Aus einer Bakteriologischen Untersuchungsstelle.

Experimentelle Fleckfieberuntersuchungen.

Von Stabsarzt Prof. Dr. B. Möllers und Dr. Georg Wolff (Berlin).

1. Die Rolle der Proteus-X₁₉-Bazillen beim Fleckfieber.

Die Frage, ob der von Weil und Felix zuerst aus dem Harn Fleckfieberkranker gezüchtete Bazillus Proteus X₁₉, welcher in annähernd 100% vom Serum Fleckfieberkranker spezifisch agglutiniert wird, eine ätiologische Rolle beim Fleckfieber spielt, ist in der Literatur wiederholt erörtert worden.

Friedberger¹⁾ sieht den X₁₉-Bazillus als den Erreger des Fleckfiebers an und will ihn dementsprechend als *Bacillus typhi exanthematici* bezeichnet wissen, da er im Serum der Fleckfieberkranken neben den agglutinierenden auch präzipitierende, komplementbindende und bakteriolytische Immunstoffe gegenüber dem Bazillus X₁₉ feststellen konnte. Weil und Felix²⁾ halten in

¹⁾ Stephan Bauer, Arbeiterschutz und Völkergemeinschaft. Zürich 1918. Verlag Orell Füßli.

²⁾ Vgl. Internationaler Arbeiterschutz und Internationale Sozialversicherung. Reichsarbeitsblatt 1918 Nr. 12 S. 870—873.

³⁾ Alle Staaten sind verpflichtet, ihre Gesetzgebung über die allgemeine Versicherungshygiene für Betriebe aller Art, insbesondere über Unfall- und Krankheitsverhütung, auszubauen. Der Achtstundentag soll in allen Ländern eingeführt werden. Den Arbeiterinnen ist von Sonnabend nachmittag 2 Uhr ab freizugeben. Das Alter für die Zulassung von Kindern zu Lohnarbeiten wird auf das vollendete 14. Lebensjahr festgesetzt. Für alle jugendlichen Arbeiter zwischen 14 und 18 Jahren ist ein pflichtgemäßer Fach- und Fortbildungsunterricht einzuführen. Nacharbeit von 8 bis 5 Uhr soll gesetzlich verboten werden für alle Betriebe, die nicht ihrer Art nach oder aus technischen Gründen auf Nacharbeit angewiesen sind. Den Arbeitern soll generell wöchentlich eine zusammenhängende Ruhepause von mindestens 32 Stunden gesetzlich gewährleistet werden, die auf die Zeit von Sonnabend bis Montag früh zu verlegen ist.

⁴⁾ D. m. W. 1917 Nr. 42, 43, 44. — ⁵⁾ W. kl. W. 1918 Nr. 23.

ihrer neuesten Arbeit die Frage für vorläufig noch nicht genügend geklärt, schließen aber aus den in ihren Untersuchungen gewonnenen Erfahrungen, „daß die Ursache der Fleckfieberreaktionen mit den X-Stämmen nur in der Anwesenheit dieser Stämme im fleckfieberkranken Organismus gesucht werden kann“.

Auf die übrige zahlreiche Literatur über diese Frage soll hier aus Platzmangel nicht näher eingegangen, sondern nur die eigenen Untersuchungen kurz besprochen werden.

Eine Reihe von Meerschweinchen wurde zunächst mit verschiedenen Mengen lebender X_{19} -Bazillen (von $\frac{1}{100}$ bis $\frac{1}{10}$ -Oese) intraperitoneal infiziert und dann nach Verlauf von mindestens drei bis vier Wochen mit virulentem Fleckfieberblut nachinfiziert. Wenn der Bazillus X_{19} der Fleckfiebererger wäre, so müßten diese Tiere dadurch immun und vor einer späteren Nachinfektion mit dem im Blut enthaltenen Fleckfiebervirus geschützt sein.

Wie wir wiederholt feststellen konnten, erwerben die künstlich mit Fleckfieber infizierten Meerschweinchen gegenüber Neuinfektionen ebenso wie die Menschen eine langdauernde Immunität, indem man bei einem Meerschweinchen, das einmal Fleckfieber überstanden hat, eine Neuinfektion nicht erzielen kann.

