Aus dem Hygienischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule
zu Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch)
Abteilung für Tropenhygiene (Vorsteher: Prof. Dr. Knuth).

Ueber die

Isolierung einzelner Trypanosomen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung

der Würde eines Doctor medicinae veterinariae

der

Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin

vorgelegt von

Franz Henningfeld
approbiertem Tierarzt aus Münster i. W.

VERITAS IUSTITIA LIBERTAS
VETERINÄR-MEDIZINISCHE BIBLIOTHEK
FREIE UNIVER BERLIN

Jena
Gustav Fischer
1914

1913

Aus dem Hygienischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule
zu Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch)
Abteilung für Tropenhygiene (Vorsteher: Prof. Dr. Knuth).

Ueber die
Isolierung einzelner Trypanosomen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
der Würde eines Doctor medicinae veterinariae
der
Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin
vorgelegt von

Franz Henningfeld
approbiertem Tierarzt aus Münster i. W.

Jena
Gustav Fischer
1914

1913

1955,71

Gedruckt mit Genehmigung der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

Referent: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Frosch.

Diese Arbeit erscheint in dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abt. I. Bd. 73, 1914. Heft 3.

Dem Andenken meiner Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Bei der 6. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1912 hat Prof. Dr. W. Kolle (Bern) (5) in Form einer Diskussionsbemerkung folgende Forderung aufgestellt: „Bezüglich der Serumfestigkeit und der Passagestämme (der Trypanosomen) möchte ich bemerken, daß es notwendig ist, von einer Zelle auszugehen, wenn man sichere Schlüsse über Vererbung aus den Versuchen ziehen will."

Dieses „Ausgehen von einer Zelle", und zwar von einem einzigen Trypanosoma, habe ich mir in der vorliegenden Arbeit zum Ziele gesetzt.

Um dies zu erreichen, suchte ich zunächst nach geeigneten Methoden, einzelne Zellen zu isolieren. Mit dem auf irgendeine Weise isolierten Individuum sollten dann nach verschiedenen Richtungen hin Versuche angestellt werden.

Hierzu schien mir die Methode von Prof. Dr. Lindner vom Institut für Gärungsgewerbe an der Königlichen Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin am meisten Erfolg zu versprechen. Lindner (6) hat seine Methode, die bei der Herstellung von Hefe-Einzellenkulturen mit großem Erfolge angewendet wird, in dem von ihm herausgegebenen Lehrbuche „Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben". 5. Aufl. Berlin 1909. p. 230. genau beschrieben.

Gleichzeitig bemühte ich mich auch, die Isolierung einzelner Individuen mittels sehr feiner Kapillaren zu erreichen. Bekanntlich ist diese Methode von Geheimrat Frosch (3) schon 1896 bei der Isolierung von Amöben mit Erfolg angewendet worden. Hierbei begegnete ich aber anfangs erheblichen technischen Schwierigkeiten. Bald darauf erschien dann die Arbeit von K. Oehler (9, 10): „Ueber die Gewinnung reiner Trypanosomenstämme durch Einzellenübertragung", die mir für meine weiteren Untersuchungen wichtige Fingerzeige gegeben hat. Kurz vor Abschluß der vorliegenden Arbeit erhielt ich ferner noch Kenntnis von den nach der gleichen Richtung hin angestellten Versuchen von S. v. Prowazek (12), der ebenso wie Oehler seine Resultate im Centralblatt für Bakteriologie Abt. I. Orig. Bd. 68. H. 5/6 veröffentlicht hat. Die Versuche v. Prowazeks halten sich im wesentlichen an die von Lindner angegebene Technik. Im einzelnen komme ich auf die

Untersuchungsmethoden dieser beiden Autoren bei der Besprechung meiner eigenen Versuche noch zurück. Von W. Nöllers (8) erfolgreichen Deckglaskulturen der Froschtrypanosomen erhielt ich erst Kenntnis nach Abschluß meiner Arbeit.

Vor Beginn meiner Isolierungsversuche habe ich mich zur Orientierung mit der Biologie und Morphologie der Trypanosomen beschäftigt. Hierzu dienten mir die Arbeiten von Jürgens (4), Rabinowitsch und Kempner (13), Doflein (2), Mayer (7), Schuberg und Böing (14) Behn (1), v. Schuckmann u. Wernicke (15), Oehler (9, 10), Ogawa (11) und v. Prowazek (12). Auch habe ich mit deutschen Rindertrypanosomen und den im Blute von Rindern nur auf kulturellem Wege nachweisbaren Flagellaten eine Reihe von Versuchen angestellt. Nach diesen Vorbereitungen begann ich dann mit der Isolierung von einzelnen Trypanosomen.

Technik und Untersuchungsmethoden.

Da ich mich zunächst genau an das Verfahren von Lindner hielt, der mich in seinem Laboratorium in der entgegenkommendsten Weise mit seiner Methode vertraut machen ließ, so sei diese hier eingehend geschildert.

