Aus dem Hygienischen Institute der Universität in Tokio.
**Vorläufige Mitteilung über die Aetiologie
 der Tsutsugamushi- (Kedani-) Krankheit
 (Ueberschwemmungsfieber nach Baelz).**

Von Prof. M. Ogata.

(Schluß aus No. 45.)

Reinkultur der amöboiden Protozoen (Sporozoen) der Tsutsugamushikrankheit.

Ich hatte die Geschwürsmasse sowie das Blut von Kranken in 50%igem sterilisiertem Glycerinwasser konserviert, welches nach meiner Erfahrung Vaccinelymphe fast bakterienfrei macht, um nachher beides sowohl mikroskopisch als kulturell, auch tierexperimentell zu untersuchen. Andererseits habe ich zu den hängenden Tropfen Glycerin hinzugefügt, um längere Zeit beobachten zu können. Auch habe ich Geschwürsmasse auf dem Deckglas getrocknet und in Canadabalsam oder Glycerin eingeschlossen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des mit Glycerin versetzten, hängenden Tropfens sieht man nun, trotzdem nach Entnahme der Geschwürsmasse eine oder mehrere Wochen vergangen sind, noch mäßig lebhaft Bewegung von spindel- oder keulenförmigen Sporozoiten; die Sporozoiten lebten also noch nach mehreren Wochen, bzw. Monaten. Andererseits habe ich keine Bakterien in dem hängenden Tropfen gesehen.

Ich habe die von fünf Tsutsugamushikranken entnommene Geschwürsmasse und von drei Kranken entnommenes, in Glycerinwasser konserviertes Blut eineinhalb Monate nach der Entnahme in folgende Nährlösung geimpft, und zwar je drei Platinösen von jeder Sorte auf je zwei Probierrohren, welche in den Brütöfen gebracht wurden.

Bereitung der Nährlösung: 10 g Heu wurde in 500 ccm Aqua destillata 30 Minuten lang im Dampfkochtopf gekocht, dann 10% gewöhnliche Rindfleischbouillon, Kochsalz und Pepton je 0,5%, Traubenzucker 0,3% und Glycerin 3% hinzugefügt. Darauf wurde 15 Minuten lang gekocht, mit Sodalösung neutralisiert und filtriert. 5 ccm dieser Nährlösung werden in Reagensgläsern je 40 Minuten lang drei Tage hintereinander sterilisiert.

Sehr auffallend war es mir, daß alle Proben mit Ausnahme von zwei, welche mit Blut eines Kranken geimpft worden waren, nach einer Woche eine kaum merkbare Trübung und sehr wenig Bodensatz zeigten. Bei mikroskopischer Untersuchung der ungetrübten Nährlösung im hängenden Tropfen hat mich die bedeutende Vermehrung amöboider Protozoen überrascht. In den getrübten Proben waren außerdem noch Bakterien vorhanden. Die Abwesenheit der Bakterien in den meisten Fällen führe ich auf ihr Absterben in Glycerinwasser zurück, während die Sporen amöboider Protozoen (Sporozoen) sich darin lebendig erhalten konnten.

Nach zwei Wochen impfte ich wieder aus sämtlichen obigen Nährlösungen in neues Heuinfus ab. Außerdem habe ich sowohl aus der ursprünglichen, in 50%igem Glycerinwasser konservierten Geschwürsmasse und aus Blut, sowie aus der gelungenen Heuinfuskultur auf sterilisiertes flüssiges Rinds- und Pferdeblutserum und auch des erstarrten Serums in Condenswasser beider Arten geimpft und in den Brütöfen gebracht.

Alle geimpften Nährböden sind nach fünf Tagen mit Ausnahme der mit der obigen bakterienhaltigen Kultur geimpften, von dem gebildeten Sediment abgesehen, klar geblieben. Bei mikroskopischer Untersuchung der ersten sowie der zweiten Generation in den verschiedenen Nährböden war in sämtlichen eine Entwicklung amöboider Protozoen zu beobachten.

