[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin.]
(Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky.)
(Abteilungsvorstand: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Wassermann.)

Über Meningokokkenserum.

Von

Dr. M. Onaka
(Japan).

Auf Anregung des Hrn. Geheimrat Wassermann habe ich zwei für die Wertbestimmung des Meningokokkenserums angegebene Methoden, nämlich die Komplementbindung und das Neufeldsche Verfahren (Bakteriotropine) an verschiedenen Meningokokkenseris vergleichend geprüft. Nachstehend möchte ich kurz die Resultate dieser Untersuchungen mitteilen.

Die Agglutination ist für die Wertbestimmung des Meningokokkenserums nicht verwendbar, da sie offenbar mit dem Heilwert des Serums nicht in Übereinstimmung steht. Auch werden verschiedene Stämme echter Meningokokken von einem und demselben Serum nicht gleich stark beeinflußt und ferner werden Stämme, die von einem Serum stark agglutiniert werden, von einem anderen Serum nur schwach agglutiniert und umgekehrt.

Aus Tabelle I und II sieht man, daß Institutsera viel mehr Agglutinin als andere Sera enthalten, und das Serum R. am schwächsten ist.

I. Über Komplementbindungsversuche mit Meningokokkenserum.

Die von Wassermann und Bruck sowie von Kolle und Wassermann (1) für die Wertbestimmung des Meningokokkenserums angegebene Komplementbindungsmethode habe ich an acht verschiedenen Seris geprüft.

Was die Technik meiner Untersuchungen betrifft, sei kurz folgendes angegeben:

1. als Antigen benutzte ich aus vier verschiedenen Meningokokkenkulturen hergestellten, polyvalenten wässerigen Extrakt. Herstellung: Der Bakterienrasen von mit Meningokokken beimpften, 24 Stunden bebrüteten

Tabelle I.
(Resultate nach 24 Stunden bei 37° abgelesen.)

Serum	Stamm	Serumverdünnung								Kontrolle	
		1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:1000	NaCl	N.-Ser.
Inst. I.	St. 683	+++	++	++	+	+	+	+	±	—	—
	St. Essen	+++	++	++	+	+	+	+	±		
	St. 100	+++	++	++	+	+	+	—	—		
Inst. II.	St. 683	+++	++	++	++	+	+	±	—		
	St. Essen	+++	++	++	+	+	+	+	—		
	St. 100	+++	++	+	+	±	—	—	—		
Ser. K.	St. 683	+++	++	+	+	±	—	—	—		
	St. Essen	+++	++	+	+	+	+	+	—		
	St. 100	+++	++	+	+	+	+	+	±		
Ser. F.	St. 683	++	+	±	±	—	—	—	—		
	St. Essen	++	+	+	+	+	±	+	—		
	St. 100	++	+	+	+	+	+	+	—		
Ser. P.	St. 683	+++	+	+	+	+	+	—	—		
	St. Essen	+++	++	++	+	+	±	±	—		
	St. 100	+++	+	+	+	+	+	+	—		
Ser. D.	St. 683	++	+	+	—	—	—	—	—		
	St. Essen	++	+	+	+	—	—	—	—		
	St. 100	++	+	+	+	—	—	—	—		
Ser. M.	St. 683	++	+	±	±	—	—	—	—		
	St. Essen	++	++	+	+	—	—	—	—		
	St. 100	++	+	+	—	—	—	—	—		
Ser. R.	St. 683	+	—	—	—	—	—	—	—		
	St. Essen	+	+	+	—	—	—	—	—		
	St. 100	—	—	—	—	—	—	—	—		

Tabelle II.
Versuch mit einem Stamm 495 gegen verschiedene Seris.

Serum	Serumverdünnung								Kontrolle	
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:1000	NaCl	N.-Ser.
Institut I	+++	++	+	+	+	+	+	—	—	—
„ II	+++	++	+	+	+	+	—	—	—	—
Serum K.	+++	++	+	+	+	+	—	—		
„ D.	+++	++	+	+	+	±	—	—		
„ P.	++	+	+	+	+	±	—	—		
„ F.	+	+	+	+	+	±	—	—		
„ M.	++	+	+	+	—	—	—	—		
„ R.	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Institutserum I = frisches Pferdeserum ohne Karbolzusatz.

Institutserum II = Serum mit Karbolzusatz.

