Aus dem Georg Speyer-Haus in Frankfurt a. M.
(Direktor: Geheimrat Kolle.)

Zur Frage der experimentellen Fleckfieberinfektion.

Von Dr. H. Ritz,

Mitglied des Georg Speyer-Hauses.

Während über die Aetiologie des Fleckfiebers trotz der bedeutsamen Fortschritte der letzten Jahre noch keine volle Einigkeit herrscht, ist die Frage der experimentellen Erzeugung der Erkrankung bei Versuchstieren wesentlich geklärt.

Nicolle, Conor und Conseil¹⁾ gelang es zuerst, durch Verimpfung von Blut Fleckfieberkranker bei Affen eine Erkrankung hervorzurufen, die nach einer bestimmten Inkubationszeit zu einer mit Fieberreaktion ähnlich der menschlichen Fleckfieberkurve einhergehenden Krankheit führt und während des Fieberstadiums von den kranken auf gesunde Tiere weiterverimpft werden kann. Als ein weiterer, für die experimentelle Therapie besonders wichtiger Fortschritt mußte die nach Verimpfung von menschlichem Fleckfieberblut bei Meerschweinchen beobachtete, häufig durch Abmagerung, Freßunlust und Fiebertemperaturen charakterisierte Erkrankung betrachtet werden. Diese Beobachtung ist mehrfach bestätigt worden, sowohl bei Versuchen mit Material der in Mexiko vorkommenden, mit Fleckfieber zweifellos identischen Krankheit (Tabardillo, Spotted fever) (Ricketts und Wilder²⁾, Goldberger und Anderson³⁾, Gaviño und Girard⁴⁾, als auch für das afrikanische Fleckfieber (Nicolle, Conor und Conseil⁵⁾) und auch für das europäische, auf dem östlichen Kriegsschauplatz während des Krieges zu erhöhter epidemiologischer Bedeutung gelangte (da Rocha Lima⁶⁾, Töpfer⁷⁾, Otto⁸⁾ u. a.). War schon in allen diesen Beobachtungen durch die charakteristische Fieberbewegung der Zusammenhang zwischen menschlicher Erkrankung und experimentell bei Tieren erzeugter nahegelegt, so wurde die Beweiskette durch die weitere Tatsache geschlossen, daß es gelang, durch Injektion der am fleckfieberkranken Menschen angesetzten Läuse bei Meerschweinchen dasselbe Krankheitsbild hervorzurufen wie durch Blutimpfung. Endlich konnte der Nachweis einer wechselseitigen Immunität der mit Läusen einerseits und mit Blut andererseits infizierten und dann genesenen Tiere erbracht werden.

Neuerdings sind nun diese sonst allgemein anerkannten Versuche auf Grund theoretischer Betrachtungen und Einwände von Friedberger⁹⁾ angezweifelt worden; es ist von ihm besonders darauf hingewiesen worden, daß das vorliegende experimentelle Material nicht zum Beweise einer gelungenen Uebertragung des Fleckfiebers auf Versuchstiere ausreiche und daß vor allen die Fieberbewegung eine andere Deutung zulasse.

Freilich, die Kriterien der Fleckfiebererkrankung des Meerschweinchens sind nicht so ausgesprochen, wie bei anderen Infektionskrankheiten, bei denen der Beweis der gelungenen Uebertragung durch den Nachweis des Erregers oder durch das Auftreten leicht deutbarer makroskopischer und mikroskopischer Veränderungen im Versuchstier geliefert wird. Gerade bei Meerschweinchen, bei denen die Schwankungen der Körpertemperatur nicht selten sind, ist bei der Beurteilung von Fieberbewegungen eine gewisse Skepsis angebracht, besonders da der sonstige Befund während der Erkrankung klinisch und bakteriologisch absolut negativ bzw. nicht charakteristisch ist und die Tiere nach übereinstimmendem Urteil der Forscher der Erkrankung selten erliegen.

I.

