DEUTSCHE MEDICINISCHE WOCHENSCHRIFT.

Mit Berücksichtigung des deutschen Medicinalwesens nach amtlichen Mittheilungen, der öffentlichen Gesundheitspflege und der Interessen des ärztlichen Standes.

Begründet von Dr. Paul Börner.

Achtzehnter Jahrgang.

Redacteur Geh. Sanitäts-Rath Dr. S. Guttman in Berlin W.

Verlag von Georg Thieme, Leipzig-Berlin.

I. Aus dem Institut für Infektionskrankheiten.

Weitere Mittheilungen über den Erreger der Influenza.¹⁾

Von Dr. R. Pfeiffer, Vorsteher der wissenschaftlichen Abtheilung, und Dr. M. Beck, Assistenten des Institutes.

Ungefähr 4 Monate sind verflossen, seit ich die Ehre hatte, Ihnen die ersten vorläufigen Mittheilungen über den Erreger der Influenza zu machen. Inzwischen ist, wie es scheint, die Influenzaepidemie auch in ihren letzten Ausläufern erloschen. Da somit die Gelegenheit zur Fortsetzung der Untersuchungen fehlt, so dürfte der Zeitpunkt gekommen sein, gewissermaassen die Summe unserer über ein halbes Jahr sich erstreckenden Studien zu ziehen. Eine definitive Darstellung derselben, welche ich in Gemeinschaft mit Dr. Beck vorbereite, wird baldmöglichst in der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten erscheinen.

Wenn ich meinen jetzigen Standpunkt in der Influenzafrage mit dem in meiner vorläufigen Mittheilung vertretenen vergleiche, so hatte ich die Freude, meine damals geäußerten Anschauungen über die Aetiologie der Influenza im weiteren Verlauf der Epidemie durchweg bestätigt zu finden. Ich kann mich daher auf diese erste Veröffentlichung, die ich als bekannt voraussetze, berufen und werde mich auf die genauere Darstellung derjenigen Untersuchungsergebnisse beschränken, welche damals nur gestreift wurden oder neu hinzutreten sind.

So möchte ich zunächst einige Worte über den Nachweis der Influenzabacillen sprechen. Die Hauptfundquelle dieser Mikroorganismen ist bekanntlich während des Krankheitsverlaufes der Auswurf der Grippekranken. Selbstverständlich darf nur ganz frisch expectorirtes, in sterilen Schälchen ohne Wasser aufgefangenes Sputum, besonders das Morgensputum, Verwendung finden. Das Sputum ist aber auch unter diesen Umständen kein einheitliches Product. Gewisse Antheile desselben entstammen der Mund- und Rachenhöhle, andere wieder sind aus der Tiefe der Bronchien hervorgefördert. Wir legen einen grossen Werth darauf, dass vorwiegend das Bronchialsecret untersucht wird. Im Munde und im Rachen aller auch ganz gesunder Personen findet sich ein solcher Wirrwarr der verschiedensten Bacterienarten, dass es nur dem völlig geübten Beobachter möglich ist, sich zu orientiren. Im Bronchialsecret liegen die Verhältnisse sehr viel einfacher und übersichtlicher. Bei der Influenza ist das der Tiefe entstammende Sputum von grünlich-gelber, eigenthümlich zäher Beschaffenheit. Mit einiger Vorsicht gelingt es sehr leicht, derartige Sputumpartikelchen von allen anderen Beimengungen frei zu erhalten. Man verstreicht dieselben mit dem Platindraht unter möglichster Schonung der zelligen Elemente auf Deckgläschen, erhitzt die lufttrockenen Präparate nur mässig und färbt 10 Minuten in einer 10–20 mal mit destillirtem Wasser verdünnten Ziehl'schen Lösung. — Eine ganz ähnliche Tinctionsmethode führt auch bei Schnittpreparaten von Influenzalungen zum Ziel. Die möglichst feinen Celloidinschnitte kommen 10–30 Minuten in die verdünnte Carbofuchsinlösung und werden dann in Alcohol absolutus, der ganz schwach mit Essigsäure angesäuert ist, übertragen. Hier verlieren sie rasch ihren Farbstoff, man muss daher den Vorgang der Entfärbung gut überwachen, was bei einiger Uebung auch leicht gelingt. Aufhellung in Xylol, Balsam. Man erhält so Präparate von distincter und doch kräftiger

Färbung, wie sie sich nach anderen Methoden kaum mit gleich geringer Mühwaltung erhalten lassen.

