

Aus der Bakteriologischen Abteilung der Höchster  
Farbwerke.

### Ueber den *Diplococcus intracellularis* meningitidis und seine Beziehungen zu den Gonococcen.

Von Prof. W. G. Ruppel.

In der letzten Zeit ist eine Reihe bemerkenswerter Arbeiten über den Erreger der epidemischen Genickstarre, den *Diplococcus intracellularis meningitidis*, oder *Meningococcus* veröffentlicht worden. Es sind hier in erster Linie die experimentellen Untersuchungen von Kollie und Wassermann,<sup>1) 2)</sup> sowie von Jochmann<sup>3)</sup> zu nennen. Da ich in der Lage bin, die Ergebnisse, zu welchen diese Untersuchungen geführt haben, nach verschiedenen Richtungen hin zu ergänzen, so möchte ich in nachstehendem in aller Kürze die Resultate meiner eigenen Versuche mitteilen. Ich behalte mir vor, an anderer Stelle über meine Untersuchungen ausführlich und mit genauerer Angabe aller Versuchsprotokolle zu berichten, und zwar dann, wenn meine Versuche, mit deren Fortsetzung ich zurzeit noch beschäftigt bin, zum endgültigen Abschluß gelangt sein werden.

Die Meningococcenkulturen, welche ich meinen experimentellen Untersuchungen zugrunde legte, verdanke ich zum größten Teile der Güte des Herrn Prof. Neisser (Frankfurt a. M.), und ich bin diesem für die Ueberlassung dieses wertvollen Materials zu lebhaftem Danke verpflichtet. Die Kulturen sind sämtlich aus der Cerebrospinalflüssigkeit an typischer Genickstarre erkrankter Menschen gezüchtet, und zeigen hinsichtlich

<sup>1)</sup> Das Instrument ist im Medizinischen Warenhaus erhältlich.

<sup>2)</sup> W. Kollie und A. Wassermann, Untersuchungen über Meningococcen. Klinisches Jahrbuch 1906, 15. Jahrg. — <sup>3)</sup> Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 16. — <sup>4)</sup> Ebenda 1906, No. 20.

ihres morphologischen und kulturellen Verhaltens in jeder Beziehung die für den Meningococcus-Weichselbaum geforderten und in letzter Zeit von Kolle und Wassermann scharf definierten Eigenschaften. Alle Kulturen, welche in irgend einem Punkte, z. B. in ihrem Verhalten bei der Färbung nach Gram, oder in Form und Menge ihres Wachstums auf den üblichen festen Nährböden Abweichungen von der Norm zeigten, habe ich von meinen Untersuchungen a priori ausgeschlossen.

Was die Kultivierung der Meningococci anbelangt, so war mein Bestreben von Anfang an darauf gerichtet, die Züchtung dieser Mikroorganismen auf flüssigen Nährböden zu ermöglichen und sie womöglich einem bestimmten Nährsubstrat derartig anzupassen, daß es gelingt, Massenkulturen zu erzielen; denn einmal halte ich es für ausgeschlossen, Kulturmaterial, welches auf festen Nährböden gezüchtet ist, in so exakter Weise dosieren zu können, wie dies für die Prüfung des betreffenden Materials an Versuchstieren wünschenswert ist, sodann glaube ich, daß die Immunisierung größerer Tiere mit Kulturen auf flüssigen Nährsubstraten schon aus dem Grunde weit mehr Aussicht auf Erfolg darbieten muß, weil es im allgemeinen weit leichter gelingt, mit Hilfe flüssiger Nährböden zu großen Kulturmassen zu gelangen. Wiewohl die Meningococci-Kulturen, welche mir zur Verfügung standen, diesen Bestrebungen anfänglich hartnäckigen Widerstand entgegensetzten, so ist es mir durch konsequentes, nunmehr seit acht Monaten fortgesetztes Uebertragen auf einen flüssigen Nährboden von bestimmter Zusammensetzung gelungen, die Kulturen zu sehr üppigem Wachstum zu veranlassen. Für diese Züchtungsversuche eignete sich ganz besonders ein bestimmter Meningococci-Stamm, den ich in folgendem kurz mit „Kultur W“ bezeichnen möchte. Dieser Stamm gewöhnte sich sehr bald an den flüssigen Nährboden und zeigt heute ein üppiges und äußerst charakteristisches Wachstum. Dasselbe beginnt an der Oberfläche der Flüssigkeit, erfüllt dann bald das obere Drittel des Röhrchens, dann tritt durch das Niedersinken von Cocci sehr bald ein geringer Bodensatz auf, niemals aber, und zwar selbst nach tagelangem Wachstum nicht, trübt die Kultur die ganze Flüssigkeitsmenge, sondern es bleibt stets die mittlere Partie der Flüssigkeit im Röhrchen oder Kölbchen vollkommen klar und durchsichtig, während gerade an den Grenzen dieser durchsichtigen Zone das Wachstum am reichlichsten fortschreitet. Nach langem Aufenthalt im Brutschrank kommt es auch zur Bildung zarter Oberflächenhäuten.

