III. Aus dem Institut für experimentelle Therapie
in Frankfurt a. M.

(Direktor: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. Ehrlich.)

Ueber die Symbiose des Influenzabacillus.

Von Prof. M. Neisser.

Unsere Kenntnisse über die Symbiose der Bakterien sind noch nicht sehr ausgedehnt; das was an experimentellen Arbeiten darüber vorliegt, hat E. Gotschlich in dem Kolle-Wassermann'schen Handbuch zusammengestellt. Die wichtigsten, hier wesentlich in Betracht kommenden Fakta stammen bekanntlich von Frosch¹⁾, welcher Amöben nur bei Anwesenheit lebender Bakterien züchten konnte, und von Cantani jun.²⁾, welcher Influenzabazillen auf gewöhnlichem Agar bei Zusatz von lebenden oder toten Bakterien anderer Spezies zu züchten vermochte. Die letztere Thatsache, welche sich den interessanten Beobachtungen Grassberger's³⁾ und Meunier's⁴⁾ über Riesenkolonien von Influenza in der Nach-

¹⁾ Centralblatt für Bakteriologie 1897, 1. Abtheilung, Bd. XXI.

²⁾ Zeitschrift für Hygiene 1901, Bd. XXXVI. — Centralblatt für Bakteriologie, 1. Abtheilung, Bd. XXVIII und XXXII.

³⁾ Zeitschrift für Hygiene 1897, Bd. XXV.

⁴⁾ ref. Baumgarten, Jahresbericht 1898.

barschaft von Staphylococcenkolonien anreichte, ist von Ghon und v. Preyss¹⁾ nachgeprüft und zuletzt von Luerssen²⁾ in einer unter R. Pfeiffer's Leitung entstandenen Dissertation von neuem bestätigt worden.

Schon seit längerer Zeit mit der Bakteriologie der Influenzagruppe beschäftigt, habe ich auf Grund eines zufälligen Befundes auch die Frage der Symbiose seit Monaten bearbeitet. Ich fand bei Züchtung aus einer Masern-Conjunktivitis auf Blutagar neben Xerosebazillen-Kolonien auch Kolonien von Pfeiffer'schen Influenzabazillen, — oder wenigstens von Bazillen, die durch ihr gesamtes morphologisches und kulturelles Verhalten von den Influenzabazillen nicht zu unterscheiden waren. Während nun die Xerosekolonien am ersten und zweiten Tage rund erschienen, zeigten sie am vierten Tage einen etwas unregelmässigen, wie angefressenen Rand. Versuche, welche daraufhin mit künstlichen Mischungen der entsprechenden Reinkulturen angestellt wurden, ergaben dasselbe Resultat. Besonders deutlich waren diese Versuche bei Anlegung kreuzweiser Striche beider Kulturen auf gewöhnlichen Agarplatten. Man sieht dann am ersten, besser am zweiten Tage, im Innern der Xerosekolonien, gewöhnlich randwärts, kleinste Influenzabazillen, welche im Laufe der Tage an Grösse und Zahl zunehmen. Es gelang mir, eine isolierte Mischkolonie abzusteichen und auf gewöhnlichem Agar fortzuzüchten. Und darin sehe ich eine wesentliche Erweiterung der bisher vorliegenden Versuche, dass mir die Kultivierung der Influenzabazillen auf gewöhnlichem Agar in Gemeinschaft mit diesem Xerosestamm durch 20 Generationen hindurch, also dauernd geglückt ist. Aus den bisher über die Symbiose des Influenzabacillus vorliegenden Arbeiten geht nur ein Wachstum der Influenzabazillen bei der ersten Ueberimpfung hervor. Erst die dauernde Ueberimpfbarkeit beweist aber, welche wichtige Rolle der Symbiose dauernd zukommen kann. Allerdings ist zu dem Symbioseversuch der Xerosestamm deswegen besonders geeignet, weil er auf Agar nicht besonders üppig wächst und somit, — im Gegensatz z. B. zu den Staphylococcen — die Influenzabazillen nicht mechanisch überwuchert. Die Kontrolle, ob auf dem gewöhnlichen Agar noch beide Bakterienarten vorhanden sind, machte ich durch Abimpfung einer kleinen Menge jeder einzelnen Agargeneration auf Blutagar; denn auf dem Blutagar erkennt man häufig schon mit der Lupe die different aussehenden Kolonien der beiden Bakterienarten. Ausserdem wurden stets Präparate vom Blutagar angefertigt und nach der Gram'schen Methode (Influenza negativ, Xerose positiv) gefärbt.

