Ueber die Reinzüchtung des Gonococcus Neisser. ¹⁾

Von

Dr. **J. Jundell** und **C. G. Åhman** in Stockholm.

Nachdem Neisser ²⁾ 1879 die Gonococcen entdeckt hatte, wurde, was die Cultur derselben betrifft, der erste grosse Fortschritt von Bumm ³⁾ gemacht, dem die Reinzüchtung der Gonococcen auf menschlichem Blutserum gelang. Bumm war auch der erste, der Inoculationsversuche an Menschen mit positivem Resultat anstellte. Bockhart ⁴⁾ versuchte die Reinzüchtung der Gonococcen mittelst des Plattenverfahrens, wobei er Mischungen von Menschenserum und Agar anwandte. Die Ergebnisse seiner Versuche sind zweifelhaft. Hierauf kam Wertheim ⁵⁾ mit erfolgreichen Versuchen. Blutserum, welches bis zu 40° C. erwärmt und mit gonorrhöischem Eiter inficirt worden war, wurde mit Agar untermischt, das er bei dieser Temperatur flüssig hielt. Von der Mischung wurden Platten

¹⁾ Vortrag, gehalten in der Schwedischen Gesellschaft der Aerzte am 21. April 1896.

²⁾ Centralblatt für die medic. Wissenschaften. 1879. Nr. 28.

³⁾ Der Mikroorganismus der gonorrhöischen Schleimhautentzündung: „Gonococcus Neisser“. 1885. 2. Aufl. 1887.

⁴⁾ Beitrag zur Kenntniss der Gonococcen. Monatshefte für prakt. Dermatologie. Band V. 1886 Nr. 10.

⁵⁾ Deutsche medicin. Wochenschrift. 1891 und Die ascendirende Gonorrhoe beim Weibe. Archiv f. Gynäkologie. 1892.

gegossen, auf denen Wertheim isolirte Colonien von Gonococcen erhielt. Wertheim zeigte, dass die Gonococcen am besten auf einer Mischung von 2 bis 3 Theilen Agar und 1 Theil Menschenserum wuchsen und dass diese Mischung für ihre Züchtung besser als blosses Menschenserum war. Wertheim machte 5 Inoculationsversuche an Menschen, alle mit positivem Resultat. Wichtige Modificationen der Wertheim'schen Methode wurden von Finger, Ghon und Schlagenhauser¹⁾ gemacht, welche Gonococcencultur dadurch erhielten, dass sie etwas Eiter auf einen kleinen Platinspatel nahmen und ihn damit auf vorher gegossene Platten ausstrichen. Dadurch wurde die bei Wertheim's Methode nothwendige, aber für die Gonococcen „lebensgefährliche“ Erhitzung bis zu 40° C. vermieden, welche die Wertheim'sche Methode unsicher machte. Finger, Ghon und Schlagenhauser zeigten auch, dass sich anstatt des schwer zu beschaffenden Menschensersums, wenn auch nicht mit gleich gutem Erfolge, steriler Harn und Agar, in den gleichen Mengen wie Serum und Agar gemischt, anwenden lassen. Die genannten Verfasser wandten auch Pfeiffer's Blutagar mit positivem Ergebniss an.

Ungefähr gleichzeitig gab Franz Král in Prag im Archiv für Dermatologie und Syphilis eine vereinfachte Methode für die Herstellung von Nahrungssubstraten für Gonococcen an. Serum wurde mit Agar gemischt, bis zu 100° C. erhitzt, filtrirt und sterilisirt. Dieses that Král in dem Glauben, dass die bei der Erhitzung ausfallenden Eiweisskörper für die Gonococcencultur nicht nöthig seien. Král hat keine Inoculationsversuche an Menschen angestellt. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen sind zweifelhaft. Ganz sicher unrichtig sind die im Centralblatt für Bakterien- und Parasitenkunde im Juli 1894 veröffentlichten Angaben des Spaniers Turró, nach welchen ungemischter steriler Harn ein guter Nahrungsboden für die Gonococcen sei, die Gonococcen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur auf saurer Gelatine wachsen und bei Hunden, in die Urethra derselben eingeimpft, Urethritis und oft Cystitis, Pyelo-