Bei voller Würdigung der von Friedberger gegen die experimentelle Infektion vorgebrachten Einwände dürfen zwei Punkte nicht übersehen werden: Was das Fieber anlangt, so könnte, selbst wenn man den von diesem Autor vertretenen Standpunkt anerkennen wollte, daß die Fiebersteigerung bei der Verimp-

¹⁾ Ann. Inst. Pasteur 1911. — ²⁾ Journ. americ. med. Assoc. 1910. — ³⁾ Publ. Health Rep. 1912. — ⁴⁾ Zit. nach Nicolle, Conseil u. Conor. — ⁵⁾ Ann. Inst. Pasteur 1912. — ⁶⁾ Arch. f. Schiffs u. Tropenhyg. 1916. — ⁷⁾ Warschauer Kongreß 1916. — ⁸⁾ M. Kl. 1916. — ⁹⁾ B. kl. W. 1916 u. D. m. W. 1917.

fung von menschlichem Blut auf Meerschweinchen als Reaktion gegen das injizierte artfremde Eiweiß aufzufassen ist, die Deutung des Fiebers als Ausdruck einer anaphylaktischen Reaktion bei den Meerschweinchenpassagen nur durch die nicht sehr plausible Hypothese einer Isoanaphylaxie zu erklären sein. Diese Hypothese kann indessen ausgeschaltet werden. Ich habe zahlreiche Kontrollversuche angestellt, um die Reaktion intraperitonealer Einverleibung von Blut bzw. Organbrei von Menschen und Meerschweinchen bei normalen Meerschweinchen festzustellen. Es trat wohl bei einem Teil der so injizierten Tiere unmittelbar nach der Injektion ein- bis dreitägiges Fieber auf, aber niemals, wie auf Einverleibung von Fleckfieberblut, nach einem längeren Inkubationsstadium, und nie so, daß die Fiebersteigerung mit der für Fleckfieber charakteristischen hätte verglichen werden können.

Aber ganz abgesehen davon, ist die Fleckfieberbewegung, so charakteristisch sie auch jedem, der selbst praktische Erfahrungen damit zu machen Gelegenheit hatte, erscheint, nicht das einzige Kriterium der gelungenen Infektion. Löwy konnte nämlich bei Betrachtung der Haut infizierter Meerschweinchen an der Innenfläche deutliche Roseolen nachweisen, und Bauer sowie Otto gelang der Nachweis pathologischer Veränderungen an den kleinsten Arterien in den Organen, speziell im Gehirn infizierter Meerschweinchen, wie sie ähnlich von E. Fränkel, Benda, Ceelen u. a. bei Menschen gefunden wurden.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden auf Veranlassung von Herrn Geh.-Rat Kollé bereits vor längerer Zeit ausgeführt und sollten die experimentelle Grundlage für die Gewinnung eines für aktive Immunisierung vielleicht brauchbaren Impfstoffes gegen das Fleckfieber bilden. Sie wurden aus äußeren Gründen (Mangel an Versuchstieren, Ausbruch einer Stallseuche) eingestellt und waren nur soweit durchgeführt, um ein sicheres Urteil über den Verlauf des Fleckfiebers bei Meerschweinchen auch in länger fortgesetzten Passagen zu gewinnen. Ihre Veröffentlichung dürfte sich rechtfertigen nicht allein aus diesem experimentell-biologischen Interesse, sondern auch, um die neuerdings aufgetauchten Zweifel an der gelungenen experimentellen Fleckfieberinfektion der Meerschweinchen zu zerstreuen.

Was die Technik der Uebertragung anlangt, so ist zu betonen, daß mit peinlicher Sterilität gearbeitet werden muß. Die meisten Autoren stimmen darin überein, daß fleckfieberkranke Meerschweinchen besonders leicht zu Sekundärinfektion neigen. Bei der Uebertragung von Menschenblut auf Meerschweinchen werden 1–3 ccm defibrinierten Blutes intraperitoneal injiziert. Es tritt unter Umständen danach in den ersten zwei bis drei Tagen eine kurzdauernde Temperatursteigerung, eventuell aber auch ein Temperatursturz ein, der gleichfalls vorübergehender Natur ist. Bei der Meerschweinchenpassage eignet sich neben dem aus dem Herzen gewonnenen sterilen Blut, das in Mengen von 1–3 ccm injiziert wird, auch die Emulsion von Organen in physiologischer Kochsalzlösung. Bereits Nicolle¹⁾ hat hervorgehoben, daß letztere, besonders Gehirn und Nebenniere, bei der Ueberimpfung sehr gute Resultate liefern, eine Tatsache, die auch ich fand. Die Organe werden mit der Schere fein zerschnitten, im Mörser zu Brei zerrieben und dann in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Menge der injizierten Organe betrug etwa $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ Nebenniere, bei Gehirn entsprechend weniger. Auch hier machten sich manchmal in den ersten Tagen Temperaturschwankungen von kurzer Dauer bemerkbar.