Der Einwand war natürlich naheliegend, dass allmählich vielleicht eine Anpassung der Influenzabazillen an den gewöhnlichen Agar erfolgt wäre, sodass für das weitere Agarwachstum die Anwesenheit der Xerosebazillen überhaupt nicht mehr nöthig sei. Ich habe deshalb aus der vierten und achten Generation der Agarmischkultur den Influenzabazillenstamm durch Ueberimpfung auf Blutagar, auf dem die Influenzabazillen ungleich reichlicher wachsen, als die Xerosebazillen, mit Leichtigkeit wieder rein züchten können. Aber die so wieder rein gezüchteten Influenzabazillen verhielten sich genau so wie der ursprüngliche Stamm, indem sie auf gewöhnlichem Agar nicht wuchsen. Man muss allerdings in der Beurtheilung des Agarwachstums vorsichtig sein, da häufig auf der ersten Agarpassage Influenzabazillen scheinbar ohne Blut wachsen; allerdings nur scheinbar, denn es handelt sich dann gewöhnlich um mitübertragene Blutspuren, welche zur Conservierung oder selbst zu schwachem Wachstum der Influenzabazillen genügen. Erst die dritte oder vierte Agargeneration ist für ein Wachstum beweisend.

Der nächste Einwand, dass dieses Agarwachstum in Gemeinschaft mit der Xerose eine zufällige Eigenschaft meines Masern-Influenzastammes sei, liess sich leicht widerlegen. Ich verfügte über zwei von mir aus Influenzafällen rein gezüchtete Influenzabazillenstämme, ferner über vier Influenzabazillenstämme, welche ich der Freundlichkeit des Herrn Dr. Czaplowski (Köln) verdanke. Ausserdem aber besass ich sieben influenzaähnliche Stämme, welche ich aus Sputum, Lungensaft und Liquor cerebri von fünf typischen Keuchhustenfällen und zwei Keuchhustenteichen isoliert hatte; ferner verfügte ich ausser dem eingangs erwähnten, von einer Masernconjunktivitis stammenden influenzaähnlichen Stamm über einen influenzaähnlichen Stamm, der aus

Herzblut einer Masernleiche, sowie über zwei solche Stämme, welche ich aus der Conjunktiva von Masernkranken gezüchtet hatte, und schliesslich über einen solchen Stamm, den ich aus dem Rachensekret eines Scharlachkranken kultiviert hatte.¹⁾

Mit fast allen diesen Stämmen habe ich die Symbioseversuche angestellt und alle geprüften Stämme in Gemeinschaft mit dem Xerosestamm durch viele, häufig 15 und mehr Generationen auf gewöhnlichem Agar gezüchtet, ohne irgendwelche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu sehen.