Bei mikroskopischer Untersuchung im hängenden Tropfen aus jenen Kulturen sieht man bei Zimmertemperatur (besser im Brutschrank) mäßig lebhaft Bewegung von Sporozoiten, sowie kleine amöboide Zellen. Auch erkennt man eine mäßig lebhaft schwingende Bewegung einer in einer Blase befindlichen amöboiden Zelle, welche kontinuierlich die Gestalt verändert.

Sehr auffallend ist im hängenden Tropfen, daß sich sehr kleine amöboide Zellen, vor allem aber stäbchenartige oder faserige Gebilde im Innern verschieden gestalteter Bläschen (Cyste, resp. Schizogoniecyste) bilden, welche violett glänzen. Diese Cyste vergrößert sich immer mehr und mehr, und es entstehen verschieden gestaltete, violett leuchtende, kristallähnliche Gebilde. Bei weiterem Wachstum dieser Cyste sieht man ebenfalls im Innern eine verschieden große, der Gestalt der Cyste entsprechende, amöboide

Masse. Bei dem folgenden Stadium kann diese Cyste über 50 μ oder noch größer werden, und dann sieht man in ihr oder an ihrer Haut reichlich zellige Gebilde von verschiedener Größe (Schizogonie); sie liegen in der Cyste selbst, an der Cystenhaut oder frei in der Flüssigkeit. Bei diesen beträgt die Größe von 6,8 μ bis 17 μ oder mehr. Unter den in sowie außerhalb der Cyste liegenden zelligen Gebilden kann man zwei verschiedene Arten unterscheiden. Die eine (a) ist rundlich und besteht aus feinen Granulis, durchschnittlich meist größer als die andere Art (b). Die Größe bei jenen Zellen (a) beträgt durchschnittlich 13,5 μ , bei diesen (b) 11,5 μ . Die Art (b) besteht aus grobkörniger, glänzender Masse, welche kleiner als (a) ist. Die Zellen (b) führen oft leicht schwingende Bewegungen aus, die Zellen (a) jedoch nicht. In einem weiteren Stadium von (b) bilden sich dann feine Fäden, welche ebenfalls mäßig lebhaft Bewegungen ausführen. Diese Fäden kann man auch aus den in Cysten liegenden Zellen entstehen sehen.

Bei freiliegenden Zellen sieht man oft beide Zellenarten sich miteinander berühren (Konjugation) und aus den b-Zellen in die a-Zellen Fäden eindringen oder eine a-Zelle nur mit dem abgelösten Faden von einer b-Zelle sich verbinden; ja, man sieht sogar auch solche a-Zellen, in welche mehrere Fäden eingedrungen sind. Diesen Vorgang kann man nur als eine Konjugation der beiden Zellen auffassen, wobei die a-Zelle Makrogametyt und die b-Zelle Mikrogametyt und der Faden ein Mikrogametfaden ist. Man sieht auch solche Gebilde, um welche sich nach Vereinigung der beiden Zellen eine mäßig stark lichtbrechende Blase (Cyste) bildet. Die Blase resp. Cyste kann ein- oder mehrfach sein.

Im hängenden Tropfen aus einer einen Monat alten Heuinfuskultur habe ich die Bildung von Sporozoiten in der Cyste und in ihrer Umgebung freiliegend gesehen, letztere führten sehr lebhaft Bewegung aus. Ferner sah ich, daß sich die Sporozoiten aus der Cyste nach verschiedenen Richtungen hinbewegten, ja selbst solche, welche sich durch den ganzen Tropfen nach dessen Peripherie massenhaft drängten.

Auch kommen junge amöboide Protozoen im Stadium der Entwicklung aus Sporozoiten vor. Sowohl im hängenden Tropfen, als auch in gefärbten Präparaten aus Kulturen kann man fast alle möglichen Formen der amöboiden Protozoen sehen; wie man sie auch in Geschwüren, Blut und inneren Organen der Tsutsugamushikranken findet.

