[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin]
(Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky)

Zur Biologie und Morphologie der Streptothrix Madurae.

Von

Prof. Dr. Jos. Koch, und Dr. Stutzer (Moskau).
Mitglied des Instituts.

Der Madurafuß oder das Mycetoma pedis ist bekanntlich eine im Orient öfter vorkommende chronische Erkrankung des Fußes, die durch eine Streptothrixart, Streptothrix Madurae, verursacht wird; viel seltener befällt die Erkrankung Hände und Kiefer. Der Name rührt von der Java gegenüberliegenden Insel Madura her, auf der die Erkrankung häufig beobachtet wird.

Nach Bockenheimer (1), der eine vorzügliche Abbildung eines Madurafußes wiedergibt, beginnt die chronische Erkrankung gewöhnlich mit einer wenig schmerzhaften Anschwellung der Fußsohle; im weiteren Verlaufe bilden sich dann zahlreiche, viel verzweigte Fisteln, die sich bis auf den Knochen verfolgen lassen. Durch die Granulations- und Schwielenbildungen, die mit Aktinomykose große Ähnlichkeit haben, werden Weichteile, Knochen und Gelenke zerstört. In dem dünnflüssigen, übelriechenden Eiter finden sich hellgelbliche und schwärzliche Pilzrasen, ähnlich wie bei der Strahlenpilzerkrankung. Je nach dem Aussehen der Pilzkörnchen unterscheidet man eine weiße, rote und schwarze Varietät.

Kulturen von Streptothrix Madurae hat zuerst Vincent im Jahre 1894 aus Geweben des Fußes eines Patienten mit „Madurafuß“ erhalten. Außer Vincent haben diese Streptothrix noch Babes, Petruschky, Boyce und Surveyor u. a. erforscht. Die Verschiedenheit der Angaben,

die wir in den Beschreibungen der *Streptothrix Madurae* bei den oben genannten Autoren finden, hat uns veranlaßt, eine Neuuntersuchung der Kulturen dieses Pilzes zu unternehmen. Hr. Dr. Avad hatte uns in liebenswürdiger Weise Glyzerinagarkulturen von *Streptothrix Madurae* im Januar 1911 aus Kairo gesandt. Die nachfolgenden Ausführungen beschränken sich auf das Verhalten dieses uns überlassenen Stammes.

Die Überimpfung auf verschiedene Nährböden hatte zuerst nicht ganz befriedigende Resultate ergeben. Auf den meisten Nährböden wurde zwar ein Wachstum erzielt, aber ein sehr langsames und meistens sehr spärliches. Es ist uns gelungen, die Ursache dieses Verhaltens festzustellen. Es zeigte sich nämlich, daß das Wachstumsoptimum der uns zur Verfügung stehenden *Streptothrix Madurae* nicht bei 37° C lag (Vincent), sondern bedeutend niedriger bei 16 bis 22° C. Bei den weiteren Untersuchungen wurden daher die Serien der Nährböden stets in zwei Hälften geteilt, wobei die eine Hälfte im Schrank bei Zimmertemperatur nicht über 22° C aufbewahrt wurde, während die andere Hälfte in den Brutschrank von 37° C kam.

Unsere Kulturen der *Streptothrix Madurae* weisen auf den verschiedenen Nährböden folgende Eigenschaften auf. Von den üblichen, in der bakteriologischen Praxis angewandten flüssigen Nährböden wird ein befriedigendes Wachstum bei einer Temperatur nicht über 22° C in Peptonwasser erhalten. Schon einige Tage nach der Impfung entwickeln sich einzelne Kolonien bis zum Durchmesser von 2 bis 3 mm. Allmählich vermehrt sich die Anzahl der Kolonien, besonders rasch bei täglichem stärkerem Umschütteln; nach 2 bis 3 Wochen bedecken sie mit dünner Schicht den ganzen Boden des Reagensglases oder des Erlenmeyerkölbchens. Ein Teil der Kolonien haftet an den Wänden des Gefäßes, ein anderer Teil entwickelt sich freischwebend. Die Dimensionen der Kolonien übersteigen nicht 3 bis 4 mm im Durchmesser. Ihre Gestalt ist halbkugelförmig bei den festsitzenden und nahezu kugelförmig bei den freiwachsenden. Sie sind von weißer Färbung, mit flockigen und halbdurchsichtigen strahligen Rändern.

Bei 37° C ist das Wachstum in Peptonwasser bedeutend geringer. In einigen der geimpften Kolben wurde bei 37° mit Peptonwasser überhaupt kein Wachstum erzielt.