Ganz anders sind die Resultate bei den mit X_{19} -Bazillen vorbehandelten Meerschweinchen, welche regelmäßig, wenn sie mit Fleckfiebervirus nachinfiziert wurden, unter den für die Fleckfieberinfektion der Meerschweinchen charakteristischen Erscheinungen erkrankten.

Versuch. Meerschweinchen 11 wird am 8. Februar 1918 mit $\frac{1}{10}$ Oese X_{19} -Bazillen infiziert und erhält am 1. März eine Nachinfektion mit 3 ccm Menschenblut eines schweren Fleckfieberfalls. Das Tier erkrankt am 17. März nach 16-tägiger Inkubationszeit mit charakteristischem Fieber zwischen 39 und 40°, das bis zum 24. März anhält. Mehrere Monate später, am 29. Juni, wurde das Tier nochmals mit Fleckfiebervirus (Nebenniere eines Passage-tieres) nachinfiziert und blieb gesund, während die gleichzeitig mit demselben Virus infizierten Kontrolltiere typisch erkrankten.

Meerschweinchen 42 wird am 1. Juni 1918 mit $\frac{1}{5}$ Oese X_{19} -Bazillen intraperitoneal infiziert und am 16. Juni mit der Nebenniere eines Fleckfieberpassagetieres nachinfiziert. Das Meerschweinchen erkrankte am 25. Juni nach neuntägiger Inkubationszeit in charakteristischer Weise mit Temperatursteigerung über 40° und wurde am 29. Juni zur Weiterzucht des Virus getötet.

Meerschweinchen 41 wurde am 1. Juni 1918 mit $\frac{1}{5}$ Oese X_{19} -Bazillen intraperitoneal infiziert und am 16. Juni einer Nachinfektion mit 3 ccm Blut eines Fleckfieberpassagetieres unterzogen. Das Tier erkrankte am 30. Juni nach 14-tägiger Inkubation unter Temperatursteigerung von 39–40,4°, während die Normaltemperatur dieses Tieres etwa 38,5° betragen hatte.

Die letzteren beiden Tiere wurden mit Passagevirus vom Meerschweinchen infiziert, um den Einwand von Friedberger zu entkräften, es könne sich bei dem Fieber um eine Anaphylaxie-reaktion infolge Einverleibung artfremden Eiweißes handeln. Zu dem gleichen Ergebnis, daß man mit X_{19} -Bazillen nicht gegen Fleckfieber immunisieren kann, sind auch Landsteiner und Hausmann¹⁾ sowie Doerr und Pick²⁾ gekommen. In Übereinstimmung mit diesen Autoren sowie mit Dietrich³⁾ haben auch wir niemals eine positive Weil-Felix-Reaktion bei fleckfieberkranken Meerschweinchen feststellen können, wohl aber bei den mit dem Bazillus X_{19} vorbehandelten Tieren; bei den letzteren fanden wir starke Ausflockungen mit Titerwerten von 1 : 200 bis 1 : 800.

Auch dieser Befund spricht dafür, daß die Weil-Felix-Reaktion nicht eine spezifische Immunitätsreaktion gegen Fleckfieber ist, sondern lediglich eine gegen den Bazillus X_{19} . Wir nehmen daher an, daß es sich bei dem Fleckfieber des Menschen um eine Mischinfektion zwischen dem eigentlichen Fleckfiebererger und dem Proteus-Bazillus handelt. Die Meerschweinchen, die nur mit dem Fleckfiebervirus (Menschenblut, Tiervirus) infiziert sind, bilden keine Antikörper gegen den Bazillus Proteus X_{19} ; ebenso geben auch gesunde Menschen, die zur Schutzimpfung mit virulentem, aber auf 60° erhitztem, von Fleckfieberkranken stammendem Blut behandelt sind, keine positive Weil-Felix-Reaktion, da sie keine Infektion mit Proteus-Bazillen durchmachen, wie wir bei früheren Untersuchungen regelmäßig feststellen konnten.