¹⁾ Beiträge zur Biologie des Gonococcus etc. I. Zur Cultivirung des Gonococcus. Archiv f. Dermat. u. Syph. Bd. 28. 1894.

nephritis und allgemeine Pyämie hervorrufen. Inoculationsversuche an Menschen hat Turró nicht gemacht. Wir haben die Richtigkeit seiner Angaben nicht zu constatiren vermocht. Im März 1895 berichtete Kiefer über seine Untersuchungen (referirt in der Berliner klin. Wochenschrift). Kiefer wendete die Ausstrichmethode von Finger, Ghon und Schlagenhauer an, für deren Erleichterung er sich eines mehr peptonhaltigen (5 Proc.) und mehr festen (3—4 Proc.) Agars bediente, in welches er ein Drittel Ascitesflüssigkeit mischte, die einer fractionirten Sterilisation unterworfen worden war. Wir haben durch ein genaues aseptisches Verfahren den Ascites sofort steril bekommen. Im Vergleich mit dem Menschenserum sind der Ascites und die ebenfalls anwendbaren inflammatorischen Exsudate relativ leicht zu beschaffen. In Uebereinstimmung mit der von Wertheim, Finger, Ghon und Schlagenhauer ausgesprochenen Ansicht von der Begehrlichkeit der Gonococcen nach Pepton hat Kiefer sein Agar mit 5 Proc. Pepton versetzt.

Eigene Untersuchungen.

Bei unseren Untersuchungen, die wir angestellt haben, um zu erfahren, welchen praktischen Werth die verschiedenen Methoden der Reincultivirung der Gonococcen besitzen, versuchten wir zuerst Turró's Methode, die uns die einfachste zu sein schien. Wir unterwarfen Urin fractionirter Sterilisirung durch Erhitzung bei 85° C. und brachten dann Trippereiter hinein. Ebenso liessen wir den Patienten in eine sterile Probirröhre harnen. Nach Turró bekommt man in beiden Fällen in der oberen klaren Schicht eine nahezu volle Reincultur von Gonococcen. Dadurch, dass man nun eine Platinöse von der Oberfläche in einem Glase aushebt und in neuen sterilen Harn bringt und dass man dieses mehreremale wiederholt, sollte man also Reinculturen von Gonococcen erhalten, ganz ebenso, wie man solche von Cholerabakterien in Peptonwasser erhält. Wir machten in dieser Weise zahlreiche und energische Versuche und wir bekamen auch, wenn nicht absolute Reinculturen von Gonococcen, so doch wenigstens Culturen von Diplococcen, die

