Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie in Straßburg i. E.
(Direktor: Geheimrat Uhlenhuth.)

Zur Züchtung des Influenzabazillus.

Von Dr. Karl Hundeshagen.

Als sich im Jahre 1914 nach längerer Pause einmal wieder Gelegenheit bot, einige Fälle von Influenza bakteriologisch zu untersuchen, stand mir von neuem das sehr auffällige und daher wohl jedem, der öfter mit Influenza gearbeitet hat, geläufige Bild vor Augen, daß auf den gewöhnlichen Blutagarplatten, soweit sie keimfrei sind, der Influenzabazillus meist nur sehr dürrig wächst, während er in der Nachbarschaft fremder Keime, die zufällig als Verunreinigung auf die Kulturplatte gelangt sind, außerordentlich üppig gedeiht. Im Vergleich zu dem sonst nur äußerst feinen Kulturrasen kann man geradezu von einem „Riesenwachstum“ an solchen Stellen sprechen. Durch Symbiose mit „Ammenbakterien“, als welche sich die verschiedensten Arten — namentlich auch Staphylokokken — bewähren, wird also das Wachstum der Influenzabazillen mächtig gefördert, sodaß es naheliegt, solche „Ammen“ zur Verbesserung der Züchtungsmöglichkeiten zu Hilfe zu nehmen.

Tatsächlich sind auch verschiedentlich solche Versuche unternommen worden, so namentlich von Grassberger (1), ferner von Ghon (2) und von Preyss (2), sowie neuerdings von Levinthal (3). Ich selbst habe damals, die auffällige Beobachtung des symbiotischen Riesenwachstums vor Augen, gleichfalls zunächst einige Versuche in dieser Richtung gemacht, ohne die genannten Arbeiten zu kennen; man wird eben geradezu durch die Beobachtung zu derartigen Versuchen herausgefordert.

Der Weg über die Ammenbakterien erschien mir aber von vornherein als ein unvollkommener Weg zum Ziele, sodaß ich ihn sehr bald verließ und mir vielmehr die Aufgabe stellte, ähnliche Bedingungen auf den Blutplatten zu schaffen, wie sie die Ammenbakterien bewirken, ohne jedoch diese selbst zu Hilfe zu nehmen. Die erstrebte Verbesserung des Nährbodens gelang mir auch bald in durchaus befriedigender Weise, leider ist jedoch die Veröffentlichung meiner nun bereits über vier Jahre zurückliegenden Versuche bisher unterblieben, weil der Krieg mit seiner ungeheuren Arbeitslast dazwischentrat, sodaß diese Arbeiten wie manches andere völlig in den Hintergrund gedrängt wurden. Der jetzige große Seuchenzug, der in kurzer Zeit seinen Weg über ganz Europa genommen hat, sowie die vor einiger Zeit erfolgte Veröffentlichung Levinthals (3) über einen neuen optimalen Influenzanährboden geben mir nun Anlaß, meine damaligen Versuche und meine Erfahrungen in den anschließenden Jahren mit einem dem Levinthal-schen völlig entsprechenden Nährboden bekannt zu geben.

Bei meinen Versuchen ging ich von der Ueberlegung aus, wodurch wohl die Ammenbakterien in ihrer Umgebung so günstige Wachstumsbedingungen auf der Blutplatte bewirken könnten. Am wahrscheinlichsten erschien mir, daß sie 1. durch eine fermentative Wirkung auf die Blutkörperchen, indem sie diese in ziemlich weitem Umkreise zur Auflösung bringen, günstige Bedingungen schaffen, und 2. durch Veränderung der Reaktion, vermutlich in alkalischem Sinne, in ihrer Nachbarschaft den Boden günstig vorbereiten könnten. Dement-

sprechend versuchte ich, die Blutkörperchen in gelöstem Zustande zum Agar hinzuzufügen und dem Nährboden eine zweckmäßige alkalische Reaktion zu geben. Diese Versuche führten sehr schnell zum gewünschten Ziele; die Auflösung der Blutkörperchen für sich allein übte allerdings kaum einen merklich begünstigenden Einfluß aus.

