

IX.

Ueber die Cultivirbarkeit des Actinomyces.

Von Dr. Oscar Israel,

Assistenten am pathologischen Institute zu Berlin.

Die Actinomykose ist bereits seit mehreren Jahren Gegenstand eifriger Untersuchungen gewesen und doch hat wohl keine pflanzliche parasitäre Invasion dem Vordringen der Erkenntniss solchen Widerstand entgegengesetzt, wie dieser räthselhafte Pilz. Derselbe macht die augenfälligsten Veränderungen im Organismus, es ist ein Leichtes, seine Anwesenheit in dem anatomischen Object zu constatiren, und doch ist es bisher noch nicht einmal gelungen, seine botanische Stellung zu bestimmen.

Aus diesem Grunde, meine ich, soll man jeden Fortschritt auf dem fraglichen Gebiete thunlichst bald zum Gemeingut der Untersucher machen, und so sehe ich mich schon jetzt zu Mittheilungen über meine bisherigen Untersuchungen veranlasst, obwohl dieselben noch keineswegs in sich abgeschlossen sind; aber der Umstand, dass es, wie ich gefunden habe, möglich ist, den Actinomyces auf künstlichem Nährboden zum Wachsen und zur Fortpflanzung zu bringen, scheint an sich werthvoll genug, da er den Schlüssel zur Aufklärung der botanischen Verhältnisse, wie seiner biologischen Eigenarten und der Herkunft des Pilzes bietet.

Ich bemerke, nicht ohne Absicht, dass ich mich bereits ein ganzes Jahr mit Culturversuchen des Actinomyces beschäftigt habe, und wenn das langsame Fortschreiten derselben zum Theil auch durch die Beschränktheit der darauf verfügbaren Zeit und die Schwierigkeit, das Material zu erlangen, verschuldet ist, so liegt doch ein gut Theil der Schuld in den schwierigen Verhältnissen des Parasiten selbst. Ein Theil der Versuche missglückt schon wegen der schweren Zugänglichkeit des fortpflanzungsfähigen Materials. Vom Menschen hatte ich nur einmal Gelegenheit, actinomycotische Theile zu benutzen und zwar durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Collegen James Israel; allein die

Versuche scheiterten an fremden mykotischen Beimengungen, die sich mehr oder weniger schnell der ganzen Culturfläche bemächtigten; überhaupt eröffnen die operativen Eingriffe, welche der Prozess am Menschen nöthig macht, nur zu leicht anderen Mikroorganismen den Eintritt, und die Aussicht, auf diesem Wege zu Reinculturen zu kommen, erscheint nur gering.

Deshalb habe ich wiederholte Versuche mit thierischem Material angestellt, welches ich den städtischen Thierärzten Herrn Buch und Keimann verdanke. Bekanntlich befällt der *Actinomyces* am häufigsten den Kiefer der Rinder und ruft dort als Reaction die grossen Geschwülste hervor, welche in so grosser Ausdehnung mit Knochenneubildung verbunden sind, dass man sogar vom Osteosarcom des Kiefers der Rinder sprach. Diesen Tumoren ist meist nur mittelst Meissel und Säge beizukommen und darin liegt auch gerade keine Erleichterung der zur Herstellung von Reinculturen nöthigen Maassnahmen; es ist nemlich, wie ich weiter unten erörtern werde, nicht möglich, eine Auswahl einzelner mykotischer Heerde auf der Nährfläche zur Erzielung von reinen Culturen vorzunehmen, vielmehr stellt sich die Nothwendigkeit heraus, von vornherein reine Vegetationen zu benutzen. Hat man die Schwierigkeiten überwunden, welche die umgebende Knochenhülle verursacht, so zeigt es sich, dass ein Theil der zur Verfügung stehenden Pilzkörner nicht verwendbar ist, weil er die Fähigkeit verloren hat, zu wachsen. Die kalkige Infiltration der Pilzheerde beschränkt sich nicht auf die grossen centralen Kalkmassen, welche sich in ihnen finden, sondern häufig sind auch die peripherisch das Pilzkorn bildenden Mycelien abgestorben und verkalkt, obwohl sie nicht leicht Abweichungen erkennen lassen. Höchstens nimmt man einen lebhaften Glanz, leicht gelbliche Färbung und einen etwas härteren Contour wahr, erst Zusatz von Salzsäure macht den Zustand offenbar. So erfordert also schon die Auswahl des Materials die Berücksichtigung einer Anzahl von Bedingungen, welche lange nicht in jedem Object vorhanden sind, das grösste Hinderniss für Reinculturen aber liegt in dem langsamen Wachsthum des Pilzes selbst, welches allen wachsthumsfähigen Beimengungen hinreichend Zeit lässt, um über die geringen Entwicklungen des *Actinomyces*, bevor diese noch deutlich wahrnehmbar geworden,

die Oberhand zu gewinnen, und sich so fortgesetzt in weitere Culturen einzudrängen, aus diesem Grunde muss also schon die primäre Cultur rein sein.

