Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie
der Universität in Straßburg.

Zur Kultur der „Spirochaete icterogenes“

Von Prof. Dr. Paul Uhlenhuth.

Die von Uhlenhuth und Fromme¹⁾ als Erreger der Weilschen Krankheit beschriebene „Spirochaete icterogenes“ ist von Ungermann²⁾ aus der Leber eines ihm von uns zur Verfügung gestellten Weil-kranken Meerschweinchens in reinem Serum unter anaëroben Bedingungen in Reinkultur gezüchtet worden. Auch in einem Gemisch von drei Teilen Serum und zwei Teilen Bouillon trat noch ausreichendes Wachstum ein, nicht mehr dagegen in einem Gemisch aus gleichen Teilen Serum und Bouillon oder gar in reiner Bouillon.

Wir haben nach dieser Methode ebenfalls gute Resultate erhalten und darüber bereits kurz berichtet³⁾ (Uhlenhuth und Fromme).

Wir legten die Kulturen in Kaninchenserum an, und zwar füllten wir je 2,0 ccm in sterile Reagenzgläser und infizierten sie mit je fünf Tropfen Lebersaft eines an Weilscher Krankheit gestorbenen Meerschweinchens mittels einer feinen sterilen Kapillare. Die Röhrchen wurden dann mit 10 ccm sterilen Paraffinöls überschichtet und bei Temperatur unter 37° (30–35°) bebrütet.

Auch von anderer Seite sind die Befunde von Ungermann bestätigt (Hoffmann und Habermann, Dietrich u. a.). Reiter züchtete die Spirochäte in mit NaCl-Lösung verdünntem Serum (5:7). Auch haben die Japaner nach der Methode von Noguchi die Spirochäte gezüchtet.

Es lag uns nun daran, in einfacher Weise größere Mengen von Kulturflüssigkeit zu gewinnen, um sie für die Immunisierung von größeren Tieren (Pferden, Hammeln) zur Gewinnung von Immunserum für die Praxis zu verwenden.

Da große Mengen reinen Kaninchensersums zurzeit schwer zu beschaffen sind und auch die Vorbehandlung von Tieren mit großen Mengen derartiger Kulturflüssigkeiten, die aus reinem artfremden Serum bestehen, erhebliche Nachteile (Giftwirkung) hat, so versuchten wir stark mit Leitungswasser verdünntes Serum als Nährflüssigkeit zu verwenden. Zu derartigen Versuchen wurden wir veranlaßt durch die Beobachtung, daß die sonst recht empfindlichen Spirochäten sich in gewöhnlichem Leitungswasser verhältnismäßig lange lebensfähig erhalten. Wir haben diesbezügliche Untersuchungen von epidemiologischen Gesichtspunkten aus angestellt, da ja mehrfach behauptet worden ist, daß die Weilsche Krankheit beim Baden in Flüssen (Hecker und Otto) oder durch stagnierende Wässer, z. B. in Kohlengruben (Japaner), übertragen werden kann.

Unsere bezüglichen Versuche, über die wir an anderer Stelle ausführlicher berichten werden, hatten ergeben, daß Virusblut, zu gleichen Teilen mit Leitungswasser versetzt, sich im ungeheizten Zimmer (Herbst 1916) noch nach 16 Tagen als virulent erwies.

Wir wählten für unsere Kulturversuche, an denen sich der Unteroffizier Bräuer in hervorragender Weise beteiligt

hat, eine Verdünnung von 1:30 und erzielten damit gute Resultate.

Wir wollen in Folgendem das Kulturverfahren näher beschreiben.

Hauptbedingung beim Anlegen von derartigen Kulturen ist absolute Sterilität der benutzten Instrumente und Flüssigkeiten, denn die geringste bakterielle Verunreinigung stellt das Gelingen der Kultur in Frage.

Die Blutentnahme beim Kaninchen erfolgt durch Herzpunktion nach vorheriger Desinfektion der Einstichstelle mit gut ausgekochter 10 ccm-Spritze.

Das Blut bleibt in sterilem Zentrifugengläse am besten über Nacht stehen, damit das zur Kultur zu verwendende Serum sich gut absetzt.

Das zu verwendende Leitungswasser wird in säurefrei gereinigten Reagenzgläsern in den gewünschten Mengen im Autoklaven sterilisiert, ebenso das zur Ueberschichtung der Kultur zu verwendende Paraffinöl.