Meine Beobachtungen erstrecken sich auf zwei Stämme. Den einen erhielt ich durch Herrn Geh.-Rat Kollé aus einer Bakteriologischen Untersuchungsstelle des östlichen Kriegsschauplatzes. Der Stamm hatte bereits mehrere Passagen in Meerschweinchen durchgemacht, und es waren im Gehirn die bekannten periarteriellen Knötchen durch Löhlein nachgewiesen worden. Dieser Stamm wurde noch weitere sechs Passagen weitergeführt, es konnten noch in den letzten Passagen deutliche Fieberreaktionen und periarterielle Veränderungen im Gehirn nachgewiesen werden, doch wurde die einwandfreie Beurteilung der Fieberbewegungen durch eine mit dem Fleckfieber verimpfte Sekundärinfektion bedeutend erschwert.

Den zweiten Stamm konnte ich selbst durch Verimpfung von Blut eines Fleckfieberkranken gewinnen. Es handelte sich um einen Soldaten, der anscheinend in Rumänien mit Fleckfieber infiziert worden war und bei dem neben typischen klinischen Erscheinungen die Diagnose durch den positiven Ausfall der Weil-Felixschen Reaktion (am 6. Tag 1 : 100 + + +, am 12. Tag 1 : 3200 + + +) gesichert war. Es wurden zweifach je sechs Meerschweinchen mit dem defibrinierten Blute des Patienten intraperitoneal infiziert, und zwar am 6. Fiebertage (Temperatur zwischen 39° und 40°) und am 13. Tage kurz vor der

Entfieberung. Es sei gleich vorweggenommen, daß von den Meerschweinchen der zweiten Serie, abgesehen von einem, das nach hohem Fieber an perinephritischem Abszeß zugrunde ging, keines der Tiere Krankheits- oder Fiebersteigerungen zeigte.

Von den Meerschweinchen der ersten Serie starb das eine an Darmnekrose und Perforationsperitonitis, die übrigen fünf zeigten deutliche Fiebersteigerungen, die zwischen dem 13. und 18. Tage auftraten und, soweit die Tiere nicht vorher zu Weiterimpfung verwandt wurden, etwa zehn Tage andauerten. Von den zur Weiterimpfung bestimmten Tieren wurde teils defibriniertes Blut, teils Nebennierenemulsion normalen Tieren intraperitoneal injiziert. Die stattgefundene Infektion wurde in einem großen Teil der Fälle durch mikroskopische Untersuchung des Gehirns kontrolliert.

Tabelle 1.

Zur Erläuterung sei mitgeteilt, daß die Nummern derjenigen Tiere, die deutliche und charakteristische Fiebererscheinungen aufwiesen, mit Fettdruck und umrandet wiedergegeben sind. Bei jeder Ueberimpfung ist der Tag, an dem diese erfolgte, vermerkt. Die Abkürzungen B und N bedeuten, daß Blut bzw. Nebennierenemulsion zur Infektion verwandt wurde.