In den auf diese Weise hergestellten Sputumpräparaten sieht man in frischen Fällen von uncomplicirter Influenza regelmässig ganz enorme Mengen der von mir beschriebenen Stäbchen, die theils frei im Schleim, theils auch im Protoplasma der Eiterzellen um den Kern herum gelagert sind. Wir werden späterhin auf diesen Punkt nochmals zurückzukommen haben.

In ihrem morphologischen Verhalten erinnern die Influenzastäbchen auffällig an die Bacillen der Mäusesepicämie, die gleichfalls mit Vorliebe im Innern von Leukocyten gefunden werden. Nur sind sie gewöhnlich kürzer und auch schlanker als die letzteren. Mit den Fraenkel'schen Diplobacillen können sie nur von recht ungeübten Bacteriologen verwechselt werden. Zudem fehlt ihnen die sogenannte Kapsel, und sie sind der Gram'schen Doppelfärbung nicht zugänglich. Die Grösse der Bacillen schwankt im Sputum nicht unerheblich, es sind dies jedoch Differenzen, wie sie in gleichem Grade auch bei vielen anderen Bacterienarten bemerkbar sind.

Sehr charakteristisch ist das pathologisch-anatomische Bild der Lungen bei an typischer Influenzapneumonie Verstorbenen. Man findet keine gleichmässige Hepatisation, sondern mehr weniger zahlreiche bronchopneumonische Herde von recht verschiedenem Umfange, die zum Theil confluiren können, und die meist im Unterlappen gelegen sind. Im Centrum solcher bronchopneumonischer Partien sieht man häufig auf Durchschnitten Bronchialäste, aus welchen bei Druck ein gelbgrünliches, eitriges, zähes Secret hervorquillt, das makroskopisch ganz so aussieht, wie die oben beschriebenen, als Bronchialsecret angesprochenen Sputumpartien. Bei mikroskopischer Untersuchung erweisen sich diese Pfröpfe zusammengesetzt aus Eiterzellen, die in zähem Schleim eingebettet sind, und man sieht darin, theils frei, theils in Zellen, die typischen Influenzabacillen in oft colossalen Mengen und gewöhnlich in Reincultur. Es ist damit bewiesen, dass die Bildungsstätte des Influenzasputums zum Theil wenigstens in den feineren Verzweigungen des Bronchialbaumes gelegen ist. Wir werden sofort sehen, dass auch das Lungenparenchym sich bei der Production des Influenzaeiters betheiligen kann.

Auf mikroskopischen Schnitten durch die infiltrirten Lungenpartien fallen schon bei der ersten Durchmusterung die Bronchien auf, die fast alle mit Rundzellen vollgestopft sind. Der Epithelbelag ist dabei meistens gut erhalten, doch sieht man hin und wieder die Leukocyten die Flimmerepithelien gleichsam zur Seite drängen oder streckenweise auch ganz von ihrer Unterlage abheben. Bei stärkeren Vergrösserungen gewahrt man in den das Lumen der Bronchien füllenden Eiterzellen grosse Mengen von unverkennbaren Influenzabacillen. Letztere liegen häufchenweise auch frei, besonders an und zwischen den Epithelien. Man kann gelegentlich ganze Züge der feinen Stäbchen bis unter das Epithel verfolgen.

Im Lungengewebe selbst findet man in der Nähe der Bronchien, oft aber auch scheinbar ausser allem Zusammenhange mit diesen die schon makroskopisch auffallenden pneumonischen Herde. Im Centrum derselben ist regelmässig das ganze Gewebe, Alveolen und Alveolarsepten mit typischen Eiterzellen vollgestopft, so dass die Lungenstructur scheinbar ganz verschwunden sein kann; die umgebenden Lungenpartien befinden sich im Zustande der desquamativen Entzündung. Den grösseren Zellen, welche hier das Alveolarlumen erfüllen, sind, je mehr man sich von dem Centrum des Herdes entfernt, um so spärlicher Leukocyten beigemischt. Fibrin ist in diesen eigenthümlichen Lungenveränderungen nach der Weigert'schen Färbemethode höchstens spurweise zu entdecken.