den Gonococcen sehr ähnlich waren. Dieselben waren jedoch nur mit Schwierigkeit nach Gram's Methode abzufärben. Die Gonococcen färben sich dagegen mit grosser Leichtigkeit, in einem nicht allzu dicken Präparat sicher in 15 Secunden ab. Die genannten Diplococcen liessen sich übrigens auf den gewöhnlichen Substraten, wie Agar, Gelatine, Fleischbrühe u. s. w. cultiviren, was zusammen mit den anderen Umständen sicher zeigt, dass es keine Gonococcen sind, was man mit Turró's Verfahrungsweise erhält. Hierauf prüften wir Wertheim's Methode, wobei wir uns Serum in der von Bumm vorgeschlagenen Weise durch Auspressen von Placenten verschafften. Gleichzeitig erhielten wir sterilen Ascites von einem Patienten mit Lebercirrhosis. Durch diesen Ascites liess sich mit Vortheil das Menschenserum ersetzen. Mit ihm machten wir Plattenculturen nach Wertheim's Methode, wobei wir 2proc. Glycerinagar anwandten. Wir machten fünf solche Versuche und es gelang uns, bei zweien davon Gonococcencolonien zu erhalten, die sowohl makro- wie mikroskopisch mit Wertheim's Beschreibungen übereinstimmten. Die Schwierigkeiten und die Unsicherheit der Wertheim'schen Methode einsehend, wendeten wir uns der Finger'schen Ausstrichmethode zu, wobei wir zugleich Rücksicht auf die Vortheile nahmen, die nach Kiefer durch ein festeres Nahrungssubstrat und einen höheren Peptongehalt gewonnen werden. Wir fabricirten deshalb Agar nach Kiefer's Recept (3—3½ Proc. Agar, 5 Proc. Pepton, 2 Proc. Glycerin, neutrale Reaction). Diesen Agar haben wir nachher immer angewendet und als ausgezeichnet befunden. Wir mischten zuerst einen Theil Menschenserum und zwei Theile Agar zusammen und stellten dann mit dieser Mischung zwei Versuche mit gutem Erfolge an. Auf Grund der Schwierigkeit, Menschenserum zu erhalten, ist diese Methode unpraktisch, weshalb wir zu einer Mischung von 1 Theil Ascites und 2 Theilen Agar, nach Kiefer's Vorschrift bereitet, übergingen. Diese Mischung wurde in Petri'schen Schalen zu Platten gegossen. Auf diese Platten wurden Strichculturen nach Finger durch Bestreichen des Nährsubstrates mit einem Platinspatel, auf welchen etwas gonorrhöischer Eiter aufgenommen worden war, angelegt. In den Strichen

erhielten wir reichliche und gut isolirte Culturen von Gonococcen, die hier ebenso gut wie auf Mischungen von Menschenserum und Agar vegetirten. Nach dieser Methode untersuchten wir 45 männliche Gonorrhoeen, von denen die meisten acut oder sub-acut und nur eine geringere Anzahl chronisch waren. Bei diesen 45 Patienten misslang die Cultur in 3 Fällen. Der eine dieser 3 Fälle war eine chronische Gonorrhoe, wo Gonococcen mikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnten und wahrscheinlich auch nicht vorhanden waren. In einem anderen chronischen Fall wurden Gonococcen in der Cultur erhalten, obschon sich mikroskopisch im Secret keine nachweisen liessen. Ausser in den genannten Fällen von Tripper haben wir die Methode in 3 Fällen von Vulvovaginitis und in einem Fall von Bartholinitis bei Kindern, wo überall ein positives Resultat erhalten wurde, sowie in 1 Falle von Blennorrhoea neonatorum, ebenfalls mit positivem Resultat, geprüft.¹⁾

Um uns zu vergewissern, dass wir in unseren Culturen wirklich Gonococcen hatten, haben wir einen Inoculationsversuch an einem hierfür Geeigneten, einem altem Syphiliskranken mit tertiären Symptomen, gemacht. Eine Reincultur, 3. Generation, wurde am 22. März im Krankenhause St.

¹⁾ Nachdem wir diesen Vortrag gehalten hatten, haben wir noch 6 Culturversuche mit männlichen Gonorrhoeen, 2 mit Vulvovaginitis und 1 mit Bartholinitis, alle mit positivem Resultat, gemacht. Ebenso haben wir verschiedene Fälle von Prostatitis untersucht, wobei wir in folgender Weise vorgegangen sind: Zuerst wurde mit dem Catheter die Pars pendula der Urethra ausgespült, worauf der Patient eine kleine Menge Harn liess, der das Secret aus dem hinteren Theile der Urethra mitnahm, welches nach Centrifugirung sowohl direct mikroskopisch, wie durch Culturversuche untersucht wurde. Hiernach wurde die Prostata von Rectum aus massirt, worauf der Patient wieder eine geringe Menge Harn liess, der mehr oder weniger reichlich Prostatasecret enthielt, das nach der Centrifugirung ebenfalls direct mikroskopisch und durch Culturversuche untersucht wurde. In einem der in dieser Weise untersuchten 5 Fälle wurden vom Prostatasecret Gonococcenculturen erhalten, obwohl mikroskopisch weder darin, noch anderwärts Gonococcen nachgewiesen werden konnten. In einem anderen Fall wurden Gonococcen im Prostatasecret sowohl bei der mikroskopischen, wie bei der bakteriologischen Untersuchung gefunden. Die übrigen 3 Fälle gaben bei der Untersuchung nach beiden Methoden ein negatives Resultat.