Bei der Lindnerschen Methode kommt es darauf an, eine einzelne Hefezelle zu isolieren, um von dieser Einzelzelle dann einen bestimmten Hefestamm weiterzuzüchten. Zu diesem Zwecke wird die Hefekultur mit Aqua destillata sehr stark verdünnt. Dann nimmt man eine feine Zeichenfeder und macht mit der Flüssigkeit auf ein Deckgläschen eine Reihe ganz kleiner Pünktchen. Damit diese nicht aus- resp. ineinanderlaufen, wird das peinlichst gesäuberte Deckgläschen mit ein wenig Fett (Vaselin oder Paraffin) eingerieben und durch die Flamme gezogen. Während auf das so vorbereitete Deckgläschen die kleinen Pünktchen aufgetragen werden, behaucht man es gleichzeitig, um ein Eintrocknen noch während der Arbeit zu vermeiden. Vorher wird ein gleichfalls peinlich sauberer, hohlgeschliffener Objektträger mit 4 Tröpfchen einer Mischung von Paraffin und Vaselin āā versehen. Hierauf wird dann das Deckgläschen mit der behauchten Seite nach unten schnell so auf den Objektträger gelegt, daß die 4 Ecken des quadratischen Deckgläschens auf die 4 Fettpunkte am Rande des hohlgeschliffenen Kreises zu liegen kommen. Die 4 Punkte laufen auf leichten Druck ineinander. Auf diese Weise entsteht dann eine luftdicht abgeschlossene, feuchte Kammer. Nun beginnt die mikroskopische Untersuchung. Die zweckmäßig in mehreren Reihen angeordneten feinen Pünktchen werden systematisch Reihe für Reihe durchsucht. Das Auffinden derselben wird durch die kleinen, infolge des Behauchens sich bildenden Wasserbläschen wesentlich erleichtert. War die Verdünnung ungefähr zweckentsprechend, so findet sich bald ein Tröpfchen, in dem nur eine einzige Zelle vorhanden ist. Das betreffende Pünktchen merkt man sich. Bei einiger Uebung läßt es sich erreichen, daß 20—30 Proz. der Tröpfchen nur je eine Hefezelle enthalten.

Genau nach dieser von Lindner angegebenen Methode habe ich meine Versuche mit der Isolierung von Trypanosomen angestellt. Ich benutzte Blut von Meerschweinchen oder Mäusen, die mit Nagana oder Dourine oder von Kälbern, die mit dem deutschen Rindertrypanosoma infiziert waren. Das Blut wurde mit Bouillon, physiologischer Kochsalzlösung oder Serum verdünnt und weiter in der oben beschriebenen Art

und Weise verfahren. Dabei stellten sich aber alsbald mehrere Mißstände heraus. Zunächst bereitete die richtige Verdünnung des trypanosomenhaltigen Blutes größere Schwierigkeiten; sodann machte sich bald ein weiterer Uebelstand bemerkbar. Da nämlich fast immer nur die allerkleinsten Tröpfchen ein einziges Trypanosoma enhielten, mußten gerade diese winzigsten Tröpfchen längere Zeit beobachtet werden. Trotz der luftdichten Abgeschlossenheit trockneten aber die Tröpfchen nach einigen Stunden mehr und mehr ein. Das Trypanosoma blieb dann häufig am Rande liegen und konnte nicht mehr in den immer kleiner werdenden Tropfen zurückgelangen. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, daß nach kurzer Zeit, dem Gesetze der Schwere folgend, die roten Blutkörperchen im Mittelpunkte des Tropfens als der tiefsten Stelle sich ansammelten. Dadurch wurde die genaue Beobachtung und Kontrolle sehr erschwert oder ganz unmöglich gemacht. Besonders war dies der Fall, wenn sich das Trypanosoma ebenfalls in der Mitte des Tröpfchens befand.

Besser wurden die Untersuchungsergebnisse, als ich statt hohlgeschliffener gewöhnliche Objektträger nahm und nicht mehr eine Reihe von Tröpfchen auf einem Deckgläschen anlegte, sondern nur noch ein einziges im Mittelpunkte. Es wurden dann mittels eines feinen Pinsels nur die Ränder des Deckgläschens ringsherum vorsichtig eingefettet und dasselbe auf einen Objektträger gelegt. Jetzt hing das trypanosomenhaltige Tröpfchen nicht mehr an der Decke der feuchten Kammer, sondern stützte sich unten auf den Objektträger, wodurch eine breitere Basis und somit bessere Durchsichtigkeit geschaffen wurde. Auch lagen die roten Blutkörperchen jetzt nicht mehr in der Mitte dicht beieinander. Daher konnte der Tropfen nun schon ein wenig größer sein, ohne an Durchsichtigkeit zu verlieren, da er ja beim Auflegen des Deckgläschens nur breiter, aber nicht dicker wurde.

Die Isolierung und die Möglichkeit der Beobachtung einzelner Trypanosomen wäre hiernach also erreicht gewesen, wenn sich nicht beim längeren Aufbewahren der so hergestellten Einzellenkulturen neue Schwierigkeiten ergeben hätten. Nach etwa 7—8 Stunden, spätestens aber nach 20 Stunden, lief regelmäßig entweder der Tropfen aus oder das Fett drang in den Tropfen hinein. Somit bot diese Art, einzelne Trypanosomen zu isolieren, zwar keine besonderen Schwierigkeiten mehr, unmöglich aber blieb es, das isolierte Trypanosoma im lebenden Zustande über eine längere Zeitspanne hin genau zu beobachten.

Für Versuche, bei denen es darauf ankam, ein einzelnes Trypanosoma zu isolieren und mit diesem isolierten Individuum weiter zu experimentieren, war also ein gangbarer Weg gefunden. Nun kam es aber vor allem weiter darauf an, diesem isolierten Trypanosoma möglichst günstige Lebensbedingungen zu bieten. Ferner sollte sich das isolierte Trypanosoma mikroskopisch leicht kontrollieren lassen.

Kapillaren.