Am meisten eignete sich zur Kultivierung unserer Kultur der *Streptothrix Madurae* Bouillon mit ungeronnenem Pferdeserum (1 Teil Serum auf 3 Teile Bouillon, d. h. der Nährboden, der im Laboratorium von J. Koch für Streptokokken angewandt wird). Bei Zimmertemperatur ist das Wachstum der *Streptothrix Madurae* auf diesem Nährboden mehr

als befriedigend. Nach 5 bis 7 Tagen schon erhält man eine üppige Kultur. Wenn das Gefäß mit der Kultur keinen Erschütterungen ausgesetzt wird, so bildet sich ein weißliches lockeres Häutchen, das sich leicht senkt und dessen Ränder an den Wänden des Gefäßes festhaften. Das Wachstum vollzieht sich sowohl auf der Oberfläche, als auch am Boden des Gefäßes. Der flockige Niederschlag ist dabei bedeutend lockerer und reichlicher als im Peptonwasser.

Von Interesse ist, daß auf demselben Nährboden bei 37° gar kein Wachstum stattfindet. Die geimpften Flocken der *Streptothrix Madurae* weisen nicht nur keine Entwicklung auf, sondern werden sogar kleiner und zerfallen.

In Bouillon wächst *Streptothrix Madurae* am Boden und an den Wänden des Gefäßes. Der Charakter der Kolonien ist dem in Peptonwasser ähnlich, das Wachstum ist hier aber geringer.

Das Hinzufügen von 1 bis 2 Prozent Traubenzucker verbessert die Entwicklungsbedingungen des Pilzes nicht. Bemerkt sei nur, daß es manchmal gelingt, in Bouillon mit Traubenzucker einzelne sehr große, weiche und flockige Kolonien von halbkugelförmiger Gestalt zu erhalten.

In Milch wächst *Streptothrix Madurae* am Boden des Reagensglases gut. Die Milch gerinnt nach 2 bis 3 Tagen, aber das Kaseingerinnsel verflüssigt sich allmählich, so daß nach Verlauf von ungefähr 4 bis 6 Wochen der Nährboden durchsichtig wird.

Die Lackmusmolke (Petruschky) verändert ihre Farbe nicht. Das Wachstum geschieht am Boden in Form eines flockigen Niederschlages. Eine Temperatur über 22° hemmt das Wachstum.

Barsiekows Nährböden mit Trauben- und Milchzucker werden nicht verändert.

Auf Grund des Verhaltens unserer Kultur der *Streptothrix Madurae* zu den oben erwähnten Nährböden darf man schließen, daß der untersuchte Stamm ein peptonisierendes Ferment ausscheidet, das Milchkasein auflöst. Alle übrigen biologischen Merkmale sind negativer Natur: Trauben- und Milchzucker werden nicht zersetzt, reduzierende Eigenschaften sind nicht vorhanden, Säuren oder Basen werden nicht abgeschieden.

Auf festen Nährböden entwickelt sich *Streptothrix Madurae* bei 16 bis 22° C bedeutend schneller und üppiger als bei 37°. Von den festen Nährböden ergibt das beste Wachstum geronnenes, defibriertes Pferdeblut. Nach 5 bis 6 Tagen erhält man eine gut entwickelte Kultur, die weit schneller wächst als die Kulturen auf Glycerin oder auf einfachem Agar.

Alle Nährböden haben folgende Eigenschaften der *Streptothrix Madurae*-Kultur gemeinsam. Das Wachstum ist von mittlerer Geschwindigkeit.

Gut entwickelte Kulturen erhält man bei günstigen Bedingungen (Nährboden und Temperatur) nach 5 bis 10 Tagen. Die Kolonien, die isoliert auf der Oberfläche liegen, haben die Form von weißen, später leicht gebräunten Kreisen, die fest am Nährboden haften. Man kann sie nur entfernen, indem man eine Schicht des Nährbodens mitnimmt. Sie erscheinen wie eingedrückt in die Oberfläche des Nährbodens. Die nahe aneinander liegenden Kolonien verschmelzen zu einer ununterbrochenen festen Membran von wellenförmiger und glänzender Oberfläche. Die alten Kulturen nehmen eine bräunliche Färbung an. Ihre Oberfläche wird matt.

Auf einem Nährboden, der aus $\frac{1}{3}$ defibriniertem Pferdeblut und $\frac{2}{3}$ Nähragar besteht, entwickelt sich unsere Kultur fast ebenso gut und rasch als auf geronnenem Pferdeblut. Nach der Ansicht einzelner Autoren eignet sich geronnenes Blutserum für die Kultivierung von *Streptothrix Madurae* nicht, da darin kein Wachstum erreicht wird. Indes entwickelt sich die zu unserer Verfügung stehende Kultur auf dem Serum durchaus befriedigend; dabei löst sie das Serum nach und nach auf. Der Peptonisierungsprozeß geht rascher bei 37° vor sich und vollzieht sich langsamer bei 16 bis 22°.