Göran in die Urethra dieses Patienten, der nie eine Gonorrhoe gehabt, mit dem Resultate inoculirt, dass sich bei ihm am Tage darauf eine Gonorrhoe einstellte, die einen gelinden Verlauf nahm, von der er aber jetzt, nach einem Monat, noch nicht hergestellt ist. Von dieser artificiellen Gonorrhoe haben wir wiederholentlich Reinculturen von Gonococcen erhalten. Wir theilen hier die Tagesaufzeichnungen über diesen Fall mit.

Den 23./3. Schwacher purulenter Fluss; Gonococcen theils frei, theils in Zellen.

Den 24./3. Vermehrter purulenter Fluss; Gonococcen in grosser Menge, in Zellen gruppirt. Culturen auf Ascitesagar. Behandlung mit Bleizinklösung.

Den 25./3. Vermehrter Fluss, unbedeutende inflammatorische Veränderungen; weder Morgen noch Mittag Gonococcen in dem purulenten Secret zu entdecken.

Den 26./3. Dicker purulenter Fluss; Gonococcen in Menge.

Den 27./3. Dicker purulenter Fluss; die Inflammation gering; Gonococcen in geringer Zahl.

Den 30./3. Reichlicher purulenter Fluss; Gonococcen in geringer Zahl.

Den 4./4. Dicker mucopurulenter Fluss.

Den 8./4. Geringer purulenter Fluss; Culturen auf Ascitesagar.

Den 9./4. Sehr unbedeutender Fluss.

Den 15./4. Spärlicher purulenter Fluss; Culturen auf Ascitesagar.

Den 25./4. Nach der Haltung dieses Vortrages und nachdem der Patient 2 Ausspülungen nach Janet bekommen hatte, waren Gonococcen sowohl direct im Secret, wie durch Cultur nachweisbar.¹⁾

Was das Aussehen der Gonococcenculturen betrifft, so haben wir den von Finger und Kiefer gegebenen Beschreibungen derselben wenig hinzuzufügen. Die Strichculturen bilden kleine punktförmige, bis stecknadelkopfgrosse Höcker, die oft im Striche zu einer einzigen Masse zusammenwachsen. Zuweilen messen jedoch die isolirten Colonien 3—4 Mm. im Diameter. In auffallendem Lichte sehen sie graulich-gelatinös aus, einen stärkeren oder schwächeren hellbraunen Anstrich zeigend, in durchfallendem Lichte sind sie mehr blaugrau und stark lichtbrechend. Im Mikroskop bei schwacher Vergrösserung gesehen, zeigen sie Anfangs einen unregelmässig gekerbten, später, wenn sie ausgewachsen sind, einen gebuch-

¹⁾ Noch im Juli 1896 war der Patient nicht hergestellt und Gonococcen liessen sich im Secret nachweisen.

teten, zuweilen gefalteten Rand. In der Mitte sind sie grobkörnig, in der Peripherie feinkörnig. Sehr charakteristisch sind durch die Colonien laufende, jedoch nicht immer vorkommende radiäre Streifen.

Mit den solcher Weise gewonnenen Culturen haben wir nun experimentirt, um zu sehen, ob die Gonococcen auch auf anderen Substraten wachsen. Kein, auch nicht das geringste Wachsthum haben wir auf Gelatine (saurer sowohl wie alkalischer), Fleischbrühe oder sterilem Harn (saure Reaction) gesehen. Auf gewöhnlichem Agar haben wir ein einziges Mal eine sehr unbedeutende Cultur erhalten. Dagegen wachsen die Gonococcen vortrefflich in einer Mischung von Fleischbrühe und Ascites (2 zu 1) sowohl bei alkalischer, wie saurer Reaction und auf Pfeiffer's Blutagar.