Da in der oben angegebenen Weise kaum noch auf eine wesentliche Verbesserung des Untersuchungsverfahrens zu rechnen war, so versuchte ich die Isolierung einzelner Trypanosomen mit Hilfe von Kapillaren, wie sie Herr Geheimrat Frosch (3) bei der Isolierung der Amöben angewendet hat. Anfangs wollte dies nicht glücken. Allmählich gelang es mir aber, Kapillaren herzustellen, die allen Anforderungen auf Durchsichtigkeit des Inhaltes entsprachen.

Um diese Zeit erschien die eingangs erwähnte Arbeit von R. Oehler, der die Isolierung einzelner Trypanosomen ebenfalls mittels Kapillaren versucht und erreicht hatte. Die von Oehler benutzten Kapillaren hatten folgende Maße: 0,02 mm Lichtung und etwas weniger wie 0,01 mm Wandstärke. Die von mir verwendeten Kapillaren hatten im Durchschnitt ein Lumen von 0,018 mm; die Wandstärke betrug 0,006 mm. Die Messung meiner Kapillaren geschah mittels des Zeißschen Kompensationsokulars No. 6 und des Apochromaten 2 mm num. Ap. 1,3. Die Verdünnung des trypanosomenhaltigen Blutes wurde, wie bei den Versuchen mit der Mikrokammer, mit Rinderbouillon, physiologischer Kochsalzlösung, Kaninchen-, Rinder- oder Pferdeblutserum vorgenommen. Wenn eine genügende Menge der verdünnten trypanosomenhaltigen Flüssigkeit in der Kapillare aufgestiegen war, wurde das etwa 7 cm lange Stück auf einen Objektträger gelegt und die beiden Enden vorsichtig unter Benutzung eines feinen Pinsels mit ein wenig Vaselin am Objektträger angeklebt. Hierauf wurde der Inhalt der Kapillare unter dem Mikroskope geprüft. Da es während der mikroskopischen Betrachtung häufiger vorkam, daß durch die ganze Länge der Kapillare eine Luftsäule drang, schloß ich die beiden Kapillarenden luftdicht ab. Vaselin wie auch andere Fette erwiesen sich hierzu als untauglich; recht gut aber gelang der Verschluß mit Leitzschem Deckglaskitt. Derselbe wurde in einem kleinen Porzellanschälchen über der Flamme flüssig gemacht und dann die Kapillarenden hineingetaucht. Dieser Verschluß bewährte sich in der Folge vorzüglich und zeigte sich auch als absolut luftdicht.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Kapillarinhaltes bediente ich mich starker Okulare, in besonderen Fällen des Zeißschen Kompensationsokulars No. 12, und schwacher bis mittelstarker Objektive. Auf diese Weise lassen sich die Trypanosomen infolge ihrer Beweglichkeit sehr leicht auffinden. Hat man erst eine zweckentsprechende Verdünnung, so findet man bald eine Stelle, an der ein einzelnes Trypanosoma durch einen ziemlich großen Zwischenraum nach beiden Seiten hin von den benachbarten Trypanosomen geschieden ist. Um nun dieses Stückchen Kapillare mit dem isoliert liegenden Parasiten aus seinem Zusammenhange zu trennen, empfiehlt sich folgendes Verfahren. Mit einem Leitzschen Objektmarkierer, dessen Spitze mit einem roten Fettstift bestrichen ist, werden zwei rote Pünktchen, innerhalb derer das Trypanosoma sich befindet, auf der Kapillare angebracht. Diese wird dann an den so bezeichneten Stellen, die besonders auf einer weißen Unterlage gut zu sehen sind, mit einem Messer durchtrennt. Ein aufgelegter Objektträger verhindert das Wegspringen des losgetrennten Stückchens.

Nachdem eine abermalige Kontrolle unter dem Mikroskope gezeigt hat, daß sich in dem betreffenden Kapillarstückchen nur ein einziges Trypanosoma befindet, steht die so gewonnene Einzellenkultur zu weiteren Versuchen zur Verfügung.

So einfach diese Methode auch erscheinen mag, so zeitraubend war doch ihre Anwendung. Erst durch große Uebung ließ sich die unbedingt notwendige Schnelligkeit und Sicherheit erreichen. Versucht habe ich mit diesen Methoden sowohl die Isolierung pathogener wie die nichtpathogener Trypanosomen.

Isolierung von pathogenen Trypanosomen.

Von pathogenen Trypanosomenstämmen habe ich das Trypanosoma brucei (Stamm Ferox) und das Trypanosoma equiperdum (Beschälseuche Ostpreußen 1908) benutzt. Die Resultate bei dem ersteren waren folgende. Bei Isolierung nach der Lindnerschen Methode und Verdünnung mittels steriler Rinderbouillon blieben einzelne Trypanosomen bis zu 4 Stunden lebhaft beweglich; dann wurden die Bewegungen matter, und nach längstens 5—6 Stunden war keine Bewegung mehr zu bemerken. Irgendwelche Veränderungen an den einzelnen Individuen waren während dieser Zeit nicht wahrzunehmen.

Erfolgte die Verdünnung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung, so betrug die längste Bewegungsfähigkeit 5 Stunden. Diese wurde jedoch nur einmal ausnahmsweise beobachtet, in allen anderen Versuchen dieser Art war sie bedeutend kürzer, und zwar betrug sie durchschnittlich nur etwa 3—4 Stunden. Auch hier ließen sich besondere Veränderungen an den sorgfältig beobachteten Trypanosomen nicht wahrnehmen.

Bei Verdünnung mit Serum blieben die widerstandsfähigsten Exemplare des Trypanosoma brucei 7 bis höchstens 8 Stunden bewegungsfähig, ohne auch hier irgendwelche Veränderungen zu zeigen.