Um das Ergebnis kurz zusammenzufassen, so bewährte sich mir die folgende Herstellungsweise des Influenzalnährbodens:

Defibriertes Kaninchen- oder Menschenblut, das ich mir stets im Eisschrank vorrätig hielt, wird mit der gleichen Menge Brunnenwassers vermischt, welchem etwa 20% Normalnatronlauge zugesetzt ist; Mischung natürlich erst nach Sterilisierung dieses alkalischen Wassers. Im Laufe etwa einer Stunde erfolgt Auflösung der roten Blutkörperchen; bei Verwendung ganz frischen Blutes erfordert die Lösung zuweilen auch etwas längere Zeit. Von der entstandenen alkalischen Blutlösung werden etwa 10% dem verflüssigten und auf etwa 50° abgekühlten, nicht neutralisierten Agar zugesetzt. Nach gründlicher Mischung des Agars und der Blutlösung wird der Nährboden in Petrischalen ausgegossen oder auf Schrägröhrchen verteilt. Im Eisschrank aufbewahrt, bleibt dieser Nährboden wochenlang brauchbar. Das Wachstum der Influenzabazillen auf ihm ist überraschend üppig. Einige der im Jahre 1914 damit erzielten Kulturen, die ich aufbewahrt habe, konnte ich in der diesjährigen Junisitzung des Unterelsässischen Aerztevereins noch vorzeigen. Das Wachstum ist so üppig, daß ich es nach meinen ersten Versuchen für gut hielt, mich zu vergewissern, daß ich nicht etwa mit Pseudoinfluenzastämmen arbeitete. Deshalb ließ ich mir auch noch vom Kralschen Institut in Wien einen Influenzastamm kommen; dieser zeigte das gleich üppige Wachstum. Uebrigens beobachtet man auf Platten mit diesem Nährboden den begünstigenden Einfluß fremder Keime nicht mehr; der Nährboden bietet also an sich die günstigen Bedingungen, die ich erreichen wollte.

Dem Alkaligehalt des zur Auflösung der Blutkörperchen verwendeten Wassers ist ein ziemlich weiter Spielraum gelassen, es ist jedoch zweckmäßig, dem Wasser nicht weniger als 10 und nicht mehr als 30% Normalnatronlauge zuzusetzen, denn bei Zusatz von 40% ist das Wachstum merklich schlechter als bei 10–30%. Bei Verwendung dieser Alkaligrenzwerte ergibt sich eine Menge von 0,5–1,5% unverdünnter Normalnatronlauge auf den fertigen Nährboden berechnet. Je geringer die verwendete Alkalimenge ist, desto mehr nähert sich die Farbe der erzielten Blutlösung einem schönen Rotbraun, während der Farbenton bei höheren Alkalimengen etwa kaffeebraun bis grünlich-braun wird. Nimmt man statt Natronlauge Sodaauslösung, so tritt nur eine ganz mangelhafte Lösung der Blutkörperchen ein, und sie behalten ihre hellrote Farbe; dabei ist das Influenzawachstum weniger gut. Uebrigens erwies sich Hammelblut merkwürdigerweise als gänzlich ungeeignet für die Influenzazüchtung auf diesem Nährboden.

Der Influenzabazillus wächst auf ihm in Form eines völlig durchsichtigen Rasens; die entstehenden Einzelkolonien sind um das Mehrfache größer als diejenigen, die auf dem gewöhnlichen Blutagar zur Entwicklung kommen. Die Kultur läßt die braunrote Farbe des Nährsubstrats so vollkommen durchscheinen, daß sie sich überhaupt nicht bemerklich macht, wenn man senkrecht auf sie aufblickt, während sie bei seitlicher Betrachtung, wenn die Lichtreflexe in Erscheinung treten, sofort als üppige Kultur deutlich erkennbar wird. Gerade hierdurch ist die Unterscheidung von anderen Keimen gut möglich, denn diese bilden mehr oder weniger trübe, graue bis weißliche Kolonien, die sich von dem braunroten Untergrunde deutlich abheben; nur die Meningokokken wachsen ganz ähnlich den Influenzabazillen, jedoch noch üppiger als diese.

