

XIX.**Ein Beitrag zur Cultur des Bacillus Leprae.**

Von A. A. Kanthack M. B., B. S., F. R. C. S.

und

A. Barclay M. B.,

Members of the Leprosy Commission.
Simla, Ost-Indien.

Wie Professor C. Fränkel in seinem Grundriss der Bakterienkunde sagt, „ist es bisher nicht mit Sicherheit ge-glückt, die Leprabacillen ausserhalb des Körpers künstlich zu züchten, und noch weniger von derartigen Culturen aus die Krankheit auf's Neue zu erzeugen“. Dr. Rake (Trinidad)¹ ist es nach jahrelangen Versuchen nicht gelungen Reinculturen zu bekommen, auch sind Campana's² Versuche erfolglos geblieben. Neisser's³ Resultate haben sich nicht bewährt, und die Ergebnisse von Burdoni Uffreduzzi⁴ müssen mit gewissem Zweifel angesehen werden, denn erstens hat er zu seinen Culturversuchen nicht einmal frische Leichen benutzt, und zweitens entstammte sein Impfmaterial dem Knochenmark. Durch Färbungen hat aber, so viel wir wissen, Niemand ausser ihm bis jetzt Leprabacillen im Knochenmark gefunden. Dr. Kaurin⁵, der dieser Sache besondere Aufmerksamkeit zugewandt hat, spricht sehr entschieden gegen ein Vorkommen dieser Bacillen im Marke, und es scheint deshalb a priori nicht ganz unwahrscheinlich, dass es sich bei Uffreduzzi nicht um Leprabacillen handelte. Drittens stimmten auch seine künstlich gezüchteten Bacillen morphologisch nicht ganz mit den Leprabacillen im Gewebe überein. Obgleich nun Baumgarten⁶ Uffreduzzi's Resultaten einige Wahrscheinlichkeit einräumt, haben doch viele Autoren ihre wohl begründeten Zweifel an denselben ausgesprochen. Ebenso lassen sich auch Gianturco's⁷ und Boinet's⁸ Behauptungen anzweifeln. Bei letzterem zeigte sich ein Wachsthum meistens am sechsten Tage auf gewöhnlichem Agar-Agar,

und er beschreibt das morphologische Aussehen der Bacillen mit folgenden Worten: „les unes sont rondes et punctiformes représentant sans doute l'état sporulaire du bacille de la lèpre; les autres sont en chaînettes, d'autres en bâtonnets. Ce sont les diverses formes évolutives du même micro-organisme.“ Babes⁹, der, nebenbei gesagt, auch von Bacillen im Knochenmark spricht, glaubt erfolgreiche Culturen gehabt zu haben. Doch liessen sich seine künstlich gezüchteten Bacillen nicht nach der Koch-Ehrlich'schen Methode färben.

Wir waren nun ziemlich sicher, dass, vielleicht mit Ausnahme von Gianturco's Ergebnissen, alle diese Resultate anzuzweifeln seien, da wir voraussetzen, dass die Bacillen einer künstlich gezüchteten Reincultur morphologisch und tinctoriell mit den Bacillen im Gewebe übereinstimmen müssen. Das Thierexperiment muss natürlich sofort den Ausschlag geben, doch ist dieser ja bei der Lepra mit grossen Schwierigkeiten verknüpft, da nicht einmal Implantationsversuche mit Lepraknötchen so recht glücken. Helcher und Ortmann¹⁰ sind vielleicht die einzigen, die mit denselben Erfolg gehabt haben. Wenn wir aber von diesen Thierversuchen in unserer Kritik absahen, so hielten wir es um so mehr für nothwendig, dass in allen anderen Punkten ein einwandsloser Beweis geliefert werde, d. h. dass die künstlich gezüchteten Bacillen morphologisch mit den Bacillen, wie man sie in einem Lepraknoten findet, übereinstimmen und sich nach der Koch-Ehrlich'schen Methode oder der Ziehl'schen Modification derselben färben lassen müssten.