Kolleschalen wird mit 3^{cem} destilliertem Wasser abgeschwemmt. Die Bakterienaufschwemmung wird 48 Stunden bei Zimmertemperatur im Schüttelapparat geschüttelt. Dann wird sie klar abzentrifugiert. Hierauf erfolgt Zusatz von 5 prozentiger Karbolsäurelösung, bis der Gesamtgehalt 0.5 Prozent Phenol beträgt. Ohne Serumzusatz hemmte dieser Extrakt allein in der Dosis von 0.15^{cem}, bei 0.1^{cem} fand sich komplette Lösung. In meinen Versuchen wurde daher eine Dosis von 0.05^{cem} verwendet,

2. als Antiserum wurden acht verschiedene Sera (zwei Institutsera, Ser. K., Ser. F., Ser. P., Ser. D., Ser. M. und Ser. R.) benutzt,

3. als Komplement diente frisches Meerschweinchenserum und zwar 1.0^{cem} einer 10 prozent. Lösung in physiologischer Kochsalzlösung,

4. als hämolytischen Amboceptor benutzte ich das Serum eines Kaninchens, welches mit Hammelblutkörperchen vorbehandelt war. Der hämolytische Titer dieses Serums war 0.001, Gebrauchsdosis betrug daher 0.002^{cem},

5. als Erythrozyten 1^{cem} einer 5 prozentigen Hammelblutkörperchen-aufschwemmung.

Tabelle III. Komplementbindungsversuch.

Serum	Extrakt	Normal-serum	R e s u l t a t e								
			Inst. II	Inst. I	Ser. D.	Ser. P.	Ser. F.	Ser. K.	Ser. M.	Ser. R.	Normal-serum
0.1	0.05	—	H.	H.	H.	H.	H.	H.	H.	H.	—
0.02	0.05	—	H.	H.	H.	H.	H.	S. H.	G. K.	K.	—
0.01	0.05	—	H.	H.	G. K.	G. K.	G. K.	K.	F. K. L.	K. L.	—
0.005	0.05	—	S. H.	G. K.	K.	K.	K. L.	K. K.	K. L.	K. L.	—
0.003	0.05	—	G. K.	K. K.	K. L.	K. L.	„	F. K. L.	„	„	—
0.0025	0.05	—	K.	F. K. L.	„	„	„	K. L.	„	„	—
0.002	0.05	—	K. K.	K. L.	„	„	„	„	„	„	—
0.001	0.05	—	K. L.	K. L.	„	„	„	„	„	„	—
0.1	—	—	„	„	„	„	„	„	„	„	—
0.02	—	—	„	„	„	„	„	„	„	„	—
0.01	—	—	„	„	„	„	„	„	„	„	—
—	0.05	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	K. L.
—	0.05	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	0.05	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	—	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	—	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„

H. = Hemmung, S. H. = Starke Hemmung, G. K. = Hemmung mit großem Kuppe, K. = Hemmung mit mittelgroßem Kuppe, K. K. = Hemmung mit kleinem Kuppe,

F. K. L. = Fast komplette Lösung, K. L. = Komplette Lösung.

Wie Tabelle III zeigt, binden die beiden Institutsera das Komplement am stärksten, das Serum R. am schwächsten. Die Reihenfolge der Sera nach ihrem komplementbindenden Vermögen geordnet ist wie folgt:

1. Institut II, 2. Institut I, 3. Ser. F., 4. Ser. D., 5. Ser. P., 6. Ser. K., 7. Ser. M., 8. Ser. R.

Dieser Versuch wurde wiederholt ausgeführt, jedesmal mit demselben Resultat. Wenn man diese Resultate mit den Ergebnissen der Agglutination vergleicht, so bemerkt man, daß beide Institutssera in fast gleichem Maße das Komplement binden und agglutinierend wirken.

Kraus und Baecher (2) behaupteten, daß einzelne Stämme mit bestimmten Seris sehr starke Ablenkung zeigten, mit anderen Seris aber, welche mit einem anderen Serum gleich wirksam waren, fast gar keine. Sie zogen daraus die Schlußfolgerung, daß eine Vielheit der komplementbindenden Körper im Serum vorhanden sein dürfte. Um diese Beobachtung nachzuprüfen, habe ich folgende Versuche mit Extrakten aus verschiedenen Stämmen und verschiedenen Seris ausgeführt.

Tabelle IV.