Die Betrachtung der Tabelle zeigt, daß die weitaus größte Zahl der Versuchstiere deutliche Fieberreaktionen aufwies, und zwar scheint auch für die Meerschweinchenpassagen in gleicher Weise, wie das auch bei der Uebertragung von menschlichem Fleckfieberblut erwähnt wurde, der Prozentsatz der reagierenden Tiere von dem Zeitpunkt, in dem während des Verlaufs der Erkrankung das Blut übertragen wird, abhängig zu sein. Während von den Tieren, die aus Material vom 14. bis 18. Krankheits-tage infiziert wurden (von den interkurrent gestorbenen abgesehen), unter 26 Tieren nur drei keine Fiebererscheinungen zeigten, wiesen nur vier von zehn mit Material von späteren Tagen geimpften Meerschweinchen Temperatursteigerungen auf. Die Infektiosität scheint in Uebereinstimmung mit Nicolle u. a. demnach mit der Dauer der Erkrankung abzunehmen. Das Fieber bei der Fleckfieberinfektion des Meerschweinchens weist keinen einheitlichen Typus auf. Die Fieberkurve zeigt in vielen Fällen einen ganz charakteristischen Verlauf. Sie steigt zwischen dem 8. und 14. Tage, meist am 10. oder 11. Tage an und erhebt sich zu einer mehrere Tage währenden Kontinua, um entweder ganz allmählich oder auch ziemlich schnell zur Norm herabzusinken. Die Dauer der Fiebersteigerung schwankt zwischen acht und zwölf Tagen (s. dazu die Kurven I, II und V der Tab. 2). Neben solchen ausgesprochen charakteristischen Kurven, wie sie in der Tabelle angegeben sind, kommen nun auch Fieberbewegungen zustande, bei denen die Kurven in der kritischen Zeit zwar noch deutlich erhöht, aber doch mehr oder weniger rudimentär angedeutet sind, sodaß die Beurteilung im Anfange Schwierigkeiten begegnet. Von gewissem Einflusse auf die Fieberreaktion schienen uns in einigen Versuchen die Art des zur Infektion benutzten Materials zu sein. Während die mit Nebennieren und gelegentlich auch mit Gehirnemulsion behandelten Tiere starke Fieberreaktionen unter oft abgekürzter Inkubationszeit aufwiesen, waren die Erhöhungen der Temperatur bei den mit Blut infizierten Tieren weniger ausgesprochen und traten auch etwas später ein.

Was die pathologisch-anatomischen Veränderungen im Gehirn anlangt, so existieren keine Angaben darüber, wann sie auftreten und wie lange sie nachweisbar sind. Ich selbst konnte die Knötchen im Gehirn bei einem Falle noch eine Woche nach der Entfieberung nachweisen. Ein Zusammenhang zwischen Fieberreaktion und pathologischen Befunden im Gehirn ließ sich zwar in der großen Mehrzahl der Fälle feststellen, doch

¹⁾ Compt. rend. Soc. Biol. 1916.

wurden Ausnahmen sowohl nach der einen als auch nach der anderen Seite hin beobachtet.

Einer besonderen Betonung bedarf ferner die schon von früheren Untersuchern erwähnte Tatsache, daß sowohl der sonstige pathologisch-anatomische, als auch der bakteriologische Befund (Blut, Peritonealflüssigkeit) absolut negativ ist und sein muß. Die Deutung von Fieberreaktionen im Sinne erfolgter Infektion bei Anwesenheit pathologischer Veränderungen oder bei positivem Bakteriennachweis muß bei Meerschweinchen mit großer Vorsicht verwertet werden.

Meine Versuche über die Immunität bereits einmal an Fleckfieber erkrankter Meerschweinchen bestätigen die Angaben der früheren Autoren.

Unter den mehrmals mit gleichem Ausfall wiederholten, allerdings nicht sehr zahlreichen Versuchen dieser Art verdient vielleicht der folgende eine ausführlichere Erwähnung: Von einem Meerschweinchen der dritten Passage des Stammes S. (Nr. 299 der Tabelle I) wurden gleichzeitig mit den Tieren 314–319, von denen die Kurven von 314 (I), das mit Nebenniere, und von 317 (II), das mit Blut infiziert wurde, aufgezeichnet sind, folgende Tiere mit Nebennierenemulsion infiziert:

1. Zwei Tiere, welche bereits früher an Fleckfieber erkrankt und von der Erkrankung genesen waren. Es handelt sich um die Meerschweinchen Nr. 281 und 282 aus der zweiten Passage des Stammes S. (vgl. Tabelle 1). Von diesen war 281 mit Nebennierenemulsion, 282 mit defibriertem Blut eines fleckfieberkranken Meerschweinchens vorbehandelt. Die Fiebersteigerung erfolgte am 8. bzw. am 12. Tage, verlief in typischer Weise und dauerte bei beiden Tieren etwa 10 Tage. Die Reinfektion erfolgte ungefähr zwei Wochen nach der Entfieberung.

