlagen, Technik und Bewertung des Versuchs zur Messung der Neurovirulenz für den Affen. Arch. Psychiat. Nervenkr. **206**, 260—271 (1964)
- — Numerical procedures for evaluation of live poliovirus vaccine neurovirulence tests. Symposium on neurovirulence tests in control of live, attenuated poliovirus vaccines, of the Istituto Sieroterapico Milanese. Milano, 13—14th May, 1965. In: *Bulletino*
- — R. MAULER, K. SCHMIDT, and I. SCHMIDT: Some quantitative aspects of monkey neurovirulence tests in control of live poliovirus vaccines. In: *Proceedings Symposium on the characteristic and uses of human diploid cell strains*, p. 501—515. Opatija 1963.
- SABIN, A. B.: Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *Brit. med. J.* **1959**, 603.
- UNTERHARNSCHEIDT, F., u. O. BONIN: Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen. II. Mitteilung: Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren nach intralumbaler Injektion, unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den Virustypen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **206**, 454—473 (1965)
- — Comparative studies using monkeys on the pathomorphology of various types of attenuated poliomyelitis viruses. Proceed. X. Symposium, Warschau, 1964 European Association Poliomyelitis and allied diseases. (Im Druck.)
- — Pathomorphology of attenuated and wild poliovirus strains. Symposium on neurovirulence tests in control of live poliovirus vaccines of the Istituto Sieroterapico Milanese. Milano, 13—14 May 1965. In: *Bulletino*.

12 UNTERHARNSCHEIDT et al.: Prüfung von Poliomyelitis-Lebendimpfstoffen. III

- UNTERHARNSCHEIDT, F., O. BONIN, O. GÜNTHER, L. HEBER, K. SCHMIDT, I. SCHMIDT  
u. A. VON METTENHEIM: Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebend-  
impfstoffen. IV. Mitteilung: Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch  
neuropathogenes Poliovirus Typ III (Stamm Saukett) nach intralumbaler  
Injektion, im Vergleich zu den attenuierten Poliovirusstämmen. Arch. Psychiat.  
Nervenkr. **208**, 13—23 (1966).
- J. SIMON, O. BONIN, O. GÜNTHER, K. SCHMIDT u. L. HEBER: Die Neurovirulenz  
eines neuen attenuierten Poliovirus Typ III (USOL-D) im Affenversuch. Natur-  
wissenschaften **52**, 502 (1965)
- — — — Untersuchungen über die Neurovirulenz des attenuierten Polio-  
virus Typ III (USOL-D) im Affenversuch. Arbeit. a. d. Paul Ehrlich-Institut  
(im Druck).

Prof. Dr. FRIEDRICH UNTERHARNSCHEIDT  
Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie  
(Max Planck-Institut)  
8 München 23, Kraepelinstraße 2