2. Pathogenität und Lokalisation des Fleckfiebervirus beim Meerschweinchen.

Nachdem wir vergeblich versucht hatten, auch bei Kaninchen und Ziegen durch Einspritzung von Fleckfieberblut eine künstliche Infektion dieser Tiere zu erzielen, beschränkten wir unsere Tierversuche auf das Meerschweinchen, das klassische Versuchstier für

Fleckfieberexperimente. Die Infektion des Meerschweinchens geschieht gewöhnlich durch intraperitoneale Einspritzung von mehreren Kubikzentimetern defibrinierten Blutes von fleckfieberkranken Menschen oder Meerschweinchen. Wenn die Blutentnahme auf der Fieberhöhe erfolgte, gelang uns die Infektion in 75–80% unserer Versuche. Von 19 Meerschweinchen, die mit Fleckfieberblut infiziert wurden, erkrankten

1 Tier nach 9 Tagen	3 Tiere nach 15 Tagen
1 „ „ 10 „	5 „ „ 17 „
1 „ „ 11 „	2 „ „ 18 „
1 „ „ 12 „	1 Tier „ 19 „
2 Tiere „ 14 „	2 Tiere „ 20 „

unter der für Fleckfieber charakteristischen Temperatursteigerung. Ein erheblicher Unterschied in der Inkubationszeit nach Infektion mit Menschenblut oder Passagevirus des Meerschweinchens war nicht festzustellen. Die Infektionsdosis betrug in den meisten Fällen 3 ccm, es erkrankten jedoch auch Tiere, welche nur 2 oder 2,5 ccm Blut erhalten hatten, in der typischen Weise. Unsere Versuchstiere hatten durchschnittlich ein Gewicht von 350–600 g, wogen somit erheblich mehr als die Tiere von anderen Autoren, die, wie z. B. Doerr und Pick, nur ganz junge Tiere im Gewicht von 100–250 g benutzten. Durch das verhältnismäßig hohe Alter der Meerschweinchen dürfte vielleicht die lange Dauer der Inkubation mitbestimmt sein. Mehrfach beobachteten wir, daß von zwei gleichzeitig mit der gleichen Infektionsdosis gespritzten Tieren nur das eine, und zwar das an Gewicht leichtere, erkrankte, während das ältere Tier fieberfrei blieb. Bei drei Meerschweinchen, welche mit je 3 ccm Blut eines fleckfieberkranken Menschen gespritzt wurden und nicht erkrankten, lag der Grund wohl darin, daß der Erkrankte sich am 15. Krankheitstage befand, an dem das Virus bereits aus dem Blut wieder verschwunden war.

Immerhin ist die Tatsache, daß nicht alle Meerschweinchen für Fleckfieber empfänglich sind, bei Immunisierungsversuchen sehr störend, da man nie mit Bestimmtheit sagen kann, ob ein Tier infolge der vorangegangenen Vorbehandlung oder schon infolge natürlicher Immunität für Fleckfieber unempfindlich ist. Der Ansicht von Doerr und Pick, daß Experimente mit Fleckfiebervirus durch zahlreiche Kontrollen gestützt und außerdem oft wiederholt werden müssen, um einigermaßen sichere Schlüsse zu gestatten, stimmen wir durchaus bei, da man sonst leicht zu irigen Auffassungen über das Zustandekommen der aktiven Fleckfieberimmunität gelangen kann. Leider sind die meisten Laboratorien, zumal im Felde bei der Schwierigkeit der Tierbeschaffung, kaum in der Lage gewesen, in dem erstrebenswerten großen Umfange Tierexperimente auszuführen. Um so mehr ist es zu begrüßen, daß Doerr und Pick mit Hilfe des reichen Tiermaterials des Bakteriologischen Laboratoriums des k. u. k. Militär-sanitätskomitees in Wien alle bisher noch strittigen Fragen über Infektion und Immunität bei Fleckfieber in so vorbildlicher Weise bearbeitet haben, daß ihre Untersuchungsergebnisse als Unterlage für alle weiteren Fleckfieberversuche dienen können. Unsere eigenen Untersuchungen, die fast zu gleicher Zeit im Felde, aber an einem kleineren Tiermaterial vorgenommen waren, führten durchweg zu den gleichen Ergebnissen.