Ganz ähnliche Resultate zeigten die mit Beschälseuche-Trypanosomen vorgenommenen Versuche. Auch bei diesen war es unmöglich, zu entscheiden, ob die Lebenskraft der Trypanosomen infolge der Ueberführung in die Verdünnungsflüssigkeit in den angegebenen Zeiten erlosch, oder ob die Veränderungen am Tropfen auf die Lebensdauer der Parasiten ungünstig einwirkten. Die ermittelten Zeiten für die Lebensdauer der widerstandsfähigsten Exemplare in der Feuchtkammer waren bei Verdünnung mit Bouillon 6, mit physiologischer Kochsalzlösung 5 und mit Serum höchstens 8 Stunden. Auch hier wurden niemals irgendwelche Veränderungen oder gar eine Vermehrung beobachtet.

Darauf ging ich zu Isolierungsversuchen mittels Kapillaren über, und zwar zunächst mit dem Trypanosoma brucei. In Kapillarröhrchen, die auf die oben beschriebene Weise mit Leitzschem Deckglaskitt fest verschlossen waren, blieben die widerstandsfähigsten Exemplare bei Verdünnung des trypanosomenhaltigen Blutes mit Bouillon 8—9, mit physiologischer Kochsalzlösung 7—8 und mit Serum 11—12 Stunden beweglich. Analoge Versuche mit Trypanosoma equiperdum ergaben als Höchstzahlen bei Verdünnung mit Bouillon 14, mit physiologischer Kochsalzlösung 8 und mit Serum 23 Stunden.

Auch bei allen diesen mit Kapillaren angestellten Versuchen gelang es niemals, eine Teilung oder Vermehrung der Trypanosomen zu beobachten, trotz der verhältnismäßig langen Lebensdauer, die einmal sogar 23 Stunden überschritt, und trotzdem ich über hundert Versuche nach dieser Richtung hin angestellt habe.

Infektionsversuche mit je einem Trypanosoma.

Um festzustellen, ob bei scheinbarem durch das Mikroskop kontrolliertem Verschwinden der Trypanosomen aus der Kapillarflüssigkeit diese tatsächlich nicht mehr infektiös ist, wurde folgender Versuch angestellt. Von einer sehr stark mit Trypanosoma brucei infizierten Maus wurde Blut mit Bouillon reichlich vermischt, und mit dieser Flüssigkeit

zwei Kapillaren gefüllt, die doppelt so stark und etwa dreimal so lang waren, wie die gewöhnlich verwendeten. Bei der um $10^1/_2$ Uhr vormittags unter dem Mikroskope vorgenommenen Prüfung zeigte sich eine große Anzahl von Parasiten, die sich äußerst lebhaft hin und her bewegten. Nach wiederholter sorgfältiger Kontrolle war um 7 Uhr abends kein lebendes Individuum mehr anzutreffen und überhaupt keine Spur von Trypanosomen mehr zu finden. Darauf wurde der Inhalt dieser beiden Kapillaren je einer Maus eingeimpft. Keine von den beiden Mäusen erkrankte. Dieser Versuch wurde am 10. April ausgeführt, am 15. April mit 2 Mäusen und am 21. April mit einer Maus wiederholt, ohne daß eine Infektion eintrat.

Hierauf ging ich dazu über, mit je nur ein einziges lebendes Trypanosoma enthaltenden Kapillarstückchen, die auf die oben beschriebene Art und Weise herausgeschnitten worden waren, andere Tiere zu infizieren.

Am 5. Mai wurden 2 Mäuse mit je einem Stückchen einer Kapillare, das nur ein Trypanosoma des Dourinestammes enthielt, subkutan am Rücken geimpft. Die Verdünnung des Blutes war mit Rinderbouillon erfolgt. Die Impfung geschah auf folgende Weise: Nachdem unter der Rückenhaut nach der üblichen Methode möglichst aseptisch durch Einschieben einer Pinzette oder Schere eine Hauttasche gebildet war, wurde das Kapillarstückchen mit einer feinen Pinzette gefaßt und möglichst weit unter die Haut geschoben. Die Wunde wurde dann mit Kollodium geschlossen.

Am folgenden Tage wurden noch 2 weitere Mäuse auf dieselbe Art, aber diesmal mit Trypanosoma brucei geimpft. Die Blutuntersuchung ergab am 9., 12. und 15. Mai ein negatives Resultat bei allen 4 Mäusen. Am 18. starb eine der mit Trypanosoma brucei geimpften Mäuse, doch war leider eine Untersuchung nicht möglich, da die anderen Mäuse sie bis auf geringe Reste aufgefressen hatten. Auch am 22. Mai war die Blutuntersuchung der noch lebenden 3 Mäuse negativ. Der Versuch wurde damit abgebrochen. Die Infektion der 3 Mäuse mit einem Trypanosoma war somit nachweislich nicht gelungen.

Da Oehler sich bei seinen Versuchen, eine Infektion mit einem Trypanosoma herbeizuführen, zur Hineinschaffung des Kapillarstückchens in den Tierkörper der Spritze bedient hatte, so beschloß ich, diesem Beispiele zu folgen.