Von dem Comité des National Leprosy Fund mit dem Studium des Aussatzes beauftragt, wandten wir natürlich unser Augenmerk auch der künstlichen Züchtung der Bacillen zu. Unsere ersten Versuche, mit Material aus dem Asyl zu Taru-Taran angestellt, fielen erfolglos aus, da alle Röhrchen von dem Staphylococcus albus überwuchert wurden. Wir bekamen frisches Material aus dem Asyl zu Sabathu. Wir wählten 3 Aussätzige aus, die an einer Mischform von Lepra (mixed leprosy) litten. Bei allen dreien war das Ohrläppchen enorm geschwollen, mindestens von der Grösse eines Taubeneies. Tags vorher wurde ein Vesicatorium auf das Läppchen behufs anderweitiger Studien applicirt. Zur Entnahme des Materials wurde

die Blase gesprengt, die Epidermis auf diese Weise gänzlich entfernt und das Ohrläppchen, das nun schön weiss aussah, mit 1 pro mille Sublimat gründlich gereinigt. Sodann wurde mit ausgeglühten Instrumenten, nachdem wir natürlich uns selbst desinficirt hatten, das ganze Läppchen abgetragen und sofort mit anderen ausgeglühten Instrumenten in 2 Theile zerlegt, und mit frischen ausgeglühten Messern und Pincetten aus dem Centrum der erkrankten Masse ein kleines Stückchen entfernt und schleunigst in ein Röhrchen mit sterilisirter Bouillon geworfen. Auf diese Weise erhielten wir 3 Röhrchen von 3 Patienten. Zwei Tage später, als wir die Röhrchen untersuchten, fanden wir in zweien derselben freie kleine Bacillen, die Tuberkelbacillen sehr ähnlich waren und sich, wie diese, auch nach Ziehl'scher Methode färben liessen. Es waren dies in der That zweifellose Leprabacillen, so weit man tinctoriell und mikroskopisch urtheilen konnte. Jedoch muss bemerkt werden, dass sie sich mit wässrigem Methylenblau gut färben liessen und auf die Gram'sche Methode äusserst gut reagirten.

Da nun diese Bacillen frei in der Bouillon waren und stets, ohne dieselbe zu schütteln, erhalten werden konnten, so wurde unsere Hoffnung auf Erfolg rege, und am 13. April impften wir ein Glycerin-Agar-Röhrchen ein. Da wir jedoch keinen Wärmeschrank besassen, musste einer von uns sich bequemen, das Röhrchen Tag und Nacht an seiner Person zu tragen.

Schon am nächsten Tage konnten wir auf der Oberfläche des Agar einen kleinen durchsichtigen Tropfen wahrnehmen, und am 4. Tage fing ein leichtes Wachsthum in der Tiefe an: kleine zarte Härchen wurden im Agar bemerkt. Am 18. April, d. i. nach 5 Tagen, war die ganze Oberfläche mit einem grauweissen Häutchen bedeckt, welches sehr uneben war und den Anschein hatte, als ob die Oberfläche mit Thautropfen belegt wäre. Die mikroskopische Untersuchung zeigte uns einen kleinen zarten Bacillus, der mit Fuchs in wie der Bacillus leprae reagirte und in der That eine Reincultur des in der Bouillon gefundenen Bacillus war.

Seitdem haben wir nun von diesem Agar-Röhrchen und den beiden Original-Bouillon-Röhrchen weiter geimpft und stets gleiche Resultate gewonnen. Agarplatten, die von den ursprünglichen

Bouillon-Reagenzgläsern angelegt wurden, zeigten nur diesen einen Bacillus.

Wir zögerten nicht, unsere Ueberzeugung auszusprechen, dass es uns gelückt sei, eine Reincultur des Aussatzbacillus zu bekommen, denn wir hatten einen Bacillus, der morphologisch dem Leprabacillus entsprach und sich nach der Ziehl'schen Methode färben liess. Wir fanden jedoch, dass, obgleich anfangs die Cultur auf Agar das Fuchsin gut festhielt, sie nach einigen Tagen fast gänzlich entfärbt wurde. Es wurde nun von dem Agar auf Glycerin, Bouillon und Gelatine geimpft, und es ergab sich, dass dann die Bacillen bedeutend resistenter gegen 20 pCt. Acidum hydrochloricum wurden und fast ausnahmslos die rothe Färbung behielten. Hierüber weiter unten. Natürlich kann nur das Thierexperiment den entscheidenden Ausschlag geben, doch haben wir hier noch keine Erfolge gehabt.

Wir werden jetzt einige kurze Bemerkungen über das Wachsthum unseres Bacillus auf den verschiedenen Nährböden machen.