¹⁾ Vortrag, gehalten am 19. Mai 1892 in der Gesellschaft der Charité-Aerzte.

Im Centrum der eben beschriebenen Herde sind die Eiterzellen dicht vollgestopft mit winzigen Stäbchen, die sich in Ausstrichpräparaten und Culturen als Influenzabacillen zu erkennen geben, und die sich meistens geradezu in Reincultur direkt aus den Lungenherden gewinnen lassen. Dem Fraenkel'schen Diplobacillus sind wir in diesen von uns als typisch betrachteten Influenzapneumonien nicht begegnet.

Schon vor dem Bekanntwerden der Canon'schen Blutbefunde und mit verdoppeltem Eifer nachher haben wir das Blut Influenzkranker mikroskopisch und culturell untersucht. Es ist uns so gegangen, wie den meisten anderen Untersuchern, die bisher über diese Seite der Influenzafrage geschrieben haben, das heisst, wir haben nichts im Blute gefunden. Nun können ja vereinzelte Bacillen bei der mikroskopischen Untersuchung übersehen werden. Aber das Culturverfahren mit grösseren Mengen Blutes hätte doch zum Ziele führen müssen. So haben wir bei einer ganzen Anzahl sogar recht schwerer Influenzafälle das Blut täglich bis zum Tode, resp. bis in die Reconvalescenz hinein ausgesät, ohne dass auch nur eine einzige Influenzabacillencolonie gewachsen wäre. In der Regel blieben die Blutproben überhaupt steril. Die wenigen gewachsenen Colonien ergaben sich als zufällige Verunreinigungen. Canon war so liebenswürdig, uns seine aus dem Blute Influenzkranker gezüchteten Reinculturen zu demonstrieren. Wir müssen leider sagen, dass diese Culturen in keiner Weise der Prüfung Stand gehalten haben.

Ein französischer Autor (Chantemesse) hat ferner angegeben, dass er bei Kaninchen durch Uebertragung weniger Tropfen von Influenzablut in die Ohrvene eine Stäbchensepticämie hat erzielen können. Auch diese Behauptung müssen wir nach sorgfältiger Nachprüfung als unbegründet zurückweisen.

Damit scheint uns bewiesen, dass der Influenzaprozess local in dem Bronchialbaum sich abspielt, während eine Blutinfektion als regelmässiges Vorkommniss sicher auszuschliessen ist. Wir wollen damit nicht leugnen, dass gelegentlich Bacillen in die Blutbahn eingeschwemmt werden können, nur glauben wir, man darf in der Pathologie der Influenza hierauf nicht allzu sehr den Nachdruck legen.

In meiner vorläufigen Mittheilung hatte ich angegeben, dass mir die Fortzüchtung der Influenzabacillen über die erste Generation hinaus Schwierigkeiten bereite. Im weiteren Verlaufe der Untersuchungen benutzten wir alle möglichen festen und flüssigen Nährböden, um fortlaufende Influenzaculturen zu erhalten. So wurden zahllose Versuche mit gewöhnlichem und glycerinirtem Agar, mit Gelatine, bei gewöhnlicher und bei Brüttemperatur, mit Blutserum von Mensch und Thier, mit Gemischen von Agar und Serum, mit Bouillon, Milch u. s. w. angestellt, stets vergeblich. Bei der ersten Aussaat wuchsen die Stäbchencolonien, aber schon bei der ersten Abimpfung blieb alles steril. Wir suchten nach einem Grund für diese auffallende Erscheinung und kamen schliesslich auf den Gedanken, dass bei der ersten Aussaat aus Leichenorganen oder aus Sputum regelmässig Stoffe, wie Blut, Bronchialsecret mitübertragen werden, die bei der Abimpfung auf neue Nährböden fehlen, und deren Anwesenheit für das Gedeihen der Influenzabacillen nothwendig sein könnte. In der That hat sich dieser Gedanke als fruchtbringend erwiesen. Die Influenzabacillen bedürfen, um wachsen zu können, gewisser, wahrscheinlich hochcomplexirter Eiweissstoffe, wie solche im Bronchialeiter oder auch im Blute vorhanden sind. Der Bequemlichkeit halber, um das Sterilisiren zu ersparen, nehmen wir das Blut gesunder Menschen, welches bekanntlich frei von allen Mikroorganismen ist, bringen davon einen Tropfen auf die Agaroberfläche, verreiben es mit einem Platindraht und erhalten so einen Nährboden, auf welchem die Influenzabacillen auf das üppigste wachsen und in ungezählten Generationen fortgepflanzt werden können. Man stellt am besten die präparirten Blutagarröhrchen vor der Benutzung mit Gummikappe versehen 24 Stunden in den Brütapparat, um diejenigen ausschleiden zu können, bei welchen infolge irgend eines kleinen Versehens Luftkeime oder Hautepiphyten zu Colonien sich entwickelt haben.