Serum	Institut II			Serum P.			Kontrolle o. Extrakt	
	Extrakt 495	Extrakt Essen	Extrakt 100	Extrakt 495	Extrakt Essen	Extrakt 100	Inst. II	Paltauf
0·1	H.	H.	H.	H.	H.	H.	F. K. L.	K. L.
0·02	H.	H.	H.	H.	H.	S. H.	K. L.	K. L.
0·01	H.	H.	H.	G. K.	G. K.	G. K.	—	—
0·005	S. H.	G. K.	G. K.	K.	K.	K.	—	—
0·003	G. K.	G. K.	G. K.	K. K.	K. K.	F. K. L.	—	—
0·0025	K.	K.	K.	K. L.	K. L.	K. L.	—	—
0·002	K. L.	K. L.	K. L.	K. L.	K. L.	K. L.	—	—

Wie aus der Tabelle IV hervorgeht, stimmen die Resultate der Versuche mit denjenigen der Tabelle III fast überein. Sie stehen insofern mit den Kraus-Baecherschen in Widerspruch, als ich mit allen Extrakten annähernd gleich starke Hemmung erhielt.

In weiteren Versuchen habe ich bei Herstellung des Extraktes Antiformin (3) verwandt. 10^{ccm} einer 2 prozent. Antiforminlösung brachten eine 24 stündige Agarkultur schon nach 30 Minuten zur Auflösung. Zur Neutralisierung bediente ich mich nach M. Neisser und Altmann 10 prozent. Schwefelsäurelösung, zur Entfernung des Chlors wurde der Extrakt 45 Minuten lang in ein Wasserbad von 50° C gebracht. Bei der Prüfung auf Eigenhemmung dieses Antiforminextraktes zeigte sich, daß dieselbe außerordentlich gering war, 0·5^{ccm} Menge von diesem Extrakte

gibt noch keine Hemmung. Folgende Tabelle zeigt einen Versuch mit Antiformin- und wässerigem Extrakt.

Tabelle V.

Serum	Resultate mit wässerigem Extrakt	Resultate mit Antiformin-Extrakt
0.1	H.	H.
0.02	H.	H.
0.01	H.	H.
0.005	H.	G. H.
0.003	G. K.	G. H.
0.0025	G. K.	K.
0.002	K.	K. K.
0.001	K. K.	K. L.
Kontrolle o. Extrakt		
0.1	K. L.	K. L.
0.02	K. L.	K. L.

Demnach sind auch Antiforminextrakte für die Zwecke der Komplementbindung geeignet.

II. Über Bakteriotrope-Wirkung mit Meningokokkenserum.

Die Tatsache, daß Meningokokkenserum bakteriotrop wirkt, ist zuerst von Jochmann (4) festgestellt worden; gleichzeitig fand dieser Autor, daß das Serum eine Phagozytose befördernde Wirkung nicht nur in vitro, sondern auch im Meerschweinchenperitoneum entfaltet. Kolle und Wassermann (1) teilten nach Untersuchungen Löhleins mit, daß Meningokokkenserum stets stärker bakteriotrop wirkt als normales Serum derselben Tierart. Flexner und Jobling (3) bemerkten bei ihren klinischen Beobachtungen, daß das Immunserum in der Spinalflüssigkeit der Meningitiden phagozytosebefördernd und Kokken abtötend wirkt. Daß der Aufnahme durch die Phagozyten eine Abtötung der Kokken folgt, behaupten Flexner, Neufeld und noch andere Autoren, und zwar bemerkt Neufeld (6) dabei, daß auch bei bakteriotropen Reagensglasversuchen, insbesondere bei längerer Ausdehnung derselben eine Degeneration der gefressenen Kokken sehr deutlich erkennbar ist; dieses Phänomen konnte ich auch in meinen Versuchen beobachten. Neufeld hat vorgeschlagen, die bakteriotrope Wirksamkeit des Meningokokkenserums als Maßstab für seine Wirksamkeit zu benutzen. Ich habe das Neufeldsche Verfahren an den oben genannten acht Seris nachgeprüft, um die Resultate mit denen der Komplementbindung zu vergleichen.

Bakteriotropin-Versuch.