Auf flüssigen Nährlösungen: Rinderbouillon, Fleischextract-Peptonlösungen und flüssigem Rinderblutserum bei Zimmer- wie bei Körpertemperatur, ebenso auf Fleischwasser-Pepton-Kochsalz-gelatine bei 20° zeigte sich kein Erfolg. Nur das von Koch eingeführte coagulirte Rinderserum bot einen geeigneten Nährboden. Da sich die Versuche auf viele Wochen erstrecken, ist die beständige Sättigung der Luft des Thermostaten mit Wasserdampf nöthig und eine andere Massnahme, welche sich an die Coagulation des Serum knüpft. Diese ist nemlich am besten eine möglichst schwache, um länger vor dem Vertrocknen geschützt zu sein, denn ein gewisser Wasserverlust tritt schon mit der längeren Dauer des Coagulirungsprozesses ein. Ueber einen Topf mit kochendem Wasser legt man ein weitmaschiges Drahtnetz so schräg, wie es die Ausbreitung des Serums in den Gläsern nöthig macht, und schon innerhalb 10 Minuten wird man die geringe Veränderung des Aussehens wahrnehmen, welche den Beginn der Gerinnung anzeigt. Gleich darauf ist es auch Zeit die Procedur zu unterbrechen; es findet dann allerdings eine kleine Verschiebung des Coagulum statt, wenn man die Röhren aufrichtet, allein die Oberfläche bleibt fast ungeschmälert. Weitere Cautelen sind nicht nöthig, und ich möchte hier namentlich vor einer „Vorsichtsmaassregel“ warnen, welche nicht blos von Spina, sondern in neuester Zeit von Malassez und Vignal in ihrer Arbeit über die nichtbacilläre Tuberculose¹⁾ zum Schutz der Culturen statt des gelegentlichen Oeffnens der Wattepfropfe angewandt ist. Diese besteht in dem Durchbohren der Pfröpfe mittelst geglühter Troicarts und Nadeln, um auf diese Weise zu den Culturen zu gelangen. Es ist dies fast die sicherste Methode, eine Verunreinigung herbeizuführen, während das Lüften der Wattepfropfe bei Weitem nicht so gefährlich ist.

Das Wachsen des *Actinomyces* erfolgt nun derart, dass sich um die Aussaat ein sehr dünner sammetartig rauher, leicht trocken aussehender Rasen auf der glänzenden Oberfläche des Coagulum ausbreitet, der bei schräg auffallendem Lichte deutlicher, bei

¹⁾ Archives des physiologie, 15. Novembre 1883, No. 8.

durchfallendem sehr leicht zu sehen ist, in und um dem sich mit der Zeit, doch für gewöhnlich nicht vor 14 Tagen, kleine Knötchen deutlich machen, die gleichfalls bei durchfallendem Lichte am besten zu erkennen sind. Eine solche Cultur, welche bereits 8 volle Wochen alt und noch immer vorgeschritten ist, hat zu beiden Seiten des Impfstiches kaum mehr als $\frac{1}{2}$ cm Ausdehnung, während die Länge wesentlich von dem Impfstich abhängt, doch erfolgt die Ausbreitung etwas mehr nach unten, indem die kleinen punktförmigen Heerde mehr dahin vorschreiten. Bei vielen Culturen überwiegen diese die rasenförmige Verbreitung vollkommen und folgen in ihrer Anordnung dem Gesetz der Schwere. Sie stammen von den disseminirten Sporen her, dem Resultat der etwa zwischen dem 10. und 14. Tage bemerkbaren Fructification. Mikroskopisch stimmen die in den Culturen enthaltenen Vegetationen völlig mit den im Thierkörper auftretenden überein, natürlich abgesehen von der Verkalkung, die in den Culturen nicht eintritt. Ausser sehr zahlreichen Sporen, welche mit denen mancher Schimmelpilze übereinzustimmen scheinen, sieht man einen dichten Wald der bekannten keulenförmigen Mycelien in der zum Theil noch auf dem Objectträger trotz grosser Zerbrechlichkeit der Elemente erhaltenen typischen centrifugalen Anordnung. Unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrösserung zeigt die Begrenzung der Rasen einen zackigen Rand, von dem Charakter dessen, was man bei Geschwüren serpiginos nennt; dabei schreitet dieser Saum recht gleichmässig nach beiden Seiten vom Impfstiche aus vor.

Auf die botanischen Verhältnisse des *Actinomyces* will ich hier noch nicht eingehen, sondern nur von der auffälligsten Eigenthümlichkeit des Parasiten berichten, nemlich der ganz überraschenden Widerstandsunfähigkeit desselben gegen gewisse Einwirkungen, welche anderen Pilzen gegenüber indifferent erscheinen. Ausserordentlich bald treten Quellungserscheinungen auf bei Zusatz von verschiedenen Flüssigkeiten, bei den einen langsamer, bei anderen rascher, die bis zum vollständigen Zerfall der gequollenen Mycelien führen, während die Sporen widerstandsfähiger sind. Obenan steht bei den Flüssigkeiten destillirtes Wasser, Glycerin und Mischungen beider in verschiedenen Verhältnissen. Relativ lange bleibt die Form in Laugen, 2—10pro-