1) In Glycerin-Bouillon wächst der Bacillus leicht und schnell, und ist ein Wärmeschränk nicht einmal nothwendig. Denn wir fanden, dass bei Zimmertemperatur — allerdings indischer Art — derselbe schnell zum Wachsthum kommt. Die Bouillon bleibt klar und nach 10—17 Tagen hat sich ein Häutchen auf der Oberfläche gebildet, das dem Belag auf dem Agar völlig entspricht. Ehe dieses Häutchen sich bildet, reagiren die Bacillen schlecht nach der Ziehl'schen Färbemethode, doch sobald es deutlich entwickelt war, fanden wir, dass sämmtliche Deckglässchen die rothe Färbung gut behielten, obgleich in einigen Fällen eine Anzahl von Bacillen zweifelsohne entfärbt wurde. Die Bouillonschicht unmittelbar unter dem Häutchen wird schleimartig und lässt sich mit der Platinnadel in Fäden ausziehen. Es scheint also, dass an diesem Bacillus wenigstens die Resistenz gegen Säuren auf chemischen und biologischen Veränderungen beruht. Morphologisch glichen die in der Bouillon gezüchteten Bacillen auch mehr wie je dem Leprabacillus, wie man ihn im Gewebe findet.

2) Im hängenden Bouillontropfen wurden langsame Eigenbewegungen beobachtet, doch haben wir eine Sporenbildung nicht bemerken können.

3) Gelatineculturen wurden angelegt von dem Originalröhrchen und der ersten Agarcultur, und bei Zimmertemperatur bewahrt. In den Röhrchen zeigte sich schleunigst ein leichtes Wachsthum entlang dem Nadelstiche, und bald fing die Gelatine an sich zu verflüssigen. Dies geschieht in einem weiten Trichter. Gleichzeitig bildet sich ein Häutchen auf der Oberfläche, das dem, welches man auf der Bouillon findet, genau entspricht. Wie dort, fanden wir auch hier, dass, sobald dieses Häutchen sich gebildet hat, die Bacillen gegen Säuren resistent werden und die verflüssigte Gelatine unmittelbar unter demselben zähe und schleimartig wird.

4) Glycerin-Agar-Culturen sind von uns bis jetzt bis in die 4. Generation angelegt, und ist das Wachsthum immer ein gleiches geblieben. Nach einigen Tagen ist die Oberfläche von einem Häutchen, wie wir es eben geschildert haben, bedeckt. In den jüngeren Generationen war das Wachsthum bedeutend schneller, als in den ersten Versuchen. Wenn wir nun die Agarcultüren untersuchten, fanden wir stets, dass in den jungen Culturen die Ziehl'sche Methode ziemlich gute Resultate gab. Doch bald verloren die Bacillen ihre Widerstandskraft gegen Säuren. Mit zunehmendem Alter gewannen sie diese Kraft wieder, und obgleich sie die rothe Färbung niemals so fest hielten, wie Leprabacillen im Gewebe, so war doch die Reaction ausgesprochen genug und, mit den obigen Resultaten verglichen, geeignet, den Glauben in uns wach zu rufen, dass hier eine Veränderung, durch die Beschaffenheit des Nährbodens bedingt, vorliegen müsse, die einen grossen Einfluss auf die Färbereaction ausübt, um so mehr, als durch Ueberimpfungen auf Bouillon oder Gelatine die Bacillen wieder an Resistenz gewannen.

5) Auf Kartoffeln, die nach Roux'scher Methode bereitet waren und in Reagenzgläsern bewahrt wurden, zeigte sich auch nach 27 Tagen kein Wachsthum, nicht einmal bei Körpertemperatur. Einige Kartoffeln wurden neutralisiert und schwach alkalisch gemacht, trotzdem blieben alle Culturversuche erfolglos.

Wie schon oben bemerkt wurde, bekamen wir identische Resultate von zwei Fällen. Das 3. Röhrchen war leider von einem Staphylococcus überwuchert. Der Grund hiervon war unserer Meinung nach die Thatsache, dass bei der Entnahme des Knöt-

chens wir der Haut zu nahe kamen und, wie sich herausstellte, mehrere Haarbälge in dem Stückchen sich befanden.

Wir fanden ferner, dass der Bacillus, der in den Originalröhren sich befand, mit der Zeit die Eigenschaft, sich nach der Koch-Ehrlich'schen Methode zu färben, mehr oder weniger einbüste, dass jedoch, auf Gelatine oder Glycerin-Bouillon übertragen, sobald sich das Häutchen bildete, er wieder an Widerstandskraft gegen Säuren gewann.