Aus obiger Auseinandersetzung darf ich wohl folgern, daß meine amöboiden Protozoen, resp. Sporozoa sowohl in flüssigen als auch in festen Nährböden rein gezüchtet worden sind.

Tierversuch.

Als wir (ich und Ishiwara) von fünf Tsutsugamushikranken entnommene Geschwürsmasse auf je zwei Mäuse und je zwei Meerschweinchen subcutan impften, verendete nur eine Maus nach drei Tagen, während die anderen Tiere nicht erkrankten. Bei ihrer Sektion waren an der Impfstelle amöboide Protozoen leicht zu erkennen.

Wir haben ferner einige Platinösen von in Glycerinwasser konservierter Geschwürsmasse, welche von drei Kranken entnommen wurde, auf je zwei Kaninchen und ein Schaf subcutan geimpft; bei einem Kaninchen trat acht Tage danach ein Geschwür mit Anschwellung am rechten unteren Augenlid auf, welches reichlich Eitersekretion zeigte. Bei mikroskopischer Untersuchung des Eiters waren Sporozoiten und verschiedene amöboide Protozoen zu sehen. Das Tier starb nach 30 Tagen. Bei der Sektion zeigte sich Anschwellung von Milz, Leber und Nieren. Bei mikroskopischer Untersuchung fanden wir im Blute und in inneren Organen Sporozoiten und amöboide Protozoen.

Wir haben eine zweiwöchige Reinkultur der amöboiden Protozoen von einem Tsutsugamushikranken in Heuinfus (zweite Generation je 0,2 ccm acht Meerschweinchen und 0,3 ccm acht Kaninchen und 0,3 ccm einen Affen subcutan) eingeimpft, und zwar bei den Meerschweinchen und Affen auf der inneren Seite des Oberschenkels, bei den Kaninchen in das Scrotum. Danach stieg bei den meisten Kaninchen und Affen die Temperatur mehr oder minder; bei den Affen und bei den meisten Kaninchen entstand leichte Anschwellung der Injektionsstelle und der naheliegenden Lymphdrüsen, während bei den Meerschweinchen weder Lymphdrüsenanschwellung noch Temperatursteigerung zu konstatieren waren. Ein Kaninchen, bei welchem nach zehn Tagen am linken Augenlid ein Geschwür auftrat, starb nach 14, ein zweites nach 18 und ein drittes nach 35 Tagen.

Sektion des zuerst verendeten Kaninchens. Die Ernährung war mäßig gut. Lymphdrüsen waren nicht, dagegen Leber, Milz und Nieren angeschwollen und blutreich. Bei der Öffnung der Brusthöhle bemerkten wir, daß die ganze Vorderfläche der beiden Lungenflügel ganz mit käsig-eitriger, weißer Masse bedeckt

war. In beiden Pleurahöhlen waren je 30–40 g rotgefärbter Flüssigkeit enthalten. Beide Lungen waren pneumonisch infiltriert. Auf der Schnittfläche sah man hier und da hirsekorn- bis bohngroße käsige Herde. Bei mikroskopischer Untersuchung des Blutes und Gewebssaftes der Leber, Milz, Nieren und der käsigen Masse waren Sporozoiten und verschiedene amöboide Protozoen vorhanden, welche im hängenden Tropfen ebenfalls lebhaft Bewegung zeigten. Im Blut befindliche amöboide Protozoen (Mikrogametyt) färbten ihr Chromatin mit Giemsa intensiv rot. Wir haben aus Blut und käsiger Masse wieder eine Reinkultur von amöboiden Protozoen erhalten, ebenso in Schnittpräparaten der inneren Organe, Milz, Leber, Nieren und Lungen.

Der Sektionsbefund des zweiten Kaninchens ergab wesentlich das Gleiche wie der des ersten, ebenso auch der mikroskopische und kulturelle Befund.