Ich will nun den schwierigsten Fall, die Reinzüchtung der Influenzabacillen aus dem Sputum, besprechen. Ich wähle mir eine Sputumflocke aus, von der ich annehmen kann, dass sie reines Bronchialsecret darstellt, mache von einem kleinen Partikelchen ein Präparat und verreihe den Rest, wenn die Gegenwart der Influenzabacillen durch mikroskopische Untersuchung festgestellt ist, mit 1 ccm steriler Bouillon. Von dieser kaum getrübbten Sputumemulsion verstreiche ich eine Platinöse voll auf einem Blutagarröhrchen, nehme dann von der Oberfläche des ersten Röhrchens mit frisch ausgeglühter Oese ein minimales Partikelchen und verstreiche dieses auf einem zweiten Röhrchen, um so eine möglichst Isolirung der einzelnen Keime zu erzielen. Die Röhrchen kommen nun in den Brütschrank. Schon nach 20 Stunden erscheinen die Colonien auf der Agaroberfläche als sehr kleine, meist nur mit der Lupe erkennbare wasserhelle Tröpfchen, die, wenn sie dichter stehen, confluirennen können. Den Höhepunkt der Entwicklung erreicht die Cultur nach

48 Stunden, dann bleibt sie stationär, und es tritt ein ziemlich rasches Absterben der Cultur ein. Man muss daher es sich zur Regel machen, alle 4—5 Tage die Cultur auf frischen Nährboden zu übertragen. Gelegentlich haben wir Culturen noch nach 20 Tagen angehen sehen, man kann sich aber nicht darauf verlassen. Selbstverständlich muss man als Ausgangspunkt der weiteren Züchtungen einzelne Colonien wählen, die unter dem Mikroskop unter allen Cautelen abgeimpft werden müssen.

Auch die Reinculturen der Influenzabacillen gedeihen nach unseren Erfahrungen ausschliesslich auf dem specifischen oben beschriebenen Nährboden. Abimpfungen auf irgend ein anderes, sonst in der Bacteriologie gebräuchtes Nährsubstrat sind uns ohne Ausnahme steril geblieben. Man kann daher unbedenklich diese Wachsthumseigenthümlichkeit der Influenzabacillen zur Diagnose benutzen.

Wie ist diesen Resultaten gegenüber die Kitasato'sche Angabe zu erklären, dass es ihm gelungen sei, auf Glycerinagar die Influenzabacillen bis zur zehnten Generation fortzupflanzen? Es giebt da zwei Möglichkeiten, die sich nachträglich nicht gut werden entscheiden lassen, besonders da Kitasato seit längerer Zeit Deutschland verlassen hat. Entweder ist Kitasato durch morphologisch sehr ähnliche Bacillen, wie solche im Sputum gelegentlich vorkommen können, getäuscht worden, oder aber es bestehen Bedingungen, unter welchen die Influenzastäbchen doch auf Glycerinagar gedeihen können, z. B. ein ganz bestimmter Grad der Alkaleszenz, des Peptongehaltes, Bedingungen, die wir nicht haben realisiren können. Vielleicht sind spätere Untersucher glücklicher.