Das Wachstum der *Streptothrix Madurae* wird durch gesteigerte Alkaleszenz des Nährbodens besonders begünstigt. Stark alkalischer Agar, wie er für die Kultur von *Cholera*vibrionen angewandt wird, ist zugleich ein vorzüglicher Nährboden für *Streptothrix Madurae*. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf diesem Agar tritt hinter dem Wachstum auf geronnenem Pferdeblut nicht zurück.

Glyzerinagar ist für Kultivierung von *Streptothrix Madurae* geeignet, steht aber hinter dem obengenannten Nährboden bedeutend zurück.

Das Hinzufügen von Aszitesflüssigkeit zum Agar fördert einigermassen das Wachstum von *Streptothrix Madurae*, die Kulturen bleiben jedoch dabei zart und entwickeln sich verhältnismäßig schwach.

Gewöhnlicher Nähragar ist für diesen Pilz relativ wenig brauchbar. *Streptothrix Madurae* wächst zwar darauf, aber nur sehr schwach und langsam im Vergleich mit den obengenannten Nährböden. Das Hinzufügen von Traubenzucker verringert noch mehr seine Brauchbarkeit.

Das Wachstum auf Kartoffel ist langsam.

Gelatine wird sehr langsam verflüssigt. Zuerst bildet sich ein Trichter, dann entsteht oben eine ganze Schicht peptonisierter Gelatine. Die flockige Kultur der *Streptothrix Madurae* befindet sich an der Grenze zwischen dem flüssigen und dem festen Nährboden. Die Fähigkeit der *Streptothrix Madurae*, Gelatine zu verflüssigen, wurde auch von Petruschky beobachtet. Vincent verneint jedoch diese Eigenschaft.

Die beschriebenen Beobachtungen ermöglichen folgende Schlüsse:

1. Das Wachstumsoptimum unseres Stammes der *Streptothrix Madurae* liegt zwischen 16 bis 22° C.
2. Von den flüssigen Nährböden sind für die Kultivierung des Pilzes am geeignetsten Bouillon mit Blutserum und Peptonwasser.
3. Von den festen Nährböden ergibt das beste Wachstum geronnenes defibriniertes Pferdeblut, Pferdeblutagar und stark alkalischer Agar.

Fig. 1.

1000fache Vergrößerung. Verästelte Mycelfäden einer 24 Tage alten Kultur aus dem Kondenswasser eines Löfflerserumröhrchens. Einzelne Fäden zeigen Zerfall in sporenähnliche Elemente, sind aber wohl absterbende Fasern, deren chromatinreichere Stellen den Farbstoff festgehalten haben. Grampräparat.
Nach einem Mikrophotogramm vom Hrn. Prof. Zettnow.

4. Bei der Kultur der *Streptothrix Madurae* bildet sich ein peptonisierendes Ferment, das Milchkasein, Gelatine und geronnenes Pferdeserum auflöst.

Morphologie. Die Kultur der *Streptothrix Madurae* stellt ein Mycel dar, das aus sehr feinen Fäden mit einem Durchmesser von höchstens 0.3 bis 0.5 mm besteht. Ein kleiner Pilzrasen zeigt ein Geflecht feiner

verästelter Fäden, die im Centrum einen unentwirrbaren Knäuel mit lockerem Rande bilden. Die Fasern der *Streptothrix* weisen echte Verzweigungen auf, die senkrecht zu den Mutterfäden verlaufen. Der senkrechte Abgang der Verzweigungen wird nur bei den jungen Mycelien beobachtet; in den alten Mycelien geht er verloren. Die Fasern der *Streptothrix Madurae* zerfallen an vielen Stellen in Gebilde (s. Fig. 1), die eine runde oder ovale Form haben. Ihr Querschnitt übertrifft gewöhnlich nicht den Durchmesser der Faser selbst.

Fig. 2.

Aus einer 4 Wochen alten Kultur auf stark alkalischem Agar. Fäden und stäbchenartige Pilzelemente von verschiedener Länge. Färbung nach Gram.

Nach einem Mikrophotogramm vom Hrn. Prof. Zettnow.