Bei der Fortzucht des Fleckfiebervirus im Tierkörper ist die Blutmenge, die man vom erkrankten Tiere erhält, für größere Versuchsreihen und für die Erhaltung des Passagevirus meist nicht ausreichend, zumal wenn es sich um ganz junge Meerschweinchen handelt. Ritz¹⁾ hat vor kurzem darauf hingewiesen, daß die Fortzucht des Virus regelmäßig gelingt, wenn man die Nebenniere der erkrankten Tiere verimpft. In der von ihm angegebenen Weise benutzten auch wir zur Infektion den dritten Teil einer in Kochsalzlösung verriebenen Nebenniere, welche intraperitoneal eingespritzt wurde. Sechs Meerschweinchen im Gewicht von 500–600 g erkrankten 9, 10, 10, 11, 14 bzw. 19 Tage nach der Infektion mit der für Fleckfieber charakteristischen Fieberkurve. Um festzustellen, ob das Fleckfiebervirus sich längere Zeit in der Nebenniere virulent erhält, erhielt ein Meerschweinchen (Nr. 50) eine Einspritzung von einem Drittel Nebenniere von Tier Nr. 42, welche 16 Tage in Glyzerin aufbewahrt war. Das Tier zeigte keine Temperatursteigerung, erwies sich dagegen bei einer Nachinfektion mit frischer Nebenniere von Meerschweinchen Nr. 58 als immun. Die mit frischen Organstückchen der Tiere Nr. 42 und 58 geimpften Kontrolltiere waren dagegen charakteristisch erkrankt.

Das Fleckfiebervirus befindet sich indes nicht nur in dem Blut und der Nebenniere, sondern in sämtlichen Organen des infizierten Meerschweinchens (Nicolle und Blaizot, Blanc, da Rocha Lima, Ritz, Doerr und Pick); wir prüften Gehirn, Milz, Leber und Niere und konnten mit jedem der genannten Organe die charakteristische Fieberbewegung auslösen.

Versuch. Meerschweinchen Nr. 42, infiziert am 16. Juni durch ein Drittel Nebenniere von Meerschweinchen Nr. 40, erkrankte am 25. Juni und wurde am 29. Juni auf der Höhe des Fiebers getötet.

Es erhalten:

Meerschweinchen 43	2 ccm Blut
„ 44	$\frac{1}{5}$ Nebenniere
„ 45	$\frac{1}{5}$ Milz
„ 46	$\frac{1}{5}$ eines bohnen großen Stücks Gehirn
„ 47	desgl. Leber
„ 48	desgl. Niere
„ 49	ein bohnen großes Stück Leber

¹⁾ M. Kl. 1918 Nr. 21. — ²⁾ W. kl. W. 1918 Nr. 30. — ³⁾ D. m. W. 1916 Nr. 51.

¹⁾ D. m. W. 1918 Nr. 21.

Alle Tiere außer 44 erkrankten, und zwar:

Meerschweinchen	43	nach einer Inkubation von	20	Tagen
"	45	"	"	9
"	46	"	"	5
"	47	"	"	8
"	48	"	"	5
"	49	"	"	9

Meerschweinchen 44 zeigte keine charakteristische Temperaturkurve; es war anscheinend immun.

Der Blutgehalt der einzelnen Organe scheint keinen entscheidenden Einfluß auf die Infektiosität zu haben, da Doerr und Pick die Fleckfieberinfektion auch dann gelungen ist, wenn sie nur geringe Mengen Organsubstanz (z. B. 0,05–0,01 g Gehirn) einverleibten.