2. Zwei Tiere, Nr. 196 und 197, die zu ungefähr derselben Zeit, als die Meerschweinchen Nr. 281 und 282 erstmalig infiziert wurden, mit Blut (197) bzw. mit Nebennierenemulsion eines normalen Meerschweinchens intraperitoneal injiziert worden waren und danach keinerlei Reaktionserscheinungen gezeigt hatten.

In der folgenden Tabelle 2 sind die Fieberkurven der Versuchstiere nach der vorstehend erwähnten Infektion aufgezeichnet, mit Ausnahme der Kurve von Tier Nr. 196, das kurz nach der Infektion an Stallseuche starb.

Das Ergebnis des Versuchs zeigt, daß die Kurven derjenigen Tiere, die bereits einmal deutlich an Fleckfieber erkrankt waren, keine Erhöhung aufweisen¹⁾, während sowohl die normalen, von denen nur zwei unter den im übrigen gleichartigen Kurven aufgeführt sind, als auch das mit normalem Blut vorbehandelte Tier ganz typische und gleichartige Fieberreaktionen geben, die fast zu gleicher Zeit einsetzen und etwa zehn bis zwölf Tage dauern. Auch andere in ähnlicher Weise angestellte Versuche ergaben das gleiche Resultat und erbrachten somit den Beweis, daß bei Meerschweinchen das Ueberstehen einer Fleckfieberinfektion eine Immunität gegen die Reinfektion ebenso hinterläßt wie beim Menschen.

Es geht somit aus den Untersuchungen in Uebereinstimmung mit Angaben der oben zitierten Autoren hervor, daß sich durch Verimpfung von menschlichem Fleckfieberblut bei Meerschweinchen eine Erkrankung erzeugen läßt, die durch eine charakteristische, der menschlichen ähnliche Fieberbewegung ausgezeichnet ist.

Die periarteriellen Infiltrationen des Gehirns sind ein

¹⁾ Die Erhöhung der Temperatur bei Tier 282 vom 21. Tage ab ist auf eine Pneumonie zurückzuführen, die den Tod zur Folge hatte.

weiterer Beweis für die spezifische Natur der bei Meerschweinchen experimentell erzeugten Erkrankung.

Diese Erkrankung läßt sich mit Blut und Organemulsionen der erkrankten Tiere während der Fieberperiode, und zwar am leichtesten im Anfang derselben, weiter auf gesunde Meerschweinchen übertragen und hinterläßt bei diesen eine Immunität gegen Reinfektion.

Ein Anhaltspunkt für die Vermutung, daß es sich bei der durch Einverleibung von Material Fleckfieberkranker hervorgerufenen Fieberbewegung um eine anaphylaktische Reaktion handeln könnte, konnte nicht gewonnen werden.

Die Frage, wieweit unsere jetzigen Kenntnisse über das Fleckfieber der Meerschweinchen, und besonders, wieweit die Kriterien der Erkrankung zu einer praktischen Verwendung für experimentell-therapeutische Studien ausreichen, darf wohl nach dem oben angeführten Versuch im Prinzip als gelöst betrachtet werden. Allerdings sind die Schwierigkeiten der Beurteilung, die einerseits durch einen gewissen Prozentsatz refraktärer Tiere, andererseits durch weniger deutlich ausgesprochene Temperaturkurven entstehen, nicht zu unterschätzen. Es ist daher erforderlich, möglichst große Versuchsreihen anzusetzen, die einen besseren Ueberblick gestatten und allen Zufälligkeiten Rechnung tragen.

II.

Der zweite Teil der Untersuchungen beschäftigte sich mit der Frage, wieweit die Rolle des von Weil und Felix bei Fleckfieberkranken gefundenen Bazillus X_{19} experimentell durch Meerschweinchenversuche geklärt werden könnte. Die Ergebnisse der zahlreichen, in dieser Richtung angestellten Versuche stehen durchaus im Einklang mit den Angaben der Autoren und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Eine Züchtung des Bazillus X_{19} oder eines diesem nahestehenden gelang in keinem der zahlreich untersuchten infizierten Tiere.