Die Ergebnisse mit meinem beschriebenen Nährboden waren also durchaus befriedigend, und ich habe ihn längere Zeit mit großem Vorteil zur Influenzazüchtung verwendet, bis ich im Jahre 1915 zufällig erfuhr, daß man in Amerika mit einem höchst einfach herzustellenden Nährboden arbeite, der sich ausgezeichnet bewähre.

Er wird einfach in der Weise gewonnen, daß man den in Reagenzröhrchen enthaltenen Agar im Wasserbade verflüssigt und ihm, während er eine Temperatur von etwa 96° hat, ein wenig Hammelblut zusetzt, worauf man ihn in schräger Lage erstarren läßt oder zu Platten ausgießt. Diese außerordentlich einfache Herstellungsweise war natürlich so bestechend, daß ich das Verfahren sofort versuchte. Ich muß gestehen, daß ich zunächst, gerade nach meinen oben erwähnten schlechten Erfahrungen mit Hammelblut, mit einiger Skepsis daran ging; um so größer war mein Erstaunen, als ich sah, wie vorzüglich sich dieser Nährboden tatsächlich für die Influenzazüchtung eignete. Es ist also hier einfach der angewendete Hitzegrad, der die Bedingungen in dem

Blutagar so vollständig, und zwar in günstigstem Sinne umwandelt. Ich habe mich damals vergeblich bemüht, in der amerikanischen Literatur festzustellen, was wohl dort bisher über diesen Nährboden veröffentlicht sei; vier Jahrgänge der „Collected Studies of the Research Department of the Board of Health of the City of New-York“, in welcher Zeitschrift angeblich ausführliche Mitteilungen in der Sache zu finden sein sollten, habe ich vergebens durchsucht. Auch in den inzwischen verflossenen Jahren scheint merkwürdigerweise in Deutschland nichts darüber bekannt geworden zu sein, denn Levinthal erwähnt in seiner ausführlichen Veröffentlichung auch nichts davon.

Im Grunde sind ja der beschriebene amerikanische Nährboden und der kürzlich von Levinthal angegebene völlig identisch, nur ist die amerikanische Herstellungsweise noch einfacher als die nach Levinthal, denn es wird auf das mehrmalige Aufkochen und das Filtrieren verzichtet. Ohne Kenntnis von der Tatsache zu haben, daß ein derartiger Nährboden bereits seit Jahren Verwendung findet, ist Levinthal auf dem Umweg über seine Versuche, die „Ammenbakterien“ für die Züchtung des Influenzabazillus dienstbar zu machen, zur Herstellung seines Nährbodens gelangt. Ich selbst habe nun seit 1915 immer mit dem „amerikanischen Nährboden“, wie ich ihn kurz ausgedrückt nennen will, gearbeitet, wenn Fälle von Influenza zu untersuchen waren, was nicht nur 1914, sondern auch 1915 und 1916 der Fall war. Daher kann ich die von Levinthal kürzlich mitgeteilten günstigen Erfahrungen auf Grund eigener, bereits mehrjähriger Beobachtungen durchaus bestätigen. Auf die Verwendung meines eigenen Nährbodens habe ich alsbald verzichtet, als ich den anderen kennen lernte, obwohl er ein gleich üppiges Wachstum des Influenzabazillus wie jener ermöglicht; die Vorteile des nach amerikanischer Weise hergestellten Nährbodens gegenüber dem meinigen sind aber doch so erheblich, daß der erstere den Vorzug verdient: vor allem wegen seiner noch viel einfacheren und in kürzester Zeit zu bewerkstellenden Herstellung und dann, weil er infolge Anwendung hoher Temperaturgrade mehr Gewähr für Sterilität bietet. Um der letzteren möglichst sicher zu sein, habe ich die hohe Temperatur nicht zu kurz einwirken lassen und bin immer bei der Herstellung in folgender Weise vorgegangen: Der in einem Kölbchen befindliche Nähragar wird im Wasserbade verflüssigt; während das Thermometer auf einer Temperatur zwischen 95 und 100° steht, werden dem Agar etwa 5% Blut zugesetzt, und durch leichtes Umschwenken wird eine gleichmäßige Mischung erzielt. Hierauf kommt das Gemisch noch einmal für ein paar Minuten in das kochend heiße Wasserbad, damit die Temperatur im Kölbchen wieder nahezu die Temperatur des heißen Wassers erreichen kann, und jetzt wird die Flamme beseitigt. Es tritt nun eine sehr langsame Abkühlung im Wasserbade ein; wenn diese bei einer Temperaturhöhe von 50–60° angelangt ist, wird der Nährboden in sterile Schalen oder Schrägröhrchen ausgegossen.