Am 22. Mai wurde einer Maus ein Stückchen Kapillare, das Rinderbouillon und ein Trypanosoma brucei enthielt, mittels einer Spritze, die mit 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung gefüllt war, auf folgende Weise eingeimpft: Der Stempel der Spritze wurde so weit vorgedrückt, bis ein Tröpfchen der Kochsalzlösung an der Kanülenspitze hing. Nachdem dann das Kapillarstückchen, das zur Infektion dienen sollte, vorsichtig auf dem Objektträger so weit vorgeschoben war, daß es ein wenig über den Rand herausragte, wurde die Spitze der Kanüle mit dem vorgepreßten Tröpfchen Kochsalzlösung vorsichtig genähert. Im Momente der Berührung wurde das kleine Kapillarstückchen von dem Tröpfchen aufgesaugt. Hierauf wurde das Tröpfchen vorsichtig mit der Spritze wieder aufgenommen, wobei das Glasröhrchen ebenfalls in die Kanüle hinein gelangte. Sodann wurde der ganze Inhalt der Spritze, also 1 ccm Kochsalzlösung plus dem Kapillarstückchen, in dem sich Bouillon plus ein Trypanosoma brucei befand, einer Maus in die Bauchhöhle gespritzt.

Der Vorteil der Anwendung der Spritze liegt meines Erachtens hauptsächlich darin, daß durch die gleichzeitig eingeführte Flüssigkeitsmenge es dem Trypanosoma erleichtert wird, aus der Kapillare zu entkommen. Nach der Impfung nahm ich jedesmal eine sehr sorgfältige Untersuchung der Spritze und der Kanüle vor, um mich davon zu überzeugen, daß das Kapillarstückchen auch tatsächlich mitverimpft worden war.

Am 23. Mai wurde noch eine zweite Maus auf die oben beschriebene Art und Weise intraperitoneal mit einem Trypanosoma brucei geimpft.

Die Blutuntersuchung dieser beiden am 22. und 23. Mai geimpften Mäuse ergab am 27. ein negatives Resultat, und als die Blutuntersuchung auch am 31. Mai noch negativ blieb, wurde die weitere Beobachtung aufgegeben.

Zwei am 2. Juni auf dieselbe Weise mit je einem Trypanosoma equiperdum geimpfte Mäuse blieben ebenfalls dauernd gesund. Da ich mich bei meinen letzten Versuchen streng an die Angaben Oehlers gehalten hatte, dessen Mäuse zu einem Drittel infolge der Infektion mit einem Trypanosoma erkrankt waren, glaubte ich, meine eigenen Mißerfolge in der Art der Trypanosomenstämme suchen zu müssen. Oehler gibt nämlich in seiner Mitteilung nicht an, welche Trypanosomenstämme er benutzt hat.

Da erschien die eingangs erwähnte Arbeit v. Prowazeks, der nach der Feuchtkammermethode gearbeitet hat und dem es gelungen war, mit einem Trypanosoma equinum Voges (Mal de Caderas) sowie mit einem Trypanosoma rhodesiense Infektionen herbeizuführen. Da nun aber, wie ich schon früher auseinandergesetzt habe, die Arbeit mit Kapillaren gegenüber der Arbeit mit hängenden Tropfen ganz bedeutende Vorteile aufweist, nahm ich bei meinen weiteren Versuchen einige kleine Aenderungen vor, die sich in der Folge auch als sehr bedeutsam erwiesen haben. Zunächst wurde das trypanosomenhaltige Blut nicht mehr mit Bouillon, sondern mit Kaninchenblutserum verdünnt, das sich, wie schon erwähnt, bei der Beobachtung auf die Lebensdauer isolierter Trypanosomen als viel geeigneter wie Bouillon und vor allen Dingen besser als physiologische Kochsalzlösung erwiesen hatte. Auch wurde zum Miteinspritzen nun nicht mehr physiologische Kochsalzlösung, sondern gleichfalls Kaninchenblutserum verwendet. Ferner wurde nicht mehr mittels eines hervorgepreßten Flüssigkeitströpfchens das Kapillarstückchen in die Kanüle eingesaugt, sondern das wieder ein wenig über den Rand des Objektträgers vorgeschobene feine Röhrchen mit der Höhlung der Kanüle zu fassen und in dieselbe hineinzuschieben gesucht. Die Kanüle muß hierbei trocken sein. Nachhelfen mit einer feinen Pinzette erleichtert das Arbeiten bedeutend. Befindet sich das Kapillarstückchen in der Kanüle, so sticht man in die Bauchhöhle ein, setzt die mit $^1/_2$—1 ccm Kaninchenblutserum bereit gehaltene Spritze auf die Kanüle auf und befördert mit einem kräftigen Druck den Inhalt der Spritze in die Bauchhöhle, wobei das Stückchen Kapillare mitgerissen wird.

Diese kleine Aenderung hatte den immerhin nicht zu unterschätzenden Vorteil, daß die Kapillare fast im selben Moment in die Bauchhöhle befördert wurde, in dem sie mit der Flüssigkeit der Spritze in Berührung kam, daß es also so gut wie ausgeschlossen war, daß das Try-

panosoma aus seinem Kerker entwich, bevor es an den Ort seiner Bestimmung befördert war. Während anfangs von der Blutentnahme bis zum Augenblicke des Einimpfens eines in einem Kapillarstückchen isolierten Trypanosomas durchschnittlich $2^1/_2$—3 Stunden vergingen, gelang es mir nach längerer Uebung, diese Zeit erheblich abzukürzen. Schließlich vermochte ich sogar unter besonders günstigen Umständen drei Impfungen in einer Stunde zu erledigen.

Vermutlich finden die früheren negativen Resultate in dem langsamen Arbeiten ihre Erklärung.