Als besonders aussichtsreich hat sich zur Fortzüchtung des Fleckfiebervirus die Verimpfung von Gehirn erwiesen (Landsteiner und Hausmann¹⁾, Doerr und Pick). Dies erscheint auch dadurch erklärlich, daß bei der Fleckfiebererkrankung des Menschen neben den Blutdruckerscheinungen die Symptome von seiten des Gehirns im Vordergrund des klinischen Krankheitsbildes stehen; dem entsprechen die von Ceelen u. a. beschriebenen pathologisch-anatomischen Veränderungen an den feinsten Gefäßen des Gehirns.

Von besonderem wissenschaftlichen Interesse sind die Feststellungen von Doerr und Pick, daß das Gehirn und Blut des infizierten Meerschweinchens schon vom vierten Tage anfangen ausnahmslos virulent sind, also schon vor dem Fieberbeginn in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit; vielleicht lassen sich daraus Analogieschlüsse ziehen bezüglich der Ansteckungsfähigkeit des in der Fleckfieberinkubationszeit befindlichen Menschen gegenüber den Bissen der Kleiderläuse in der Art, daß sich Kleiderläuse auch an einem scheinbar noch gesunden Menschen, der sich in der Inkubationszeit des Fleckfiebers befindet, infizieren und die Krankheitskeime auf andere Menschen übertragen können.

Die Virulenz des Passagevirus des Meerschweinchens ist gegenüber dem Originalvirus des Menschen nicht erhöht. In Übereinstimmung mit der Mehrzahl der Autoren erkennen wir als das einzige Symptom einer gelungenen Fleckfieberinfektion des Meerschweinchens eine nach einer Inkubationszeit von 5 bis längstens 21 Tagen auftretende mehrtägige Temperatursteigerung (auf 39,5–40,5) an; dieses Symptom zeichnet sich dadurch aus, daß es mit dem Blute und den Organen des fiebernden Tieres auf andere Meerschweinchen übertragen werden kann und eine aktive Immunität gegen eine neue Fieberbewegung der gleichen Ätiologie hinterläßt.

Zur Fortpflanzung des Virus erscheint es wesentlich, daß man nicht zu alte Versuchstiere benutzt mit einem Höchstgewicht von etwa 300 g; uns selbst ist, als wir schwerere Tiere bis zu einem Gewicht von 650 g verwendeten, die Passage ohne sonstigen ersichtlichen Grund nach der sechsten Ueberimpfung abgebrochen.

Zur Kontrolle wurden auch die Organe gesunder Meerschweinchen auf andere Tiere verimpft, ohne daß letztere Tiere dadurch erkrankten.

3. Weitere Erfahrungen über Fleckfieberimpfstoff.

In einer früheren Arbeit²⁾ haben wir auf Grund der von Hamdi bei türkischen Truppen gemachten Erfahrungen einen Fleckfieberimpfstoff beschrieben, der aus dem defibrinierten Blut hochfiebernder Fleckfieberkranker durch halbstündiges Erhitzen auf 60° gewonnen wurde. Um den Impfstoff haltbar und dauernd steril zu erhalten, setzten wir später dem Blut zur Konservierung 0,2% Formalin zu.

Mit diesem Impfstoff wurde damals eine Reihe von Meerschweinchen vorbehandelt und einige Wochen später zur Prüfung der Immunität mit Fleckfiebervirus nachinfiziert. Unser damaliges Schlußurteil lautete:

„Es ist in einigen Fällen möglich gewesen, Meerschweinchen durch Vorbehandlung mit formalinisierendem Fleckfieberimpfstoff gegen eine nachfolgende Infektion mit virulentem Fleckfieberblut zu schützen; weitere Versuche sind noch im Gange.“

Bei der Fortsetzung und Wiederholung der Versuche hat sich jedoch gezeigt, daß mit einem regelmäßigen Eintreten der Immunität nicht zu rechnen ist, indem auch ein Drittel der mit Blutimpfstoff vorbehandelten Tiere später bei der Nachinfektion mit Passagevirus in der für Fleckfieber charakteristischen Weise erkrankte. Wir müssen daraus den Schluß ziehen, daß sich eine aktive Immunität, wie sie nach überstandener Fleckfiebererkrankung stets eintritt, beim Meerschweinchen durch Einspritzung von abgetötetem Virus, d. h. durch reine Antigenwirkung des nicht mehr vermehrungsfähigen Fleckfiebervirus, nicht mit Sicherheit erzielen läßt. Zu demselben Ergebnis sind neuerdings auch Doerr und Pick gelangt. Natürlich ist dadurch noch nicht erwiesen, daß die gleichen Immunitätsverhältnisse auch beim