Sektionsbefund des dritten Kaninchens. Das Tier war stark abgemagert. Rechte Inguinaldrüse bohngroß angeschwollen und blutreich. Leber, Milz und Nieren angeschwollen und ebenfalls hyperämisch. In der Lunge und im Herzen nichts Abnormes zu bemerken. Sehr auffallend war aber bei diesem Kaninchen, daß in den rechten hinteren und seitlichen Teilen unter der Haut ein sehr breiter, ausgedehnter käsiger Herd vorhanden war, welcher, von der Mitte der Skapula beginnend, bis zum ersten Lendenwirbel und andererseits von der Axillarlinie bis zum Dornfortsatz der Wirbelsäule reichte. Der Herd war 25 cm lang und 15 cm breit. Der mikroskopische und kulturelle Befund war wie bei den vorhergehenden.

Wir haben diese käsige Masse in die Innenseite des Oberschenkels bei sechs neuen Kaninchen subcutan eingepflegt. Diese zeigten an der Impfstelle nach einigen Tagen Anschwellung und Rötung, welche allmählich bohnen- bis taubenei-, ja sogar hühnereigroß wurde. Der Tumor hatte meist einen breiten, harten Stiel in der Tiefe. Nach einer Woche sah man auf seiner Spitze eine hirse- bis reiskorngroße Kruste oder einige millimetergroße Öffnungen (Geschwüre), aus welchen eine weiße, zähe, käsige Masse mit der Pinzette herausziehen ist und welche mit den Geschwüren von Tsutsugamushikranken ganz identisch sind. Nach Wegnahme jener Kruste bemerkt man kleine Geschwüre, aus welchen auch bei Druck ebenfalls eine zähe, käsige Masse herauskommt. Die benachbarten Lymphdrüsen waren mehr oder minder angeschwollen. Temperatur war bei den meisten geimpften Kaninchen etwas gestiegen.

Als wir Geschwürseiter (käsige Masse) sechs weiteren Kaninchen subcutan einimpften, bildeten sich bei allen Tumoren und Geschwüre gerade wie bei den vorhergehenden. Die eine Woche nach der Impfung mit Blut angestellte Untersuchung ergab bei allen Sporozoiten und amöboide Protozoen. Ferner haben wir auch hier aus dem Blute, wie aus der käsigen Masse Reinkulturen von amöboiden Protozoen erhalten.

Es war auch sehr auffallend, daß in mikroskopischen Präparaten der käsigen Masse fast keine Bakterien zu sehen waren. In Plattenkultur aus Käsemasse sind nur selten einige coliartige Bakterien gewachsen, aber keine einzige Kolonie von Eitercoccen. Bei Impfung letzterer auf fünf Mäuse blieben alle gesund, während bei subcutaner Impfung von käsiger Masse auf vier Mäuse zwei davon nach Geschwürsbildung starben. Bei der Sektion fanden wir sowohl in der Impfstelle als im Blute und in den inneren Organen reichlich Sporozoiten und amöboide Protozoen. Ein mit käsiger Masse geimpftes Kaninchen verendete 30 Tage danach.

Sektion: Das Tier ist mäßig stark abgemagert. Auf der Impfstelle ist kein Geschwür mehr zu sehen, jedoch lag unter der Haut eine linsengroße, gallertartige Masse. Die naheliegenden Lymphdrüsen in der Schenkelbeuge sind bis auf eine gänseeigroße angeschwollen. Sie war mit dem umliegenden Gewebe nicht verwachsen, sodaß der Tumor wie eine Cyste aussah.

Bei Öffnung der Bauchwand wurden im Mesenterium fünf verschieden große, aus Mesenterialdrüsen entstandene Tumoren, resp. Cysten sichtbar, welche ebenfalls im Innern käsige, zähe Massen enthielten. Der kleinste hatte die Größe einer Bohne, der zweite die einer Haselnuß, der dritte die eines Taubeneies, der vierte die einer Walnuß und die fünfte die eines Hühnereies. In der käsigen Masse fanden wir bei mikroskopischer Untersuchung verschiedene Formen der amöboiden Protozoen.