In einer am 3. Juli begonnenen Versuchsreihe gelang es mir, innerhalb eines Tages 13 Mäuse mit einem Stückchen Kapillare, das mit Kaninchenblutserum verdünntes, ein Trypanosoma equiperdum beherbergendes Meerschweinchenblut enthielt, plus 1 ccm Kaninchenblutserum intraperitoneal zu impfen. Am 7. Juli waren von diesen 13 Mäusen 7 infiziert, die sofort von den 6 anderen, bisher nicht infizierten, getrennt wurden. Bei einer abermaligen Blutuntersuchung am 9. Juli waren von den 6 noch nicht infizierten Mäusen abermals 2 positiv. Die übrigen 4 Mäuse blieben am Leben und zeigten sich auch bei mehrfacher Blutuntersuchung stets negativ. Das Resultat dieses Versuches war also folgendes: Von 13 mit je einem Trypanosoma equiperdum geimpften Mäusen wurden innerhalb von 6 Tagen 9 positiv, also ca. 70 Proz. Die übrigen 4 blieben gesund.

Am 4. Juli wurde dann noch ein analoger Versuch mit dem Trypanosoma brucei angestellt und 7 Mäuse mit je einem Individuum in der oben angegebenen Weise geimpft. Von diesen 7 geimpften Mäusen waren bei der Blutuntersuchung am 7. Juli 2 Mäuse positiv, bei der weiteren Untersuchung am 9. Juli noch 3 weitere positiv, während die 2 übrigen gesund blieben. Hier ergab es sich also, daß von 7 geimpften Mäusen 5 positiv wurden, also 70 Proz., während sich 2 als nicht infiziert erwiesen.

Veränderungen an den Trypanosomen der infizierten Mäuse zeigten sich weder im lebenden noch im gefärbten Präparate.

Auffällig ist die lange Inkubationsfrist von 4, ja bei 2 Mäusen sogar von 6 Tagen bei der Infektion mit dem Trypanosoma equiperdum. Hierzu sei erwähnt, daß gerade dieser Stamm außerordentlich virulent war und durchschnittlich in spätestens $3^1/_2$ Tagen Mäuse tötete. Schon nach $1^1/_2$ Tag pflegten sich zahlreiche Parasiten in der Blutbahn zu zeigen. Im Gegensatz hierzu lebten die mit je einem Trypanosoma infizierten Mäuse durchschnittlich noch 2—3 Tage von dem Zeitpunkt ab, an dem die Trypanosomen im Blute zuerst auftraten. Bei den mit dem Trypanosoma brucei infizierten Mäusen zeigten sich viel geringere Abweichungen von der normalen Infektion. Immerhin dauerte auch hier bei 3 Mäusen die Inkubationszeit länger als 3 Tage. Daraus ließ sich der Schluß ziehen, daß bei Impfung mit nur einem Trypanosoma die Zeit bis zum Auftreten der Parasiten in der Blutbahn wesentlich verlängert wird. Dabei wich die Art ihres Erscheines im Blutkreislaufe in keiner bemerkbaren Weise von dem sonstigen Auftreten ab.

Isolierung von wenig oder gar nicht pathogenen Trypanosomen.

Bei den Versuchen zur Isolierung von wenig oder gar nicht pathogenen Trypanosomen bediente ich mich sowohl des Trypanosoma

theileri als auch der nur auf kulturellem Wege nachweisbaren Flagellaten aus deutschen Rindern, die P. Behn kurzweg Kulturflagellaten genannt hat. Da die mir zur Verfügung stehenden mit Trypanosoma theileri infizierten Kälber nicht genügend Parasiten in der Blutbahn aufwiesen, um bei starker Verdünnung, die zur Isolierung einzelner Zellen unbedingt erforderlich ist, ein einzelnes Individuum auffinden zu können, so versuchte ich auf kulturellem Wege eine Vermehrung der Trypanosomen zu erzielen. Zu diesem Zwecke wurden am 22. Febr. 14 Rinderbouillonröhrchen mit defibriniertem Blute von dem Kalb 27 beschickt, und zwar auf 5—6 ccm sterile Rinderbouillon $1^1/_2$ ccm defibriniertes Blut. In dem Blute dieses Kalbes befanden sich zu dieser Zeit ziemlich viel Trypanosomen.

Die Hälfte der Bouillonröhrchen wurde im Brutschrank bei 36,5° C, die anderen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Bei den im Brutschrank aufgehobenen Röhrchen zeigte sich nach 6—8 Tagen eine starke Vermehrung der Trypanosomen, die bis zum 5. März anhielt. Das letzte lebende Trypanosoma wurde am 7. März, also nach 14 Tagen, gefunden.

Da ich nun gesehen hatte, daß im Brutschrank in Rinderbouillonröhrchen eine reichliche Vermehrung der Trypanosomen stattfand, so wurden, um mit den eigentlichen Einzellenversuchen beginnen zu können, am 8. März von neuem 20 Rinderbouillonröhrchen mit je $1^1/_2$ ccm defibrinierten Blutes von Kalb 27 beschickt. Auch hier wurde wieder ein Teil bei Zimmertemperatur, der andere im Brutschrank bei 36,5° C aufbewahrt. Aber von beiden Teilen wurde nicht ein einziges Röhrchen positiv. Dies läßt sich meines Erachtens nur dadurch erklären, daß sich um diese Zeit im Blute des betreffenden Kalbes gar keine oder nur noch sehr wenige Trypanosomen befanden.

Ferner waren am 24. Febr. 30 Pferdeblutagarröhrchen mit je 5 bis 6 Tropfen defibrinierten Blutes von Kalb 27 beschickt, und hiervon ebenfalls die eine Hälfte im Brutschrank bei 36,5° C, die andere bei Zimmertemperatur aufgehoben worden. Bei keinem dieser Röhrchen zeigte sich eine Vermehrung der Trypanosomen, was allerdings wahrscheinlich auf Infektion mit Bakterien zurückzuführen ist.