Als Ausgangsmaterial für die Kultur dient die Leber eines schwer an Weil erkrankten Meerschweinchens, die, nach Entblutung des Tieres steril entnommen, in einer sterilen Petrischale mit sterilen Instrumenten (Schere) zerkleinert und mit steriler physiologischer NaCl-Lösung versetzt wird. Nach etwa einer halben Stunde, nachdem sich eine klare Flüssigkeit abgesetzt hat, beschickt man mit einer sterilen Kapillare oder Pipette die 3 ccm Wasser enthaltenden Reagenzröhrchen, in die man vorher 0,1 ccm von dem abgesetzten Kaninchenserum getan hat, mit einigen Tropfen der Leberflüssigkeit, überschichtet mit 10 ccm Paraffinöl und stellt die Kultur-röhrchen in einen Brutschrank von nicht über 35°.

Ein praktisches Beispiel soll das Ergebnis der Kultur beleuchten.

Auf die geschilderte Weise wurden sechs Röhrchen hergestellt, nach drei Tagen wurde im Dunkelfeld untersucht, und in allen Röhrchen konnten sehr lebhaft bewegliche Spirochäten, und zwar sehr vereinzelt in jedem Gesichtsfeld wahrgenommen werden. In den folgenden Tagen vermehrten sich die Spirochäten; am fünften und sechsten Tage waren in jedem Gesichtsfelde 20–30 Spirochäten zu sehen. Am siebenten Tage wurden von Röhrchen 2 und 4 je zwei neue Röhrchen angelegt, und zwar auf die gleiche Weise, nur daß jetzt statt des Leberauszugs vier bis fünf Tropfen von der Originalkultur verwendet wurden. Auch diese vier Röhrchen gingen gut an, und so haben wir bis jetzt 13 Passagen ohne Schwierigkeit erzielt. Die Ueberimpfung erfolgt wöchentlich einmal. Die Kultur bleibt vollständig klar, ein Wachstum (Trübung des Nährbodens) ist bei makroskopischer Betrachtung der Kultur nicht zu sehen.

Die Untersuchung der Kulturen und die Entnahme von Material zwecks Ueberimpfung läßt sich sehr gut mit sterilen Kapillaren ausführen, indem man das obere Ende mit dem Zeigefinger zudrückt und nun durch die Oelschicht hindurch bis auf den Boden des Glases geht. Hebt man dann den Zeigefinger von der Öffnung der Kapillare, so steigt die Kulturflüssigkeit von selbst auf.

Wie im Kleinen, so gelingt die Kultur auch im Großen, denn in Erlenmeyerschen Kolben (mit engem Hals) von 100–500 ccm Inhalt erzielten wir die gleichen guten Erfolge wie in den Röhrchen. Wir benutzten die großen Kolben zur Anlage von Massenkulturen; zu diesem Zweck füllten wir den Kolben bis zum Halsansatz mit Wasser, sterilisierten und setzten zu je 30 Teilen Wasser einen Teil Kaninchenserum. Dann beschickten wir mit Kultur — je nach der Größe des

¹⁾ M. Kl. 1915 Nr. 44, 46, 47 u. 50; B. kl. W. 1916 Nr. 11.

²⁾ B. kl. W. 1916 Nr. 15 S. 408–409.

³⁾ Zschr. f. Immun.Forsch. 25 H. 4–6 (1916).

Kolbens — z. B. in $\frac{1}{2}$ -Literkolben 1 ccm Kultur — und füllten bis unterhalb des Stopfens mit Paraffinöl auf.

Es ist uns auf diese Weise gelungen, Kulturflüssigkeit in großen Mengen mit Leichtigkeit und verhältnismäßig wenig Kaninchenserum zu gewinnen, sodaß wir diese zur Immunisierung von großen Tieren, Pferden, Hammeln, mit Erfolg verwenden konnten. So haben wir einem Pferde in kurzer Zeit 100, 300 und 500 ccm Kulturflüssigkeit auf einmal einspritzen können. Für die Gewinnung von Immunserum, das bisher in der Regel durch Einspritzung von Blut kranker Meerschweinchen gewonnen wurde, bedeutet diese einfache „Wasserkultur“ einen großen Fortschritt.¹⁾

Auch in gleicher Verdünnung von Pferdeserum gelang es — wie Ungermann im Eselserum —, eine Kultur zu erzielen. Versuche mit anderen Sera sind im Gange, denn wir müssen dahin streben, für die Immunisierung unserer Versuchstiere Kulturen in artgleichem Serum zu erzielen.