Im mikroskopischen Bilde zeigt die Kultur folgende Merkmale: Zunächst verhält sie sich der Gramschen Färbung gegenüber absolut negativ. Sie bildet feinste, meist paarweise angeordnete Cocci von der bekannten Semmelform, jedoch finden sich daneben häufig Tetraden, niemals dagegen zweifelhafte Ketten. Oft liegen die Cocci so angeordnet, daß sie den Eindruck bipolar gefärbter Stäbchen erwecken könnten.

Trotzdem diese Kultur nunmehr seit acht Monaten auf künstlichem, flüssigem Nährmaterial gezüchtet wird, hat sie in ihrem mikroskopischen Aussehen eine Veränderung nicht erfahren. Um so auffallender muß es erscheinen, daß diese Kultur W im Laufe der Zeit eine ganz hervorragende Virulenz für alle gebräuchlichen Versuchstiere angenommen hat.

Bei der Identifizierung des *Diplococcus intracellularis* als den tatsächlichen Erreger der epidemischen Meningitis cerebrospinalis ließen die Veröffentlichungen von Kolle und Wassermann, sowie anderer Autoren eine nicht unwesentliche Lücke erkennen. Es war nämlich bisher nicht gelungen, durch Uebertragung von Meningococci auf Tiere eine der Genickstarre ähnliche Erkrankung zu erzeugen. Kolle und Wassermann betonen ferner, daß es ihnen niemals glückte, aus dem Blute mit Meningococci-Kulturen infizierter Tiere wiederum Meningococci zu züchten, sodaß man annehmen muß, daß der Tod der Versuchstiere bei den Injektionsversuchen dieser beiden Autoren lediglich infolge von Giftwirkungen eingetreten war.

Anfänglich zeigte die oben beschriebene Kultur W ein ganz analoges Verhalten; es gelang zwar, Mäuse und Meerschweinchen durch intraperitoneale Injektionen zu töten, jedoch

waren hierzu relativ große Kulturmengen erforderlich, während der Nachweis von Meningococci im Blute der erkrankten oder verendeten Versuchstiere nicht glückte. Nachdem diese Kultur aber etwa fünf Monate hindurch täglich auf denselben künstlichen Nährboden übertragen worden war, hatte sie einen vollkommen veränderten Charakter angenommen. Sie besitzt nunmehr eine hohe Pathogenität für alle Versuchstiere.

So genügt eine Dosis von 1 ccm einer Verdünnung von 1:1 000 000, um eine Maus in 1—2 Tagen zu töten, 1 ccm einer Verdünnung von 1:500 000 tötet ein junges Meerschweinchen (von 250 g Körpergewicht) in 1—2 Tagen bei intraperitonealer, in 6—8 Tagen bei subcutaner Injektion. Schwere Kaninchen von 2000 g Gewicht erliegen intraperitonealen Injektionen mit unglaublich geringen Kulturmengen. Ich habe wiederholt beobachtet, daß Kaninchen, welchen 1 ccm einer Kulturverdünnung von 1:20 000 000, ja selbst von 1:200 000 000 in die Bauchhöhle gebracht wurde, in 12—18 Stunden unter ungemein charakteristischen Symptomen verendeten.

Zunächst beobachtet man an den injizierten Tieren eine rapide eintretende Gewichtsabnahme, es treten Lähmungserscheinungen an den Extremitäten auf, die Atmung erscheint beschleunigt und erschwert, schließlich kommt es zu krampfartigen Zuckungen, wobei der Kopf der Tiere rhythmisch in den Nacken gezogen und wieder nach vorn geschneilt wird, endlich verenden die Kaninchen unter lautem Schreien.