Ich bemerke übrigens ausdrücklich, dass die Agarmischkulturen nicht auf den ersten Blick als Mischkulturen auffallen, dass selbst ein einfaches Fuchsinpräparat von der Agarmischkultur nicht immer beide Mikroben sehr deutlich zeigt. Es genügt aber ein nach Gram doppelt gefärbtes Präparat oder aber ein Ausstrich auf Blutagar, um zu zeigen, wie ausserordentlich reichlich die Influenzabazillen in einer solchen Mischkultur vorhanden sind. Im Verlaufe der Untersuchungen wurden zahlreiche Versuche mit anderen Nährböden angestellt (z. B. Bouillon, in der man auch symbiotisches Wachstum erzielen kann), besonders eingehende Versuche betrafen ferner die Verwendung abgetödteter Xeroseleiber (60° und 100°), von Xerosebazilleneextrakten, von wässrigen Aufschwemmungen lebender Xerosebazillenaufschwemmungen, von getrockneten Xeroseleibern. Das Resultat dieser vielfältigen Versuche war ein negatives; ich erzielte wohl hier und da Wachstum bis zur dritten oder vierten Generation, aber ein derartig reichliches, dauerndes Wachstum der Influenzabazillen, wie es mit den lebenden Xerosebazillen so leicht zu erzielen ist, gelingt durchaus nicht. Es scheint mir deshalb, als ob es weniger die Leibessubstanz der Xerose, als vielmehr die Wirkung des Wachstums der Xerosebazillen ist, welche — vielleicht durch besondere fermentative Assimilierung der Nährstoffe des Nährbodens — für die Symbiose nothwendig ist.

Erwähnen möchte ich noch, dass die Influenzabazillen in den Mischkulturen recht lange haltbar sind. Die Kulturen wurden zwar gewöhnlich täglich oder alle zwei Tage überimpft, aber auch nach 10, 16 und einmal nach 20 Tagen waren in einer solchen Mischkultur, welche dauernd im Brutschrank gehalten war, noch lebende Influenzabazillen nachweisbar.

Zahlreiche Versuche wurden ferner angestellt, um zu sehen, ob die Mischkulturen infektiöse, giftige oder fermentative Eigenschaften hätten, welche den einzelnen Reinkulturen abgehen. Auch diese Versuche waren resultatlos.

Schliesslich seien einige Versuche erwähnt, welche mit dem Diphtheriebacillus an Stelle des Xerosebacillus angestellt wurden. Auch die Diphtheriebazillen können als „Ammen“ für den Influenzabacillus fungiren. Aber der von mir benutzte Xerosestamm ist unzweifelhaft geeigneter. Erwähnt sei noch zur Bestätigung und Erweiterung der Versuche von Cantani jun., dass auch der Gonococcus in Gemeinschaft mit dem Xerosestamm auf gewöhnlichem Agar leicht und dauernd gezüchtet werden kann. Ebenso wurden Versuche mit dem Tuberkelbacillus gemacht, welche noch nicht völlig abgeschlossen sind. Auch beim Tuberkelbacillus scheint, wie ebenfalls Cantani feststellte, mittelst Symbiose ein Wachstum auf gewöhnlichem Nährboden möglich zu sein. Ob aber Tuberkelbazillen-Mischkulturen dauernd auf gewöhnlichen Nährböden gezüchtet werden können, vermag ich noch nicht mit Sicherheit zu sagen.

Die geschilderten Versuche sind in mancherlei Beziehung interessant. Einmal mahnen sie wieder daran, mit der Constatirung von „Reinkulturen“ auf Grund des Abstechens vereinzelter Kolonien gelegentlich vorsichtig zu sein. Es ist ja aus der bakteriologischen Litteratur zur Genüge bekannt, dass gelegentlich die Isolirung eines Bacteriums dadurch auf Schwierigkeiten stossen kann, dass die Ausgangskolonie aus zwei Bakterienarten besteht,

¹⁾ Dieses besonders reichliche Material hatte ich mir zum Studium der Frage der „Keuchhustenbazillen“ mit vieler Mühe rein gezüchtet. Es ist mir aber bisher nicht gelungen, irgendwelche constanten Unterschiede in der Morphologie, Biologie, im kulturellen Verhalten oder bei Anwendung von immunisatorischen Methoden zwischen allen diesen Influenzabazillen und Influenzabazillen-ähnlichen Stämmen zu finden. Auf die Deutung dieses schon vielfach bisher constatirten (siehe Litteratur am Schluss), in vieler Beziehung interessanten Befundes werde ich an anderer Stelle eingehen. Das frische Material für diese Untersuchungen verdanke ich einer Anzahl hiesiger Aerzte, die mich in jeder Weise unterstützt haben. Zu besonderem Danke bin ich dem Assistenten der inneren Abtheilung des hiesigen städtischen Krankenhauses (Oberarzt Prof. v. Noorden), Herrn Dr. Henius für seine Unterstützung verpflichtet.