Was die Virulenz der Kulturen anlangt, so konnten wir feststellen, daß Meerschweinchen, welche mit $\frac{1}{2}$ ccm einer vier Wochen alten Kultur aus Passage 4 i. p. geimpft wurden, nach sechs Tagen an schwerem Ikterus starben; im gefärbten Leberausstrich waren massenhaft Spirochäten wahrzunehmen.

Kulturverdünnungen der achten Passage bis 1:1000 erzeugten bei Meerschweinchen (1 ccm) typische Weilsche Krankheit. Auf jeden Fall empfiehlt es sich aber wohl, die Kultur ab und zu wieder durch Meerschweinchen zu schicken, um die Virulenz konstant auf der Höhe zu halten.

Auch Blutserum von lebenden Weil-kranken Tieren (Meerschweinchen und Kaninchen²⁾), im Verhältnis von 1:30 in steriles Leitungswasser als Kulturmedium direkt überimpft, ergab ausgezeichnetes Wachstum der in diesem Blutserum der kranken Tiere vorhandenen Spirochäten. Inwieweit sich dieses direkte Kulturverfahren für die Diagnose beim Weil-kranken Menschen eignet, müssen Versuche mit Blutserum von Menschen aus den ersten Tagen der Erkrankung ergeben. Leider standen uns solche Fälle in letzter Zeit nicht zur Verfügung.

Die Kulturspirochäten lassen sich am besten im Dunkelfeld³⁾ studieren. Die Betrachtung der auf dem schwarzen Untergrunde hell aufleuchtenden, sich lebhaft bewegenden Spirochäten bietet ein äußerst fesselndes und reizvolles Bild von seltener Schönheit, weil in der homogenen Kulturflüssigkeit — im Gegensatz zu den Organaufschwemmungen des Tierkörpers — die feine Struktur und die Bewegung der Parasiten mit außerordentlicher Schärfe und Klarheit zu beobachten ist.

Man sieht hier besonders deutlich, worauf wir auch bereits hingewiesen haben, daß die fadenartigen Gebilde in sich ganz regelmäßige, präformierte, sehr enge Windungen zeigen, die vielfach als Ketten feinsten glitzernder Körnchen in die Erscheinung treten. Im übrigen zeigen die Fäden bizarre Schlängelungen und Windungen, sowie an Kleiderbügel erinnernde Formen, wie wir sie früher bereits beschrieben haben.

Die Bewegungen sind in frischen Kulturen sehr lebhaft. Sie drehen sich außerordentlich schnell um ihre Längsachse, wobei die Spirochäten vielfach eine gestreckte oder gebogene Form zeigen, und führen schraubende, rollende, peitschende, schlängelnde und wurmartige Bewegungen aus. Dabei machen besonders die umgebogenen Enden kreisförmige, flügelschraubenartige Umdrehungen.

Sehr schön sieht man auch an einem oder beiden Enden die bekannten stark lichtbrechenden Körnchen, die besonders in alten Kulturen in großer Anzahl auch frei im Präparat herumschwimmen und vielleicht als Degenerationserscheinungen gedeutet werden müssen (siehe auch Reiter, Dietrich).

Bis jetzt haben wir in zwölf Wochen alten Kulturen noch bewegliche lebende Spirochäten nachweisen können.

Im übrigen verweisen wir auf die früher von uns (Uhlenhuth und Fromme) gegebene Beschreibung. Nach

diesen Befunden erscheint es wohl möglich, daß unter besonders günstigen Verhältnissen die Spirochaete icterogenes sich in der Außenwelt (Wasser usw.) auch vermehren kann.

¹⁾ Demonstration im Unterelsässischen Aerzteverein am 26. I. und 24. II. 1917 (Straßb. med. Ztg. 1917).

²⁾ Die Uebertragung der Weilschen Krankheit und die Weiterimpfung in Passagen gelingt besonders bei jungen Kaninchen.

³⁾ Für den schnellen Nachweis eignet sich auch in Ermangelung eines Dunkelfeldes das Tusche-Verfahren sowie die Fontana'sche Silberfärbung.