Bei der Sektion der verendeten Tiere findet sich die Pleurahöhle erfüllt mit einem eitrig-fibrinösen Exsudat. Die Milz ist stark geschwollen, Leber und Nieren sind trüb. Der Darm ist entzündet und sehr blutreich. Gehirn und Rückenmark sind ödematös durchtränkt.

Es ist mir in jedem Falle gelungen, sowohl in den pleuritischen Exsudaten und im Blute (Herzblut), wie auch aus der völlig blutfreien Cerebrospinalflüssigkeit Meningococci nachzuweisen und aus diesen Flüssigkeiten in Reinkultur zu züchten. Dieser Befund steht in so schroffem Gegensatz zu den Angaben anderer Autoren, daß ich geneigt war, an der Identität meiner Kultur mit dem *Meningococcus Weichselbaum* zu zweifeln. Ich verglich deshalb immer und immer wieder die morphologischen und kulturellen Eigenschaften dieser virulenten Kultur mit anderen einwandfreien Genickstarrekulturen, welche diese auffallende Tierpathogenität nicht, oder richtiger gesagt, noch nicht besaßen. Ich war nicht imstande, irgend welche wesentliche Unterschiede ausfindig zu machen.

Alle Zweifel an der Identität der Kultur wurden schließlich dadurch beseitigt, daß es mir gelang, Mäuse und Kaninchen durch subcutane Injektionen avirulenter, zweifelloser Meningococci-Kulturen gegen intraperitoneale Infektionen mit der mehrfachen tödlichen Dosis der hochvirulenten Kultur (Kultur W) mit absoluter Sicherheit zu immunisieren.

Mittlerweile ist es mir übrigens gelungen, die Virulenz einer Reihe anderer Meningococci-Stämme durch das gleiche Mittel, nämlich durch konsequentes Fortzüchten auf einem flüssigen Nährboden von konstanter Zusammensetzung in der gleichen Weise zu steigern.

Die Fähigkeit avirulenter Meningococci-Stämme, Versuchstieren eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen die virulenten Stämme zu verleihen, läßt sich praktisch zur Identifizierung echter Meningococci verwenden, denn ich habe gefunden, daß weder Gram-positive Diplococci, noch sogenannte meningococci-ähnliche Stämme die gleiche Fähigkeit besitzen. Sehr interessant und gewiß von nicht geringer Bedeutung aber ist die Tatsache, daß die gleiche Fähigkeit der Immunisierung gegen virulente Meningococci, und zwar die absolut gleiche quantitative Fähigkeit, wie avirulenten Meningococci allen Gonococci-Kulturen eigentümlich ist. Bei der auffallenden morphologischen und kulturellen Ähnlichkeit dieser beiden Cocciarten ist dieses Versuchsergebnis ein Beweis mindestens für die überaus nahe Verwandtschaft beider Kulturen, ja man wäre fast geneigt, an eine Identität beider zu denken.

Der Besitz hochvirulenter Meningococci-Kulturen hat eine große praktische Bedeutung für die Prüfung und Wertbestimmung des Meningococci-Immunsersums. Das wiederholte Auftreten der epidemischen Genickstarre in den letzten Jahren hat das Aufsuchen spezifischer Schutz- und Heilmittel gegen diese Seuche zur Notwendigkeit gemacht. Es war selbstverständlich, daß man es unternahm, wirksame Immunsera

durch Behandeln von Tieren mit Hilfe von lebenden oder getöteten Meningococcenkulturen herzustellen. Wie aber aus den Arbeiten von Kollé und Wassermann ersichtlich ist, bietet die Prüfung solcher Sera große Schwierigkeiten dar, eben weil man ja bisher nicht über Kulturen von konstanter Virulenz für kleine Versuchstiere verfügte. Diesem Mangel ist nunmehr abgeholfen. Schon die Versuche Jochmanns, dessen Kulturen hinsichtlich ihrer Pathogenität schon etwas größere Zuverlässigkeit besitzen als die meisten anderen Meningococcenstämmen, beweisen, daß es sehr wohl gelingt, im Serum immunisierter Tiere Schutzstoffe gegen die Meningococcen nachzuweisen. Ob das Jochmannsche Serum allerdings auch gegenüber den hochvirulenten Kulturen standhalten wird, das muß die Zukunft lehren.<sup>1)</sup>

Sobald ich mich von der konstanten Tiervirulenz meiner Meningococcenstämmen überzeugt hatte, habe ich nicht gezögert, gleichfalls die Herstellung spezifischer Immunsera zu versuchen. Zu diesem Zwecke habe ich Pferde seit einiger Zeit mit Einspritzungen virulenten Materials behandelt und es ist mir gelungen, zu einem Serum von deutlich nachweisbarer Schutz- und Heilkraft zu gelangen. Das Serum schützt weiße Mäuse in einer Menge von  $\frac{1}{250}$  ccm gegen das 100fache der tödlichen Dosis.