Die künstliche (subkutane, intraperitoneale, intravenöse) Infektion mit verschiedenen Mengen des Bazillus X_{19} ($1/20$ bis $1/2$ Oese) erzeugt bei Meerschweinchen ein Krankheitsbild, das von dem experimentell erzeugten, Fleckfieber vollständig verschieden ist. Während die Infektion mit kleinen Mengen eine sofort einsetzende, meist leichte und nur einige Tage dauernde Temperatursteigerung zur Folge hat, erzeugt die parenterale Verabreichung größerer Mengen ein Krankheitsbild, das unter ständiger Temperaturerhöhung oft zum Tode führt.

Während das Serum¹⁾ der mit Fleckfieber infizierten Tiere in keinem Stadium der Krankheit eine Agglutininbildung selbst in einer Verdünnung 1:5 gegen den Bazillus X_{19} erkennen läßt, treten, wie Sachs²⁾ schon zeigen konnte, Agglutinine in dem Serum von allen mit X_{19} infizierten Tieren im Verlaufe einer Woche auf. Die Agglutinationswerte schwanken zwischen den Serumverdünnungen von 1:10 bis 1:320. Die Titer bei den mittleren Infektionsdosen liegen bei den Serumverdünnungen 1:20 bis 1:40.

Als weiteres Glied in der Kette dieser Versuche dürfte die von Schloßberger in demnächst zu publizierender Arbeit gefundene Tatsache sein, daß eine Immunität der mit X_{19} infizierten Tiere gegen die Fleckfieberinfektion nicht besteht.

Die vorliegenden experimentellen Untersuchungen gestatten keine einwandfreie Erklärung für das Auftreten von Agglutininen für den Bazillus X_{19} bei der Fleckfieberinfektion des Menschen. Zwar sprechen die mitgeteilten Tatsachen gegen die besonders von Friedberger vertretene ätiologische Bedeutung des Bazillus X_{19} für das Fleckfieber. Allerdings sind die Bedingungen der natürlichen Fleckfieberentstehung des Menschen und der experimentellen Infektion des Meerschweinchens doch nicht ohne weiteres miteinander zu vergleichen. Es ist zweifellos vom theoretischen Standpunkt aus die Möglichkeit zuzugeben, daß das Fleckfiebertoxin durch die normalen Infektionsbedingungen, vielleicht durch die Läusepassage, Veränderungen erfährt, die wir experimentell nicht reproduzieren können und die zu einer grundlegenden Umgestaltung des Antigenapparates des Erregers führen. Immerhin dürften auch die Argumente, die Friedberger für die Erklärung der negativen Versuche an-

¹⁾ Das Serum wurde jeweils durch Herzpunktion gewonnen.

²⁾ D. m. W. 1912.

führt, nicht geeignet sein, im Sinne der von ihm vertretenen Auffassung zu sprechen. Denn einerseits entstehen tatsächlich, wie Schloßberger nachweisen konnte, bei gleichzeitiger Einverleibung von Menschenblut und X_{19} -Bazillen Agglutinine gegen X_{19} , und anderseits erscheint der Vergleich, daß das Kaninchen nach Einverleibung von Typhusblut keine Agglutinine gegen Typhusbazillen bildet, in diesem Falle nicht stichhaltig, da das Kaninchen durch die wenigen im Blute vorhandenen Keime nicht infiziert wird und die Typhusbazillen zugrundegehen, während das mit Fleckfiebermaterial infizierte Meerschweinchen eine Erkrankung durchmacht, die unter den gegebenen Bedingungen des herangezogenen Vergleichs zur Agglutininbildung führen müßte. Auf jeden Fall kann die Frage des Auftretens von Agglutininen für den Bazillus X_{19} beim menschlichen Fleckfieber auch durch die Meerschweinchenversuche noch nicht als gelöst gelten, wenn es auch unwahrscheinlich sein dürfte, daß der Bazillus X_{19} der Erreger des Fleckfiebers ist. Ob er als Mischinfektionserreger Bedeutung besitzt, oder ob die mit Serum Fleckfieberkranker erzeugte Agglutination des Bazillus X_{19} als Paragglutination zu deuten ist, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.