Nach der Gram'schen Methode liessen sich alle Bacillen, ob auf Bouillon, Agar oder Gelatine gezüchtet, gut färben. Die einzigen Unterschiede zwischen unserem künstlich gezüchteten Bacillus und dem Leprabacillus im Gewebe sind daher die folgenden: 1) unser Bacillus färbt sich leichter mit wässrigem Methylenblau; 2) er ist nicht so resistent gegen Säuren, und eine gewisse Anzahl von Bacillen wird wahrscheinlich stets entfärbt. Das Deckgläschen darf nur 2—3 Secunden in 20prozentiger Salzsäure bewegt werden, d. h. bis es gelblich grün geworden ist, und in 60prozentigem Alkohol nur so lange verweilen, bis die rothe Färbung fast gänzlich verschwunden ist, d. h. es muss genau nach den Vorschriften für den Tuberkelbacillus gefärbt werden. Wir dürfen hoffen, die Bedingungen zu finden, welche dem künstlich gezüchteten Bacillus eine absolute Resistenzen gegen Säuren gewähren, und führen augenblicklich unsere Versuche in dieser Richtung fort.

Wir erwähnen zum Schlusse, dass wir Röhren und Präparate an Herrn Professor C. Fränkel (Königsberg) zur gefälligen Kritik geschickt haben. Inzwischen behaupten wir, dass es uns gelungen ist, einen Bacillus aus leprösem Gewebe zu züchten, der, so weit man nach seinem morphologischen und chemischen Verhalten zu urtheilen im Stande ist, ein gewisses Recht beanspruchen darf, als der *Bacillus leprae* angesehen zu werden.

Simla, New Club, 13. Mai 1891.

L i t e r a t u r.

1. B. N. Rake, British Med. Journal. 1888. Aug. 4 und Centralblatt für Bakteriologie. 1888. IV. S. 590.
2. Campana, Centralbl. für Bakteriologie. 1889. S. 701.
3. Neisser, in Baumgarten's Lehrbuch. II. S. 646.

4. Burdoni Uffreduzzi, Zeitschr. für Hygiene. III. 1887.
 5. Kaurin, Journal of the Leprosy Investigation Committee. No. 2. Feb. 1891.
 6. Baumgarten, Lehrbuch der path. Mykologie. Bd. II.
 7. Gianturco, Giornale della Assoc. Napol. di Med. e Nat. 1890. Fasc. 4. p. 403.
 8. Boinet, Revue de Médecine. Aug. 10. 1890.
 9. Cornil et Babes, Les Bactéries.
 10. Helcher und Ortmann, Berl. klin. Wochenschr. 1886. No. 9.
-

XX.

Kleinere Mittheilungen.

1.

Ein Rückblick auf meine makrobiotischen Berichte aus Griechenland bis zum Jahre 1886.

Von Dr. Bernhard Ornstein in Athen.

Im 70. Band dieses Archivs trat ich zum ersten Male mit einer makrobiotischen Notiz aus Griechenland in die Oeffentlichkeit. Es handelte sich in derselben um 7 Greise, welche im Laufe des December 1877 im Alter von nahezu 80—112 Jahren gestorben waren. Die Langlebigkeit dieser, zum Theil mir bekannten Personen erschien mir um so auffälliger, als ich im Laufe der Jahre auf verschiedenen Punkten des Landes manche vereinzelte Fälle hohen Alters zu beobachten Gelegenheit gehabt hatte, deren makrobiotische Bedeutung mir seiner Zeit entgangen war. Nachdem ich inzwischen Renan's Standpunkt des unveränderlichen Rassencharakters aufgegeben und die Ueberzeugung gewonnen hatte, dass das organische und geistige Leben der Völker auf klimatische und Bodeneinflüsse zurückzuführen sei, tauchte die Vermuthung in mir auf, dass die individuelle Lebensdauer in Griechenland eine verhältnissmässig längere sein könne, als im übrigen Europa. Hierzu kamen Erinnerungen an das klassische Alterthum aus meinen Studienjahren, nach welchen eine Anzahl von mustergültigen und unsterblichen Dichtern und Weltweisen jener Zeit ein hohes Alter erreicht hatten. Wie dem auch sei, diese wie immer schwachen Anhaltspunkte für makrobiotische Forschungen brachten mich schliesslich auf die richtige Fährte. Auf mein desfallsiges Ersuchen gestattete man mir bereitwillig, sowohl seitens der Demarchie (Bürgermeisterei), als der Polizedirection die Einsicht