Sehr eigentümlich war es, daß in der Gallenblase sehr reichlich (über viele Hunderte) hirsekorngroße, rundliche Körperchen angesammelt waren, welche durch bindegewebige Masse zusammengehalten wurden.

Bei schwacher mikroskopischer Untersuchung zeigte sich, daß alle Kügelchen von einer speziellen Membran umschlossen sind und in ihrem Innern zellige Gebilde enthalten. Bei starker Vergrößerung nach Zerdrücken der Kügelchen unter dem Deckglas sieht man hier und da reichlich jene, in Fig. 2 gezeichneten, schi-

zoonienbildenden, stachelförmigen Büschel, sowie kristallähnliche, violetschimmernde Cysten, in welchen amöboide Massen oder schon differenzierte, zellige Gebilde (Schizogonie) zerstreut liegen. Ferner sieht man stellenweise fertig gebildete Schizogonien. Jene hirsekorngroßen Körperchen sind also angehäuften Cysten. Im Blute und in den inneren Organen fanden wir sowohl Sporozoiten als Schizogonien, ferner auch verschiedengeformte, amöboide Protozoen.

Wir haben aus dem Blut, aus der käsigen Masse, den inneren Organen sowie aus einer in der Gallenblase enthaltenen Cyste in Heuinfusnährlösung geimpft und sie im Brütöfen gehalten.

Bei Affen sah man nach Injektion in der Injektionsstelle einen bohngroßen Tumor entstehen und die naheliegenden Lymphdrüsen angeschwollen; beides verschwand aber nach wenigen Tagen. Nach einer Woche wurden im Blut sowohl amöboide Protozoen beobachtet als auch Reinkulturen davon erhalten.

Von den Meerschweinchen, welche wir mit Reinkultur von amöboiden Protozoen, resp. Sporozoiten sowie mit Geschwürseiter von Kaninchen geimpft hatten, ist nur eins nach 30 Tagen gestorben; auch hier waren im Blute und in den inneren Organen Protozoen leicht zu finden. Die übrigen erhielten sich und waren nach zwei Monaten noch gesund.

Aus den obigen mikroskopischen, kulturellen und tierexperimentellen Befunden bei Tsutsugamushi- oder Kedanikkrankheit ziehe ich folgende Schlüsse:

1. In pathologisch veränderten Stellen und Organen sowie im Blut der Tsutsugamushikranken findet man eine Art amöboider Protozoen, resp. Sporozoa, von verschiedener Form und Größe sowie deren Sporozoiten und Cysten.
2. Die amöboiden Protozoen resp. Sporozoiten vermehren sich im Blute, in Geschwüren, Lymphdrüsen und anderen Organen und zeigen verschiedene Entwicklungsformen.
3. Wir konnten durch die Geschwürsmasse und das Blut der Tsutsugamushikranken auf Versuchstiere dieselbe Krankheit übertragen und in diesen wieder die gleichen amöboiden Protozoen erkennen und rein kultivieren.
4. Die Reinkultur jener amöboiden Protozoen, sowie die durch Reinkultur entstandenen käsigen Massen sind höchst pathogen für Kaninchen, ferner übertragbar auf Affen und Mäuse, schwer dagegen auf Meerschweinchen, wobei sich eine mit der Tsutsugamushikrankheit identische Erkrankung entwickelt.
5. Ich nenne die von mir bei der Tsutsugamushikrankheit entdeckten amöboiden Protozoen Tsutsugamushisporozoa (Kedanisporozoa).
6. Tsutsugamushikrankheit ist eine durch die Sporozoa verursachte Infektionskrankheit.
7. Die Vermittelung der Uebertragung der Tsutsugamushisporozoa auf Menschen scheint mir durch junge Milben zu geschehen, welche auf Pflanzen des Infektionsortes vorkommen.
8. Im Körpersaft derselben achtbeinigen Milbe, welche ich auf Artemisia in der Nähe des Infektionsherdes gefunden habe, habe ich keulenförmige, bewegliche, sporozoitenähnliche Gebilde sowie amöboide Zellen und Cysten gefunden.
9. Die von uns bei Tsutsugamushikranken gefundenen Bakterien scheinen keine nähere ätiologische Beziehung zur Tsutsugamushikrankheit zu haben.
10. Die Sporozoa sind bei Tsutsugamushikrankheit und Kedanikkrankheit identisch.