Meningokokkenstamm 495 (eine 20 stündige Agarkultur) wird mit 1.0^{ccm} einer Mischung von gleichen Teilen Bouillon und Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Meerschweinchenleukozyten aus Peritonealexsudat (20 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 10^{ccm} Bouillon mit Aleulonat) werden in 1.5 prozent. Citratlösung aufgefangen, 2 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Serummenge: 0.01, 0.005, 0.0005, 0.0002^{ccm}. Technik nach Neufeld: = 2 gtt. Leukozytenaufschwemmung + 1 gtt. der Kulturaufschwemmung + 1 gtt. Serumverdünnung: 1¹/₂ Stunden bei 37° C, Ausstreichen auf Objektträger, Färbung mit Methylenblau.

Tabelle VI.

Serum- menge	Inst. I in Proz.	Inst. II in Proz.	Ser. M. in Proz.	Ser. K. in Proz.	Ser. D. in Proz.	Ser. F. in Proz.	Ser. P. in Proz.	Ser. R. in Proz.
0.01	+++80	+++75	++50	++60	++50	+42	+40	+35
0.005	+++70	++50	+40	+40	+40	+35	±30	±30
0.0005	+50	+40	+36	±30	±30	±30	—25	—25
0.0002	±30	±30	±30	—25	—25	—25	—25	—25
NaCl	—25	—	—	—	—	—	—	—
Normal- serum								
0.01	—28	—	—	—	—	—	—	—

Ich zählte immer je 100 Leukozyten in verschiedenen Gesichtsfeldern, und berechnete daraus die in obiger Tabelle wiedergegebenen Phagozytose-Indices. Danach erwiesen sich die zwei Institutssera als am stärksten bakteriotropisch wirksam; die anderen Sera kommen nach dem Grad ihrer Wirksamkeit geordnet in folgender Reihenfolge: Ser. M., Ser. K., Ser. D., Ser. F., Ser. P. und Ser. R. Das Resultat, daß die zwei Institutssera am stärksten wirksam sind, das Ser. R. aber am schwächsten die Phagozytose beeinflußt, stimmt mit den Ergebnissen des Komplementbindungsverfahrens gut überein. Bei den übrigen Seris zeigen sich aber die Resultate etwas anders.

Neufeld und Davis fanden in ihren Versuchen, daß die verschiedenen Meningokokkenstämme, die bereits mehrere Monate hindurch im Laboratorium gezüchtet worden waren, im Verhalten bei der Phagozytose einen Unterschied zeigen. Ich habe daher ebenfalls verschiedene Stämme geprüft und konnte die Angaben Neufelds bestätigen. Stamm 495 erwies sich als am stärksten wirksam und wurde daher zu den weiteren Versuchen benutzt. Dieser Unterschied hängt jedoch nicht von dem Alter der Kultur ab; denn ein ziemlich frischer Stamm, welcher nach Isolierung aus einer Spinalflüssigkeit nur kurze Zeit auf künstlichem Nährboden

fortgezüchtet worden war, phagozytierte schwächer als ältere Stämme. Dagegen zeigte sich bei allen Phagozytoseversuchen, daß die Aktivität der benutzten Leukozyten eine große Rolle spielt.

Der Phenolgehalt des Serums schädigt die Wirksamkeit der Leukozyten, so daß der bakteriotrope Titer eines Serums (0.0005) nach Phenolzusatz bis zu 0.002 herabgesetzt ist. Nach obigen Versuchen scheint es, daß der Komplementbindungstiter nicht stets identisch ist mit dem bakteriotropen Titer, wenn auch die meisten Resultate in beiden Versuchen miteinander übereinstimmen.

Da ich über diese meine Annahme Klarheit gewinnen wollte, habe ich noch einige weitere Versuche ausgeführt.

Mit zwei von Pferden durch Vorbehandlung mit Kultur bzw. mit Extrakt gewonnenen Immunseris habe ich zunächst die Komplementbindung ausgeführt. Es ergab sich, daß der Titer des Kulturserums 0.01, des Extraktserums 0.002 war. Im bakteriotropen Versuche verhielten sich die beiden Sera gerade umgekehrt, wie folgende Tabelle zeigt.

Bakteriotrope-Versuch.

Meningokokkenstamm 495.

Meerschweinchenleukozyten aus Peritonealexsudat.

Serummenge: = 0.01, 0.005, 0.002, 0.0005, 0.0002 ccm.

Serum I und II: = Kultur-Pferdesera.

Serum III und IV: = Extrakt-Pferdesera.

Tabelle VII.