¹⁾ Centralblatt für Bakteriologie 1902, Bd. XXXII.

²⁾ Inauguraldissertation, Königsberg 1903.

welche auch bei den ersten weiteren Uebertragungen schwer zu trennen sind. Es gilt dies zumal für Kolonien auf Ausstrichplatten; solange die symbiotisch wachsenden Bakterien durch morphologische oder kulturelle Merkmale sehr verschieden sind, wird die Mischkultur als solche leicht erkannt und einem erneuten Versuch der Trennung unterworfen werden. Wenn die zusammen wachsenden Bakterien aber nicht leicht zu unterscheiden sind, werden Mischkulturen (z. B. Diphtherie-Pseudodiphtherie, Typhus-Coli) fortgezüchtet werden, deren Charaktere sich von dem Typus der vermeintlichen Reinkultur mehr oder weniger weit entfernen (z. B. Gährung).

Des weiteren ist es auf Grund der beschriebenen fortgesetzten symbiotischen Züchtungen durchaus denkbar, dass Bakterien, deren Kultivierung auf unseren bisherigen Nährböden überhaupt nicht gelingt, bei Züchtung in Symbiose mit einem anderen Bakterium zum dauernden Wachstum auf unseren Nährböden zu bringen ist. Es wäre hier z. B. an den Leprabacillus oder an den Ducrey'schen Ulcus molle-Bacillus — dessen Kultivierung ja immer noch schwierig ist — zu denken.

Und schliesslich brauchte der Mikrobe, dessen Kultivierung mittelst der Ammenzüchtung angestrebt wird, an sich gar nicht einmal mikroskopisch sichtbar zu sein. Seine Anwesenheit könnte sich z. B. nur durch mikroskopisch sichtbares Auftreten von Kolonien innerhalb der Ammenkolonien oder aber durch die abweichende und spezifisch pathogene Eigenschaft der (scheinbar reinen) Ammenkultur dokumentieren. Manche Thatsachen von besonderen Eigenthümlichkeiten einiger banaler Bakterien (Scharlachstreptococcen, Vaccinestaphylococcen) lassen an die Möglichkeit eines symbiotischen Wachstums von unsichtbaren Bakterien mit gewöhnlicheren Bakterienarten denken. In jedem Falle fordern die von Frosch und Cantani inaugurierten, von uns lediglich erweiterten Experimente direkt zu Versuchen in der ange deuteten Richtung auf, die natürlich auch von uns bereits in Angriff genommen sind.

Litteratur.

Meunier, Referat, Archiv für Kinderheilkunde Bd. XXVIII, (betreffend Bronchopneumonien der Kinder). — J. B. Spengler, Deutsche medizinische Wochenschrift 1897. — Elmassian, Annales de l'institut Pasteur 1899. — Luzatto, Centralblatt für Bakteriologie 1900. — G. Jochmann und P. Krause, Zeitschrift für Hygiene 1901, und Centralblatt für Bakteriologie 1902, Bd. XXXII, S. 21, Jochmann und Moltrecht, Centralblatt für Bakteriologie 1903, Bd. XXXIV, No. 1. — Süsswein, Wiener klinische Wochenschrift 1901, No. 47. — Giarrè e Piechi, ref. Archiv für Kinderheilkunde 1902, Bd. XXXIV. — Hiarri, ref. Jahrbuch für Kinderheilkunde 1902, Bd. LV. — Pacchioni, Rivista di Clinica Pediat. 1902/1903, S. 138. — Jehle (siehe Kretz, Anwendung der Bakteriologie Hölder 1903, S. 94).