Gleichzeitig mit diesen Kulturversuchen und teilweise unter Verwendung der in der Kultur befindlichen zahlreichen Trypanosomen wurden Isolierungsversuche nach der Lindnerschen Methode gemacht. Dabei gelang es mir häufig, das Trypanosoma theileri in einem hängenden Tröpfchen zu isolieren und 5—6 Stunden lang zu beobachten. Aber trotzdem sich das Trypanosoma doch in derselben Flüssigkeit befand wie in der Kultur, nämlich in steriler Rinderbouillon, bemerkte ich niemals einen Vorgang, der auf Teilung oder Vermehrung schließen ließ. Auch die nach der Beobachtung in der feuchten Kammer gefärbten Trypanosomen zeigten außer starker Granulation keinerlei Veränderungen.

Um derartige Präparate noch nachträglich zu färben, nimmt man das Deckgläschen vorsichtig wieder ab und wischt die nicht in Betracht kommenden Tröpfchen sorgfältig weg. Dann fixiert und färbt man den betreffenden Tropfen. Ich habe dieses Verfahren öfter geübt, aber niemals bemerkenswerte Veränderungen an den Trypanosomen vorgefunden. Später als ich durch die Kapillarmethode vielleicht imstande gewesen wäre, längere Beobachtungen eines einzelnen Exemplars des Trypanosoma theileri vorzunehmen, war dies nicht mehr möglich,

weil es sich herausstellte, daß bei der Impfung frischer Kälber mit dem Blute unserer alten positiven Kälber nur noch eine so schwache Trypanosomenvermehrung zustande kam, daß erst nach langem Suchen mit Hilfe der „dicken Tropfen"-Methode hin und wieder ein einzelner Parasit zu finden war. Somit war es mir leider unmöglich, meine Versuche, die doch gerade beim Trypanosoma theileri sehr aussichtsvoll schienen, nach dieser Richtung hin weiter fortzusetzen.

Da nun von den Kulturflagellaten bekannt war, daß sie sich in den Kulturen sowohl vermehren als auch lange Zeit halten, so beschickte ich am 12. März 54 Reagensröhrchen, die etwa 5—6 ccm sterile Rinderbouillon enthielten, mit je 2 ccm defibrinierten Blutes der Kuh Laura aus dem Rassestalle der Königl. Tierärztlichen Hochschule, die nachgewiesenermaßen Kulturflagellaten beherbergte. Die Röhrchen wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Schon am 20. März zeigte sich eine große Anzahl derselben positiv. Leider aber erfolgte nun keine so starke Vermehrung der Flagellaten, daß diese Parasiten sich zu Versuchen mit der Feuchtkammer besonders eigneten. Am 29. April wurden dann nochmals 20 Rinderbouillonröhrchen mit 2—3 ccm defibrinierten Blutes der Kuh Laura beschickt, nachdem ein Versuch mit dem Blute einer anderen Kuh mißlungen war. In fast allen Röhrchen fanden sich nach Verlauf von 6—7 Tagen Kulturflagellaten in reichlicher Anzahl[1]).

Bei allen diesen Versuchen ist es mir nur ein einziges Mal gelungen, und zwar nach der von mir abgeänderten Feuchtkammermethode, einen Vorgang zu beobachten, den man vielleicht als Teilung auffassen kann. Aber schon nach 4 Stunden war der Tropfen so weit ausgelaufen, daß der Flagellat, wahrscheinlich aus Mangel an Flüssigkeit, bewegungslos geworden war. Die längste Zeit, die ich einen Flagellaten im hängenden Tropfen beweglich gesehen habe, betrug 17 Stunden. Immerhin war dies jedoch ein größerer Tropfen, in dem sich mehrere Parasiten befanden, von denen nur einer so lange Zeit bewegungsfähig blieb.

Als ich dann aber zu Versuchen mit Kapillaren überging, wurden sehr schnell günstigere Resultate erzielt. Am 8. April vormittags saugte ich in einer Kapillare Bouillon auf, mit der einige Oesen flagellatenhaltiger Blutbouillon gemischt waren. Die Kapillare wurde mit Leitzschem Deckglaskitt fest verschlossen und zeigte bei der mikroskopischen Untersuchung etwa 6—8 Flagellaten, die mit der Geißel lebhafte Bewegungen ausführten. Bei der Untersuchung am nächsten Tage waren alle Parasiten noch lebhaft beweglich; bei der Untersuchung am 10. April ergab sich dasselbe Bild. Auch noch am 11. April waren die meisten Individuen in lebhafter Bewegung. Am Vormittage des 12. April traf ich noch drei lebende Flagellaten an; erst bei der Untersuchung am 14. April fand ich kein bewegliches Exemplar mehr vor. Somit hatten die widerstandsfähigeren Kulturflagellaten mindestens 4 Tage in der Kapillare zu leben vermocht. Diesen Versuch habe ich noch einige Male mit nur einem Flagellaten in der Kapillare wiederholt; dabei bewegten sich die Geißeln noch am 2. Tage, am 3. Tage waren sie meist unbeweglich. Nur einmal konnte ich beobachten, daß ein einzelner Flagellat 3 Tage lang beweglich blieb. Waren dagegen mehrere in einer Kapillare, so lebten einige regelmäßig länger als 3 Tage.