Den Schutz, welchen das Serum Kaninchen zu verleihen vermag, geht aus nachstehender Tabelle hervor.

Subcutan eingespritzte Serummenge	Intraperitoneal eingespritzte Kulturmenge 1 ccm	Verhalten
	1:20 000	† nach 12 Stunden.
	1:200 000	† " 24 "
	1:2 000 000	† " 36 "
	1:20 000 000	† " 24 "
	1:200 000 000	† " 24 "
1 ccm	1:200 000	lebt.
0,5 ccm	1:200 000	lebt.
0,25 ccm	1:200 000	† nach 7 Tagen.
0,1 ccm	1:200 000	† " 3 "

Wenn man überlegt, daß die durch das Serum geschützten Kaninchen mit einer Kulturmenge infiziert wurden, welche, wie aus der Tabelle hervorgeht, mehr als das 1000fache der tödlichen Dosis betrug, so dürfte man den Gehalt des Serums immerhin schon als recht beträchtlich ansprechen. Da meine Pferde jedoch erst relativ geringe Kulturmengen erhalten haben, so hoffe ich bald in der Lage zu sein, über noch bessere Resultate berichten zu können.

Auch einige mit dem Serum ausgeführte Heilversuche hatten recht günstige Resultate.

Was der Gehalt des Serums an Agglutininen anbelangt, so habe ich gefunden, daß dasselbe nicht nur die homologe Kultur, sondern auch alle anderen echten Meningococcenstämmen, und zwar in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:2000 agglutiniert. Die Agglutinationsprobe ist für die Differenzierung echter Meningococcenstämmen von anderen Kulturen, welche ein ähnliches kulturelles und morphologisches Verhalten zeigen, von zweifellosem Wert, dagegen ist sie zur Bewertung des Gehaltes eines bakteriziden Meningococcenserums an spezifischen Schutz- und Heilstoffen ungeeignet. Das Serum meiner Pferde besaß bereits den gleichen Gehalt an Agglutininen zu einer Zeit, wo Schutzstoffe durch Tierversuche überhaupt noch nicht nachgewiesen werden konnten. Der Gehalt an Agglutininen aber hat durch die weiter fortgesetzte Immunisierung der Pferde, durch welche eine namhafte Steigerung des Gehaltes an Schutzstoffen in dem Serum erfolgte, eine weitere Zunahme nicht erfahren.

Außer dem hier beschriebenen Meningococcenserum, zu dessen Herstellung ich virulente Stämme verwende, erschien es mir von Wichtigkeit, auch ein Serum durch Immunisierung von Pferden mit avirulenten Kulturen zu gewinnen, ebenso wie es bei der durch meine Versuche bewiesenen nahen Verwandtschaft der Meningococcen und Gonococcen von großem Interesse sein mußte, ein Gonococcenserum zu erhalten. Ich

<sup>1)</sup> Mittlerweile habe ich ein von E. Merck (Darmstadt) bezogenes Meningococcenserum auf seine Wirksamkeit gegenüber der virulenten Kultur geprüft und habe gefunden, daß das Serum einen deutlichen Schutzwert besitzt. In einer Menge von 0,1 ccm vermag es Mäuse gegen die 10–100fache, in einer Menge von 0,5 ccm selbst gegen die 1000fache tödliche Dosis zu schützen.

bin mit der Herstellung dieser verschiedenen Immunsera beschäftigt, jedoch sind diese Arbeiten noch zu keinem definitiven Abschluß gelangt. Eine Vorprüfung der verschiedenen Sera hat jedoch bei mir bereits die Ueberzeugung gefestigt, daß die zwischen den drei erwähnten Immunseris bestehenden Unterschiede nur quantitativer Natur sind.