Ausser Kitasato, wollen Babes und besonders Bruschettini bei der Reinzüchtung der Influenzabacillen zu positiven Ergebnissen gelangt sein. Aus den Beschreibungen der letzteren Autoren geht mit voller Evidenz hervor, dass sie die echten Influenzabacillen nie in Händen gehabt haben. Sie sind an derselben Klippe gescheitert, welche den Bacteriologen in der ersten Influenzaepidemie gefährlich wurde, an dem Umstande nämlich, dass die gebräuchlichen Methoden und Nährböden bei den Influenzabacillen versagen. So nur ist es zu erklären, dass eine ganze Reihe von tüchtigen Bacteriologen, Weichselbaum, Ribbert und andere mehr, immer und immer wieder Diplococcen und Streptococcen gefunden haben, während die Erreger der Influenza übersehen werden mussten.¹⁾

Welcher Bestandtheil des Blutes ist dasjenige Agens, welches das Wachsthum der Influenzabacillen ermöglicht? Da haben wir bisher folgendes ermittelt: ad 1) kann das Blut gewisser Thierarten, z. B. der Kaninchen, das menschliche Blut vertreten; doch haben wir den Eindruck gewonnen, dass auf Kaninchenblut die Culturen der Influenzabacillen entschieden weniger üppig sind und leichter degeneriren, ad 2) trennt man das Serum von dem Blutkuchen, so ist das Serum für sich allein ausserstande, den Influenzastäbchen als Nährmaterial zu dienen; ad 3) man kann die Blutagarröhrchen auf 70° eine halbe Stunde erhitzen, ohne dass sie für die Züchtung der Influenzabacillen untauglich werden.

Die Influenzastäbchen wachsen ausschliesslich bei Brüttemperatur und sind aërobe Bacterien.

Wichtig war es, ihre Resistenz gegenüber desinfectirenden Agentien zu prüfen. Folgendes hat sich bisher ermitteln lassen:

1. Sie sind gegen Eintrocknen sehr empfindlich. Wenn man eine frische Reincultur mit ein wenig Wasser verrieben antrocknet und bei Zimmerwärme halbdunkel aufbewahrt und von zwei zu zwei Stunden Proben davon aussät, so zeigt sich nach vier Stunden schon eine deutliche Verminderung der Colonieenzahl, nach sechs Stunden wachsen nur noch vereinzelte Keime aus, nach 20 Stunden ist alles sicher abgetödtet. Etwas länger bleiben die Influenzabacillen im angetrockneten Sputum am Leben. Aber auch hier blieben Züchtungsversuche nach 40stündigem Trocknen erfolglos.

2. Erwärmen auf 60° tödtet die in Bouillon aufgeschwemmten Influenzabacillen schon nach 5 Minuten ab.

3. Chloroformzusatz desinfectirt sie unter gleichen Verhältnissen ebenfalls innerhalb weniger Minuten.

Es ist uns demnach nicht gelungen, bei den Influenzabacillen eine Dauerform nachzuweisen.

In keinem Falle von Influenza haben wir die beschriebenen Bacterien vermisst und sie nie gefunden in Fällen, wo Influenza ausgeschlossen werden konnte. Bei den Obductionen von Influenzaleichen konnten wir sie in den Bronchien und im Lungengewebe mikroskopisch und culturell in solchen Mengen und solcher Anordnung auffinden, dass ihre ätiologische Bedeutung für diese Affectionen unzweifelhaft ist.

¹⁾ Pfuhl hat aus dem Sputum Grippekranker einen Bacillus isolirt, der auf Glycerinagar und in Bouillon gedeiht, der also sicher mit den von uns gezüchteten Influenzastäbchen nicht identisch ist. Ob sein aus dem Blut eines Influenzkranken gewachsener Bacillus II, der auf gewöhnlichen Nährböden nicht fortgepflanzt werden konnte, als richtiger Influenzaerreger angesprochen werden kann, lässt sich aus der Beschreibung allein nicht entscheiden. Wir werden seiner Zeit auf alle diese Fragen ausführlich zurückkommen.