Serummenge	I		II	
	Serum I in Prozenten	Serum II in Prozenten	Serum III in Prozenten	Serum IV in Prozenten
0.01	+ + 50	+ + 75	+ + 42	+ + 60
0.005	+ 40	+ + 65	+ 35	+ + 55
0.002	+ 35	+ + 58	± 30	+ 50
0.0005	— 25	+ 50	— 22	± 45
0.0002	— 20	— 40	— 20	— 40
NaCl	— 20	— 25	— 20	— 25
Normalserum				
0.01	— 25	— 40	— 25	— 40

Wie dieser Versuch uns lehrt, phagozytiert das Kulturserum stärker als das Extraktserum. Mit zwei von Kaninchen auf gleiche Weise gewonnenen Seris wurden analoge Resultate erzielt.

Kaninchen I.

- 8. VII. 3 Ösen vom Stamm 495 (lebend) subkutan injiziert.
- 17. VII. Probeentnahme vom Blut (kein Agglutinin).
- 21. VII. 6 Ösen vom Stamm 495 subkutan.
- 31. VII. Blutuntersuchung (Agglutination 1:50 $\pm$ Komplementbindung 1:50 K. K.)
- 15. VIII. 1 Aggarröhrchen subkutan.
- 24. VIII. 2 Ösen intravenös eingespritzt.
- 1. IX. 4 Ösen intravenös eingespritzt.
- 7. IX. Blutuntersuchung (Tabelle VIII).

Kaninchen II.

- 8. VII. 0.3 ccm Extrakt subkutan injiziert.
- 17. VII. Blutuntersuchung (Agglutination 1:100 schwach positiv).
- 21. VII. 0.6 ccm Extrakt subkutan.
- 31. VII. Blutuntersuchung (Agglutination 1:200 + Komplementbindung 1:100 K. K.).
- 15. VII. 0.5 ccm subkutan.
- 24. VIII. 0.4 ccm intravenös eingespritzt.
- 1. IX. 0.6 ccm intravenös eingespritzt.
- 7. IX. Blutuntersuchung (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.
Versuche mit Blut der Kaninchen I und II.

Serum	Kaninchen I			Kaninchen II		
	Agglutination	Komplementbindung	Bakteriotropin in Proz.	Agglutination	Komplementbindung	Bakteriotropin in Proz.
1:10	++	H.	++ 60	++	H.	++ 50
1:50	++	H.	—	++	H.	—
1:100	++	H.	+ 40	++	H.	+ 40
1:200	++	K.	—	++	G. K.	—
1:300	++	K. L.	—	++	K.	—
1:400	+	„	—	++	K. L.	—
1:500	+	„	+ 35	+	„	+ 32
1:1000	+	„	$\pm$ 30	$\pm$	„	— 20
Normalserum						
1:10	$\pm$	„	— 25	$\pm$	„	— 25
1:100	—	„	—	—	„	—
NaCl	—	„	— 20	—	„	— 20

Agglutination und Komplementbindungsvermögen des Serums von Kaninchen II ist stärker als bei Serum I. Bezüglich der Bakteriotropine ist das Verhältnis umgekehrt. Diese Resultate stimmen mit den Versuchen mit den Pferdeseris überein. Demnach läßt sich aus dem Komplement-

mentbindungstiter kein Rückschluß auf den bakteriotropen machen und umgekehrt.

Aus obigen Tierversuchen geht aber weiter hervor, daß die komplementbindenden Stoffe mit dem Immunisierungsgrad des Tieres parallel fortschreiten. Deshalb kann man dieses Verfahren, welches quantitativ konstante Ergebnisse liefert, als Wertbestimmungsmethode des Serums anwenden. Der bakteriotrope Versuch in vitro zeigt dagegen mit verschiedenen echten Meningokokkenkulturen quantitativ deutlich schwankende Resultate, einzelne Stämme werden so gut wie überhaupt nicht phagozytiert, so daß dies wohl als Ergänzung, nicht aber als Ersatz für die erstgenannte Wertbemessungsmethode beim Genickstarreheilserum verwertet werden kann.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Hrn. Geheimrat Prof. Wassermann für die Anregung zu dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

---

1. Kolle u. Wassermann, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 16.
  2. Kraus u. Baecher, *Zeitschrift für Immunitätsforschung*. 1909. Bd. III. Heft 1.
  3. Altmann, *Ebenda*. 1909. Bd. III. Heft 1.
  4. Jochmann, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 20.
  5. Flexner u. Jobling, *Journal of experimental Medicine*. 1903. Bd. X.
  6. Neufeld, *Med. Klinik*. 1908. Nr. 30.
-