Meine Erfahrungen mit dem auf solche Art hergestellten Nährboden waren stets ausgezeichnet und stimmen mit denen Levinthals vollkommen überein: äußerst üppiges Wachstum der Influenzabazillen und lange Haltbarkeit des Nährbodens im Eisschrank. Wenn Levinthal den Nährboden filtriert verwendet, so hat dies natürlich den unleugbaren Vorzug, daß man dadurch ein klar durchsichtiges Nährsubstrat erlangt. Ich habe mich vor Jahren auch davon überzeugt, daß das klare Filtrat dem Influenzabazillus ungefähr gleich günstige Wachstumsbedingungen bietet wie der unfiltrierte Blutagar. Da ich aber bis zum diesjährigen Sommer, wenn überhaupt, immer nur vereinzelte Influenzafälle zu untersuchen hatte und mir das kulturelle Bild auf dem unfiltrierten Agar geläufig war, das Filtrieren zudem noch einen erheblichen Mehraufwand an Zeit und Materialverschwendung bedingt, habe ich fast nur mit dem unfiltrierten Blutagar gearbeitet. Für das Aussehen der Influenzaskulturen und ihre Unterscheidung von anderen Keimen gilt alles das, was ich weiter oben für meinen eigenen Nährboden ausgeführt habe, denn der unfiltrierte Blutagar nach amerikanischer Herstellungsweise erhält durch die in ihn eingeschlossenen Blutgerinnung eine ganz ähnliche Grundfarbe (etwa Schokoladefarbe) wie mein mit alkalischer Blutlösung versetzter Nähragar.

Für bestimmte Zwecke scheint mir aber der unfiltrierte Blutagar resp. der von mir angegebene entschieden den Vorzug vor dem filtrierten zu verdienen. Die Fortzüchtung des Influenzabazillus in Reinkultur erfordert ja bei dem außerordentlich raschen Absterben seiner Keime eine ganz ungewöhnliche Mühe- und Sorgfalt. Dem vor einigen Jahren von der Kralschen Sammlung bezogenen Influenzastamm war die Anweisung beigegeben: „muß alle drei Tage auf Taubenblutagar über-