Tokio, den 23. Februar 1906.

Erklärungen der Abbildungen.

Die Zeichnungen sind von den unter dem Mikroskop beobachteten Bildern, deren ich mich am 23. November 1905 bei meinem Vortrag in der Japanischen hygienischen Gesellschaft zur Demonstration bediente, angefertigt worden. Die Vergrößerung der Fig. 5 ist 650 fach, die der übrigen Figuren 330 fach, Mikroskop Leitz.

Fig. 1. Nach Romanowsky gefärbtes Blutpräparat von einem Kedanikranken. a rotes Blutkörperchen mit jungen amöboiden Protozoen, B rote Blutkörperchen, einige besitzen im Innern Sporozoiten, s Sporozoiten, S Schizogonie.

Fig. 2. Geschwürshaut eines Tsutsugamushikranken ungefärbt in Kanadabalsam geschlossen, O Schizogonieknochenbildung, oc freie Schizogonieknoche im Innern mit Bläschen, s dunkles pigmenthaltiges Bläschen, S Schizogonieknochenbüschel.

Fig. 3. Geschwürskruste aus einem Tsutsugamushikranken ungefärbt. 1 Makrogametencyste mit dunklen Mikrogamet, 2 Oocyste, im Innern reichlich Tochterblasen.

Fig. 4. Nach Romanowsky gefärbtes Deckglaspräparat aus einer Geschwürsmasse von Tsutsugamushikranken. A drei amöboide Zellen; bei der einen Kern und Vakuolen nicht deutlich; bei der zweiten Kern und Vakuolen deutlich; bei der dritten sieht man im Innern mehrere kleine Kerne. Die Zelle hat zwei lange Fort-

sätze; in einem sieht man eine hyaline Blase C. b ist ein Blutkörperchen.

Fig. 5. Nach Romanowsky gefärbtes Blutpräparat. B Blutkörperchen, a in einem Blutkörperchen aus Sporozoitenschale ausschlüpfende amöboide Protozoen, r im gleichen Blutkörperchen zurückgebliebener Kapselrest von Sporozoiten, s in rote Blutkörperchen eingedrungene Sporozoiten, noch mit Kapsel versehen.

Fig. 6. Nach Romanowsky gefärbtes Blutpräparat. Amöboide Zelle mit Vakuolen in der Mitte und Kernkörperchen oder Pigment und hyalinem Fortsatze.

Fig. 7. Schnittpräparat der Lymphdrüse Kedanikranks, gefärbt nach Romanowsky. Eins, zwei und drei verschieden große und geformte amöboide Protozoen mit verschieden großen Vakuolen und Kernkörperchen. Bei vier sieht man runde Cyste in der Mitte der Zelle und in der Umgebung noch Zellenrest und einen Kern.

Fig. 8. Aus dem Schnittpräparat der Inguinaldrüse eines Tsutsugamushikranken nach Giemsa gefärbt, C verschiedengroße Cyste in der Drüsensubstanz mit stachelartigen Gebilden im Innern, p Pigmentzelle, in der Mitte eine Cyste beherbergend.

Zusatz bei der Korrektur am 6. September 1906. Nachträglich möchte ich noch hinzufügen, daß ich durch weiteres Studium der Sporozoa schon die Entwicklung derselben (Schizogonie, beide Gametocyten und Gameten, Oocyste, Ookinet, Sporoblasten sowie Sporozoiten) unter dem Mikroskop beobachtet habe, ferner, daß die durch Impfung obiger Sporozoa erkrankten und geheilten Versuchstiere eine gewisse Immunität gegen weitere Impfung und das Blutserum derselben Heilwirkung zeigen.