Man könnte bei erster Betrachtung geneigt sein, sie für Sporen zu halten, doch spricht nach unserer Ansicht dagegen, daß in den Kulturen von flüssigen und festen Nährböden stark lichtbrechende Gebilde, die man für Sporen des Pilzes halten könnte, nicht zu finden sind; auch bei der Betrachtung der Fäden im hängenden Tropfen ist nichts zu sehen, was man als Sporen deuten könnte. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hier um absterbende Fäden, deren chromatinreichere Stellen den Farbstoff

festhalten, während die anderen Teile sich bereits entfärbt haben. Die Fäden des Mycels in den Kulturen sind im allgemeinen von gleichmäßiger Dicke und bilden keine stärkeren Verdickungen an den Enden oder Anschwellungen in ihrem Verlauf, wie sie Vincent an den Drusen der *Streptothrix Madurae* im erkrankten Gewebe beschrieben hat.

Zu den charakteristischen Merkmalen unserer Kultur scheint eine ungewöhnliche Zähigkeit und Festigkeit ihrer Fasern zu gehören. Auf festen Nährböden bildet der Pilz ein dichtes Mycel von lederartiger Konsistenz; um ein gutes Ausstrichpräparat von einer Kultur zu erhalten, muß man sie zwischen zwei Objektträgern energisch zerdrücken, aber trotzdem bleibt der größte Teil der Fasern intakt. An Kulturen, die auf stark alkalischem, auf Pferdeblut- und Glycerinagar gezüchtet waren, beobachteten wir jedoch außer den typischen verästelten langen Mycelfäden auch noch bazillenähnliche, kürzere und längere Pilzelemente, die an die stäbchenförmigen diphtheroiden Formen des *Aktinomyces* pilzes erinnern (s. Fig. 2).

Streptothrix Madurae wird gefärbt nach Gram.

Der Farbstoff wird sehr gut festgehalten, so daß man bei einem genügenden Grade von Differenzierung Präparate erhält, die nichts zu wünschen übrig lassen.

Ziehls verdünntes Fuchsin färbt die Fäden gut. Alle übrigen Farbstoffe ergeben Resultate, die hinter Gram zurückbleiben.

Für Versuchstiere (Warmblüter) erwiesen sich unsere Kulturen der *Streptothrix Madurae* als nicht pathogen. Wir infizierten Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen subkutan, intraperitoneal und intravenös. Ein Teil der Tiere ging allerdings ein (Giftwirkung?), aber Obduktion und mikroskopische Untersuchung haben keine krankhaften Veränderungen infolge *Streptothrix*infektion feststellen können. Dieser negative Befund stimmt mit den Versuchsergebnissen von Vincent, Nocard, Babes u. a. überein.

Da sich ein wachstumhemmender Einfluß der Temperatur von 37° auf die *Streptothrix Madurae* feststellen ließ, entstand die Frage, ob nicht Kaltblüter empfindlicher für die Infektion waren. In der Tat kann bei subkutaner Impfung von Fröschen ein pathologischer Prozeß hervorgerufen werden. Wurde die Impfung in den Schenkel vorgenommen, so entstand daselbst eine bedeutende Anschwellung. Die Erkrankung verläuft sehr langsam. Zurzeit sind diese Versuche noch nicht abgeschlossen. Von den geimpften vier Fröschen starb nach 3 Wochen einer, bei den anderen besteht der Tumor im Schenkel weiter. Bei der mikroskopischen Untersuchung des toten Frosches fand sich folgendes: im Unterhautzellgewebe des Fußes sind zahlreiche Mycelrasen zu sehen, die durchaus das Bild

von Drusen darbieten, aber keine kolbigen Verdickungen der strahlig angeordneten Pilzfäden der Peripherie aufweisen. Zahlreiche Mycelfäden liegen auch isoliert und durchsetzen in geringer Entfernung vom Hauptherde das intermuskuläre Bindegewebe. Der erkrankte Abschnitt des Unterhautzellgewebes ist reichlich mit Leukozyten infiltriert. In der umgebenden Muskulatur finden sich Hämorrhagien. Die inneren Organe sind vollkommen normal. Die Erkrankung zeigt bis jetzt also einen rein lokalen Charakter.

Literatur.

- Bockenheimer, *Archiv f. klin. Chirurgie*. Bd. XC. — Kanthak, Madurafuss. *Transactions of Patholog. Society*. London 1892. — Gemy et Vincent, *Soc. française de dermatologie et de syphilographie*. 1892. — H. Vincent, Étude sur le parasite du „pied de Madura“. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1894. T. VIII. Nr. 3. — J. Petruschky, Die pathogenen Trichomyceten. *Handbuch* von Kolle und Wassermann. Bd. II. S. 839. — V. Babes, Der Madurafuß. *Ebenda*. Bd. III. S. 454.
-