Von grossem praktischen Werthe für die Reincultivirung und Isolirung der Gonococcen ist die Harnagarmethode von Finger, Ghon und Schlagenhauser. Wir unterwarfen gewöhnlichen sauren Harn einer fractionären Sterilisirung bei 85° C. Auf einer Mischung von 1 Theil Harn und 2 Theilen von Kiefer's Agar brachten wir nach Ausstreichung von gonorrhöischem Eiter die Gonococcen, freilich nicht immer, zum Wachsen. Des Vergleiches wegen führten wir eine Serie von Versuchen so aus, dass wir, nachdem wir gonorrhöischen Eiter auf eine Platte Ascitesagar ausgestrichen hatten, von demselben Eiter eine Ausstreichung auch auf eine Platte Harnagar machten. Wir stellten 9 solche Versuche an. Bei allen diesen 9 Versuchen erhielten wir auf den Ascitesagarplatten reichliche Gonococcen-colonien, wogegen wir auf den Harnagarplatten nur in 3 Fällen und dann auch nur sehr kleine und geringzählige Colonien von Gonococcen bekamen. Aus diesem Grunde sehen wir Harnagar als für die Reincultur von Gonococcen zu diagnostischen Zwecken unanwendbar an.

Anstatt des Ascites kann man auch inflammatorische Exsudate anwenden. Wir haben mit dem besten Erfolg den Erguss von einer, wie nachher bei der Obduction constatirt wurde, serösen Peritonitis, die in Folge einer vorhergegangenen Perforation eines Ulcus ventriculi entstanden war, angewandt, welcher Erguss aseptisch aufgesammelt wurde und steril ver-

blieb. Nach Nicolaisen (Hospitalstidende, April 1896) kann man in derselben Weise pleuritische Exsudate anwenden. Král's Angabe, dass Agar, in welchem sich alle Bestandtheile des Blutsersums, ausser den Eiweissstoffen, finden, zur Gonococcencultur angewendet werden kann, nahmen wir zum Ausgangspunkt für einen Versuch mit einer Mischung, die wir aus 2 Theilen von Kiefer's Agar und 1 Theil Ascites herstellten, bis zu 100° C. erhitzten, filtrirten und sterilisirten, wodurch wir ein Substrat erhielten, in dem sich mit Ausnahme der Eiweissstoffe alle Bestandtheile des Ascites fanden. Auf diesem Substrat erhielten wir indessen keine Gonococcenculturen, was zu erwarten war, da nach Finger's Experimenten die Eiweissstoffe des Serums einen der hauptsächlichsten Nahrungsstoffe der Gonococcen bilden. Wir betrachten es deshalb für wahrscheinlich, dass Král, wie viele Andere, in seinen Culturen keine Gonococcen, sondern ihnen ähnelnde Diplococcen gehabt hat.

Die mikroskopische Diagnose der Gonococcen gründet sich auf Folgendes: Sie liegen in Gruppen in den Zellen, was wir auch bei der Injection von Reinculturen in das Peritoneum von Ratten, 12 Stunden nach der Injection wahrgenommen haben. Ein anderes Diagnosticum ist die Beweglichkeit der Gonococcen im hängenden Tropfen sowie auch, und ganz besonders, der Umstand, dass sie nach Gram's Färbungsmethode entfärbt werden. Viele andere Diplococcen lassen sich zwar auch nach Gram's Methode entfärben, dies jedoch nur mit grösserer oder geringerer Schwierigkeit. Färbt man dagegen die Gonococcen mit Gentianaviolett, gleichgiltig wie lange, behandelt sie nachher mit Gram's Jodlösung und färbt sie mit Alkohol ab, so schwindet die Farbe, wenn das Präparat dünn ist, beinahe auf einmal, in 10—15 Secunden. Ein gutes Characteristicum ist auch der schnelle Zerfall in der Cultur. Während die Peripherie einer Cultur lebt, besteht die Mitte derselben aus Involutions- und abgestorbenen Formen, die sich durch ihre verschiedene Grösse sowie oft vorkommende Anschwellung und den schliesslich eintretenden Verlust des Vermögens sich mit Methylenblau zu färben auszeichnen. Hiervon kann man sich leicht durch ein Klatschpräparat überzeugen.