Menschen vorliegen müssen, zumal wenn man die großen Unterschiede der Infektionsdosis berücksichtigt. Die Schutzstoffe, welche ausreichen, den Menschen gegen eine Infektion durch Läusestich zu schützen, werden erheblich geringer sein können als diejenigen, welche das Meerschweinchen zur Abwehr der hohen Infektionsdosis braucht, die wir ihm durch intraperitoneale Einverleibung des Passagevirus beibringen.

Wenn auch der aus Menschenblut hergestellte Impfstoff einen gewissen Schutz gegen Fleckfieber zu gewähren scheint, so versuchten wir auch aus den virushaltigen Tierorganen Impfstoffe herzustellen. Unter Anlehnung an das bei der Wutschutzimpfung von V. Babes ausgearbeitete Verfahren wurden Tierorgane (Gehirn und Nebenniere) mit Kochsalzlösung verrieben und auf verschiedene Wärmegrade erhitzt von 45–60°. Bei Erwärmung auf 60° geht der Fleckfiebererreger innerhalb 10 Minuten zugrunde, bei 45° ist er in seiner Entwicklungsfähigkeit stark geschwächt. Mit diesen verschieden abgeschwächten Organen wurde eine Reihe von Meerschweinchen vorbehandelt. Die Versuche führten bisher zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

Nach den neueren Versuchen von Landsteiner und Hausmann sowie Doerr und Pick, welche sowohl das virushaltige Passagehirn eine Woche lang in Glyzerin bei 6° aufbewahrten als auch mit erwärmtem virushaltigen Blut und karbolisiertem Passagehirn Immunisierungsversuche anstellten, läßt sich auf diesem Wege keine aktive Immunität bei Meerschweinchen erzielen. Dagegen konnten diese Autoren Schutzstoffe im Serum der mit Passagevirus (Gehirn) infizierten Meerschweinchen feststellen, die 14 Tage nach intraperitonealer Infektion noch nicht vorhanden, wohl aber 23 Tage nach der Impfung mit virulentem Material nachweisbar waren. Das Auftreten der Antikörper fällt zeitlich mit dem Schwinden der Infektiosität des Blutes und der Organe zusammen. Ob es gelingen wird, durch Mischen von virulenter Hirnemulsion mit einem antikörperhaltigen Fleckfieberserum zu einer praktisch brauchbaren Methode der Schutzimpfung zu gelangen, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung. 1. Durch intraperitoneale Einspritzung von Proteus-X₁₉-Bazillen vorbehandelte Meerschweinchen sind nicht gegen eine nachträgliche Infektion mit Fleckfiebervirus geschützt. Der Bazillus X₁₉ dürfte demnach nicht als Erreger des Fleckfiebers anzusprechen sein.

2. Die mit Fleckfiebervirus infizierten Meerschweinchen geben keine positive Weil-Felix-Reaktion, wohl aber die mit X₁₉-Bazillen infizierten Tiere.

3. Im Blut und in allen Organen des fleckfieberinfizierten Meerschweinchens ist das Virus während des Fiebers vorhanden. Die Inkubation schwankt dabei zwischen 5 und 21 Tagen.

4. An Fleckfieber erkrankte Tiere sind gegen Nachinfektionen immun; ob es möglich ist, mit abgetötetem oder abgeschwächtem Tiervirus eine Immunität zu erzielen, konnte noch nicht entschieden werden.

5. Es empfiehlt sich, nur kleine Tiere im Gewicht von 200–300 g für Infektionsversuche zu verwenden, da schwerere weniger empfänglich sind.

¹⁾ M. Kl. 1918 Nr. 21. — ²⁾ D. m. W. 1918 Nr. 25.