Die charakteristische, sattem beschriebene Beschaffenheit des Influenzasputums dauert in vielen Fällen noch längere Zeit an, nachdem die Allgemeinerscheinungen und das Fieber abgelaufen sind. Man findet dann in dem Auswurf immer noch zahlreiche Bacillen, doch liegen diese nicht, wie bei frischen Fällen, vorwiegend frei im Schleim, sondern meist intracellulär. Sie nehmen den Farbstoff schlecht an, zerfallen vielfach in feinkörnige Massen und lassen sich, wie wir in einzelnen Fällen mit Sicherheit constatiren konnten, nicht mehr züchten. Sind Lungendestructionen schon vor dem Auftreten der Influenza vorhanden, Cavernen, Bronchiectasien, in denen sich die Bacillen ansiedeln können, so geht der acut auftretende Influenzaprozess in einen subacuten oder chronischen Zustand über. Derartige Patienten fiebern andauernd, kommen sehr herunter und können noch Wochen nach der Influenzaerkrankung diesen Folgezuständen erliegen. Mancher, sonst räthselhafte Krankheitsverlauf hat durch den Nachweis der Influenzabacillen seine befriedigende Aufklärung gefunden.

Es giebt nun, wie dies auch gar nicht anders zu erwarten stand, eine ganze Zahl von Bacillenarten, die in der ungefähren Grösse und Form mit den Influenzabacillen Aehnlichkeit haben. Besonders in den Cavernen Phthisischer kommen gelegentlich Bacillen vor, die im mikroskopischen Bilde zu Verwechslungen Anlass geben könnten. Es sind dies aber streng anaërobe Bacterien, die in der Pleura von Kaninchen dicke, eitrige Auflagerungen verursachen mit eigenthümlich säuerlichem Geruch. Sie sind also durch ihre biologischen Eigenschaften von den Influenzabacillen leicht zu trennen. Ferner habe ich im jauchigen Peritonealeiter bei puerperaler Sepsis zweimal winzig kleine Stäbchen in enormen Mengen gefunden, die jedoch durch die Züchtung sich von den Influenzastäbchen sofort differenziren liessen. Derartige Befunde nöthigen uns, neben der mikroskopischen Untersuchung, in allen nicht ganz klaren Fällen Züchtungsversuche zu unternehmen, und ich halte nur diejenigen Bacillen für sichere Influenzastäbchen, welche die oben beschriebenen, specifischen, culturellen Eigenschaften zeigen, die also nicht auf den gewöhnlich in der Bacteriologie verwendeten Nährmedien, sondern ausschliesslich auf den oben beschriebenen Substraten wachsen. Besondere Vorsicht ist geboten bei Interpretirung von mikroskopischen Bildern des Rachensputums.

Thierversuche haben wir mit Influenzasputum und mit Reinculturen angestellt. Ich will hier besonders hervorheben, dass von über 100 Kaninchen, die mit Sputum Influenzakranker intravenös oder intrapleurale geimpft wurden, kein einziges an Fraenkelscher Sputumsepticämie eingegangen ist. Dagegen lernten wir bei dieser Gelegenheit verschiedene, sehr interessante, für Kaninchen und andere Versuchsthiere hoch pathogene Bacterienarten kennen, die gelegentlich genauer beschrieben werden sollen und zum Theil mit gewissen, von Babes näher studirten Mikroorganismenspecies identisch zu sein scheinen.

Erkrankungen, welche mit der menschlichen Influenza, wenn auch entfernt, vergleichbar sind, gelang es uns ausschliesslich bei Affen künstlich zu erzeugen. So bekam ein Affe, dem wir mit einem dicken Platindraht etwas von einer Reincultur der Influenzastäbchen ohne Verletzung der Schleimhaut in die Nase rieben, ein noch denselben Abend einsetzendes, mehrtägiges Fieber. Auch durch Injection der Cultur in die Lungen können fieberhafte, mehrere Tage andauernde Zustände bei Affen hervorgerufen werden. Alle übrigen Thierarten, die wir untersuchen konnten, sind gegen die Influenzabacillen immun.