Ueber Behandlung der Gonorrhoe mit Wärme.

Ueber die Temperaturen, bei denen die Gonococcen wachsen, resp. absterben, sind unsere Untersuchungen noch nicht abgeschlossen. Nur eine bei verschiedenen Verfassern vorkommende Angabe wollen wir schon jetzt etwas näher untersuchen. Diese Verfasser behaupten, dass die Gonorrhoe sich bei hohem Fieber verbessert und schlagen vor, sie mit Wärme zu behandeln. Dr. Welander hat uns mündlich mitgeteilt, dass er klinische Beobachtungen in entgegengesetzter Richtung gemacht habe. Auf seine Aufforderung haben wir deshalb einige Beobachtungen bei Gonorrhoeepatienten gemacht, die gleichzeitig Ulcus molle hatten und deshalb mit Wärme behandelt wurden.

Diese Fälle sind folgende:

Fall I. Gonorrhoe und weicher Schanker.

Den 8./4. Mässiger purulenter Fluss, wenige Gonococcen im Präparat; Reinculturen werden angelegt und geben positives Resultat. Der Patient wird mit Wärme behandelt.

Den 9./4. Nach 21-stündiger Anwendung von Wärme reichlicher purulenter Fluss. Zahlreiche Gonococcen im Präparat. Die Temperatur in der Urethra 40° C. Reichliche Culturen.

Den 11./4. Nach 70-stündiger Anwendung von Wärme reichlicher purulenter Fluss. Gonococcen in reichlicher Menge im Secret. Reichliche Culturen. Die Temperatur in der Urethra 40° C.

Fall II. Gonorrhoe und weicher Schanker.

Den 9./4. Spärliches Secret. Einzelne Gonococcen im Präparat. Der Patient wird mit Wärme behandelt.

Den 10./4. Mehr Gonococcen im Präparat.

Den 11./4. Lebhafter purulenter Fluss. Die Temper. in der Urethra 40·2° C. Reinculturen.

Fall III. Gonorrhoe und weicher Schanker.

Den 16./4. Mässiger Fluss, Gonococcen in geringer Menge im Präparat. Reinculturen. Behandlung mit Wärme.

Den 17./4. Nach 24-stündiger Behandlung mit Wärme vermehrter Fluss. Gonococcen in reichlicher Menge im Präparat. Die Temperatur in der Urethra 40·2° C.

Den 18./4. Nach 48-stünd. Behandlung mit Wärme; Reinculturen.

Fall IV. Gonorrhoe und weicher Schanker.

Nach 48-stündiger Behandlung mit Wärme reichliche Culturen. Die Temperatur in der Urethra 39·6° C.

Fall V. Gonorrhoe und weicher Schanker.

Nach 24-stündiger Behandlung mit Wärme spärliche Culturen auf Ascitesagar. Nach 48-stündiger Anwendung von Wärme reichliche Culturen. Die Temperatur in der Urethra 40·2° C.

Diese Beobachtungen sprechen nicht für die Behandlung der Gonorrhoe mit Wärme. Auch wenn es wahr wäre, dass die Gonococcen in der Cultur 40° Wärme nicht vertragen, so ist es doch immerhin unrichtig, hieraus zu schliessen, dass sie in einer inflammirten Schleimhaut bei derselben Temperatur sterben. Sie leben dort ganz sicher unter günstigeren Verhältnissen, als auf den artificiellen Nahrungssubstraten.