impft werden". Man stelle sich unter den jetzigen Kriegsverhältnissen vor, daß dies notwendig wäre, um die Influenzaskulturen, von denen wir z. B. im hiesigen Institut kürzlich etwa 40 Stämme weiterzüchteten, am Leben zu erhalten! Demgegenüber bedeutet der neue Nährboden, der noch weit üppigere Kulturen liefert als der bis dahin bevorzugte Taubenblutagar und somit auch für die Lebensdauer günstigere Aussichten bietet, einen großen Fortschritt. Immerhin erlebt man es nicht seltener, daß selbst die Abimpfung von einer erst drei Tage alten Kultur auf Levinthal-Agar schon erfolglos ist. Nun habe ich bei vergleichenden Versuchen zwischen meinem eigenen Nährboden, der ja die gesamten Blutstoffe enthält, und dem Levinthalschen, der durch Filtrieren von den Blutgerinnseln befreit ist, häufig beobachten können, daß gleich alte Kulturen der gleichen Stämme von meinem Blutagar noch gut weitergezüchtet werden konnten, wenn sie auf dem Levinthal-Agar bereits abgestorben waren, auch wenn beide Nährböden am gleichen Tage mit dem gleichen Agar und mit der gleichen Blutart hergestellt worden waren. Andererseits ließ sich oft die Beobachtung machen, daß bereits lebensschwache Kulturen, gleichzeitig sowohl auf meinem Blutagar wie auf den nach Levinthal überimpft, auf letzterem garnicht mehr oder nur in vereinzelten Kolonien anwuchsen, auf ersterem dagegen noch zusammenhängende Kulturrasen oder doch Einzelkolonien in einer vielfach größeren Anzahl bildeten. Dieser augenfällige Unterschied gilt übrigens anscheinend nicht nur für den Vergleich zwischen meinem mit alkalischer Blutlösung hergestellten Agar und dem Levinthalschen, sondern nach meinen in letzter Zeit begonnenen Versuchen in ähnlicher Weise wohl auch für den Levinthalschen Nährboden an sich, je nachdem man ihn filtriert oder unfiltriert verwendet. Die völlige Gleichwertigkeit beider Arten, die Levinthal annimmt, kann ich also nicht bestätigen, und gerade auf Grund der erwähnten Unterschiede, der längeren Lebensdauer einerseits und des besseren Anwachsens bereits vor dem Absterben stehender Kulturen andererseits, glaube ich für die Fortzüchtung des Influenzabazillus in Reinkulturen die Verwendung desjenigen Agars vorschlagen zu müssen, der die Blutbestandteile in ihrer Gesamtheit enthält. Das bedeutet nicht nur eine wesentliche Vereinfachung in der Herstellung des Nährbodens für solche Zwecke, für welche die Durchsichtigkeit desselben durchaus entbehrt werden kann, sondern vor allem auch eine gewaltige Ersparnis an Nährmaterial und Zeitaufwand: welcher Unterschied, ob man zwei- bis dreimal wöchentlich oder nur einmal die Reinkulturen zu überimpfen hat! Nach einer Woche sind diese nämlich auf dem nichtfiltrierten Blutagar nach meinen Beobachtungen in der Regel noch am Leben, beständigen Aufenthalt im Brutschranke bei mäßiger Wärme (37° oder etwas darunter) vorausgesetzt. Wenn man die Kulturen luftdicht verschließt und so vor Eintrocknung bewahrt, kann man sie unter den gleichen Verhältnissen noch viel länger am Leben erhalten, z. B. 14 Tage und selbst länger.

Zum Schluß nur noch ein paar allgemeine Bemerkungen: Wie Levinthal und andere Autoren habe auch ich in den letzten Jahren den Eindruck gehabt, daß sich der Begriff des „Pseudoinfluenzabazillus“ nicht aufrecht erhalten läßt, soweit die in Frage kommenden Bazillen kulturell mit den echten Influenzabazillen übereinstimmen; ich habe wiederholt echte Influenzastämme gesehen, sowohl auf den gewöhnlichen, früher gebräuchlichen Blutplatten wie auch auf dem neuen Nährboden, welche mikroskopisch bald das typische Influenzabild, bald die bizarrsten Formen darboten.

Die weitgehenden Erwartungen, welche Levinthal an die Bedeutung des neuen Nährbodens für die serologische Influenzaforschung knüpft, konnten wir bei unseren ziemlich zahlreichen Untersuchungen im hiesigen Institut, zu denen die in großer Ausdehnung aufgetretene „spanische Krankheit“ reichlich Gelegenheit bot, leider nicht bestätigen, soweit die serologische Diagnostik in Frage kommt. Unsere Ergebnisse werden an anderer Stelle ¹⁾ in einer gemeinsamen Arbeit von Messerschmidt, Scheer und mir selbst veröffentlicht.

Literatur: 1. Grassberger, Zschr. f. Hyg. u. Infektionskrkh. 25. 1897 u. Zbl. f. Bakt. 23. 1898 S. 476. — 2. Chon u. v. Preyß, Zbl. f. Bakt. 21. 1902. — 3. W. Levinthal, Zschr. f. Hyg. u. Infektionskrkh. 86. 1918 H. 1.

¹⁾ Im Zbl. f. Bakt.