centigen und stärkeren Lösungen, erhalten, ebenso in starken Mineralsäuren. Auch das flüssige Blutserum, wie 0,6procentige Kochsalzlösung führen Quellungen herbei und sind auf diese wohl die vermeintlichen Wachstumserscheinungen zu reduciren, welche Johne und Andere zum Theil völlig mit den Quellungen übereinstimmend beschreiben. Um derartige Beobachtungen zu machen bedarf es nicht der Culturen. An fein zerzupften Pilzkörnern aus den Geschwülsten kann man, nachdem man sie mit Salzsäure aufgeschlossen, dieselben Veränderungen wahrnehmen. Ein relativ gutes Conservierungsmittel ist leicht erwärmte 10procentige Gelatinelösung, wenn man sie schnell erkalten lässt, während die bei anderen Pilzen so erfolgreiche Trockenmethode ganz unscheinbare, zur völliger Unkennbarkeit geschrumpfte Präparate liefert.

Steht somit der Strahlenpilz durch seine ausserordentliche Vulnerabilität im grössten Gegensatz zu allen bekannten Mikroparasiten, so erklärt sich auch aus diesem Verhalten das Fehlschlagen aller früheren Culturversuche wie mancher Impfungen; auch Ponfick's Erfahrung, dass nur Geschwulststücke mit Pilzkörnern zur Uebertragung der Krankheit tauglich waren, findet hierdurch ihre Erklärung. Bei dem ausserordentlich langsamen Wachsthum war es mir bisher noch nicht möglich, Versuche über eine etwaige Differenz fructificirender und noch sporenfreier Culturen anzustellen, überhaupt ist es zweifelhaft, ob es auf dem von mir eingeschlagenen Wege gelingen wird, zur Sporenentwicklung noch nicht gelangte Culturen in der zu wirksamer Impfung erforderlichen Quantität zu erhalten. Vielleicht wird es nöthig sein, die Ernährungsverhältnisse zu alteriren und denen des Thierkörpers noch ähnlicher zu gestalten. Während ich im Thierkörper niemals mit Sicherheit Sporen entdecken konnte, scheint die Fructification bei der reichlicheren Sauerstoffzufuhr in den Reagenzglas-Culturen regelmässig innerhalb der oben angegebenen Zeit einzutreten. Der *Actinomyces* stände sonach in Bezug auf seine Unfähigkeit, im Körper Sporen zu bilden, mit den Schimmelpilzen auf einer Stufe. Auch das mehrfach berichtete Versagen intravenöser Injectionen bei Uebertragungsversuchen lässt sich hierdurch möglicherweise aufklären, indem man annehmen muss, dass zu lange Berührung der Pilz-

massen mit dem circulirenden Blute ihr Wachsthumsvermögen aufhob, während bei den gelungenen Experimenten proliferationsfähiges Material erhalten blieb, sei es in Folge der Grösse der eingebrachten Pilzkörner, oder durch völlige Verstopfung von Lungencapillaren. Es wäre allerdings möglich, dass sich in dieser Beziehung Blutplasma und ganzes Blut anders verhielte, als das Serum. Da sich diese Frage nur auf dem Schlachthofe mit Sicherheit entscheiden lässt, habe ich noch keine darauf bezüglichen Versuche angestellt.

Aus allem Vorhergehenden ergibt sich, dass die Cultivirung, wie die mikroskopische Untersuchung der lebenden Pflanze eine aussergewöhnliche Rücksichtnahme auf ihre biologischen Bedürfnisse erheischt; vielleicht bieten die bei der Viehzucht üblichen Futterpflanzen die dem wählerischen Parasiten am meisten zusagende Ernährung und die Gelegenheit, an der Luft die Sporen zu reifen.

Um dem Strahlenpilz seine Stellung im System anzuweisen, ist es noch nöthig, die Continuität seiner Entwicklung in fortlaufender mikroskopischer Untersuchung festzustellen. Da sich Culturen in Salznäpfchen und in hohlgeschliffenen Objectträgern nicht über eine gewisse Zeit ausdehnen lassen, so habe ich mir kleine sehr dünnwandige, platte Fläschchen herstellen lassen, in denen nur wenige Tropfen Blutserum coagulirt werden. Ueber diese Methode, wie über andere Erfahrungen behalte ich mir vor, später zu berichten, nur möchte ich mir noch einen Hinweis erlauben, der vielleicht für die weitere Aufklärung mikroparasitärer Verhältnisse von Nutzen sein könnte. Nachdem wir jetzt einen Pilz kennen gelernt von so überraschender Hinfälligkeit gegenüber den üblichen Reagentien, muss man die Möglichkeit im Auge behalten, dass andere Organismen, welche nicht die glückliche Eigenschaft besitzen in solcher Ausdehnung zu verkalken wie der Strahlenpilz, sich vermöge ihrer Zartheit bei allen üblichen Einwirkungen der Wahrnehmung entziehen könnten. Vielleicht führen diesem Verhalten angepasste mikroskopische Methoden bei mancher ätiologisch dunklen Affection, deren parasitäre Entstehung man nach ihren Symptomen erwarten muss, noch zum Ziele.