---

1) Für die Erlaubnis zur Blutentnahme von den Kühen des Rassestalles sei Herrn Geh. Regierungsrat Prof. Dr. Eggeling auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Auffallend war bei diesen Versuchen wieder, daß keinerlei Teilungs- oder Vermehrungsvorgänge zu beobachten waren. Die verwendeten Kulturen waren allerdings schon 4—6 Wochen alt, da erst nach 17 bis 20 Tagen genügend Flagellaten in den Kulturen vorhanden waren, um erfolgreich arbeiten zu können. Das Fehlen von Teilungsvorgängen in meinen Kapillarversuchen ist nun vielleicht so zu erklären, daß um diese Zeit eine weitere Vermehrung der Flagellaten in den Kulturen nicht mehr stattfindet. Jüngere Kulturen dürften sich für diese Beobachtung also besser eignen. Bei dem von mir in der Feuchtkammer einmal beobachteten Teilungsvorgange war die Kultur tatsächlich auch nur 8 Tage alt, nämlich am 29. April angelegt und am 6. Mai beobachtet.

Aber weder früher noch später ist es mir gelungen, von so jungen Kulturen bei genügender Verdünnung weder in der Feuchtkammer noch in der Kapillare einen einzelnen Flagellaten zu isolieren.

Gewinnung von Subkulturen, von einem Trypanosoma ausgehend.

Schließlich wurde noch der Versuch gemacht, mit einem in einer Kapillare isolierten Kulturflagellaten eine Subkultur anzulegen. Zu diesem Zwecke beschaffte ich mir einige Röhrchen mit etwa 5—6 ccm steriler Rinderbouillon, zu der je 1 ccm sterilen defibrinierten Rinderblutes zugesetzt wurde. Dann ließ ich das Stückchen Kapillare, in dem sich ein isolierter Flagellat befand, in dieses Röhrchen hineinfallen. Am 5. April hatte ich auf diese Weise 3 Röhrchen beimpft, ferner am 12. und 14. April noch je ein Röhrchen. Von den 5 auf diese Weise angelegten Kulturen waren zwei bald mit Bakterien verunreinigt, was ja bei der umständlichen Arbeitsmethode erklärlich ist. Die 3 steril gebliebenen Röhrchen ließ ich längere Zeit ganz ruhig stehen. Erst am 21. April wurden dann diese 3 Reagensröhrchen untersucht, ohne eine Spur von Flagellaten zu ergeben. Die Untersuchung am 29. April hatte dasselbe Resultat, so daß ich die Beobachtung aufgab. Auch hier war die verwendete Kultur über 3 Wochen alt, so daß der Mißerfolg möglicherweise auf dieselben Umstände zurückzuführen ist wie oben. Mehrfache Wiederholung dieser Versuche mit jugendlichen Kulturflagellaten mißlang stets, da zu dieser Zeit die Zahl der Flagellaten in den Kulturen noch zu gering war.

Infektionsversuche an Rindern mit je einem Trypanosoma theileri oder je einem Kulturflagellaten.

Leider war es mir nicht möglich, mit diesen wenig pathogenen Trypanosomen auch Tierversuche anzustellen, da hierfür nur Rinder oder Kälber in Betracht kamen. Diese standen mir jedoch nicht zur Verfügung. Ohne Frage wäre es von Interesse, zu erfahren, ob ein einzelnes Trypanosoma theileri imstande ist, bei einem Kalbe eine Infektion hervorzurufen.

Was die Kulturflagellaten anbetrifft, so erübrigte sich ein Versuch nach dieser Richtung, da bereits Ferber[1]) in der Tropenabteilung des

1) Ferber, F., Beiträge zur Biologie der nur auf kulturellem Wege nachweisbaren Flagellaten des Rinderblutes. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 76. 1913.

hiesigen Institutes festgestellt hatte, daß die Kulturflagellaten sich nicht auf Kälber oder Rinder übertragen lassen, selbst wenn auch große Mengen derartiger Kulturen zur Impfung verwendet werden.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse meiner Arbeit möchte ich kurz dahin zusammenfassen:

1) Die Isolierung von Trypanosomen im Sinne von W. Kolle läßt sich sowohl durch die Tröpfchenmethode nach Lindner, als auch mittels Kapillaren erzielen.

2) Die künstliche Infektion von Mäusen gelingt mit einem einzigen Exemplar sowohl des Trypanosoma brucei als auch des Trypanosoma equiperdum.

3) Als Verdünnungsflüssigkeit zum Zwecke der Isolierung eignet sich am besten Serum.

4) Die Isolierung der pathogenen Trypanosomen (Trypanosoma brucei und Trypanosoma equiperdum) gelingt leichter als die des Trypanosoma theileri und der sogenannten Kulturflagellaten aus dem Rinderblute, da letztere beide verhältnismäßig nur spärlich auftreten. Trotz genügender Verdünnung wird nämlich die mikroskopische Beobachtung durch die gleichzeitig vorhandenen roten Blutkörperchen sehr erschwert.

5) Das einzelne Trypanosoma läßt sich nach den beiden oben erwähnten Methoden leicht längere Zeit mikroskopisch beobachten.

Literaturverzeichnis.

1) Behn, Paul, Gehen die bei Rindern kulturell nachweisbaren Flagellaten aus Trypanosomen hervor? (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 70. 1911. p. 371—408.)
2) Doflein, F., Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. VI. Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Frosches. (Arch. f. Protistenk. Bd. 19. 1910. p. 207—231.)
3) Frosch, P., Beitrag zur Biologie saprophytischer Amöben. (Zeitschr. f. Krebsforsch. Bd. 8. 1909. H. 2.)
4) Jürgens, Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen. (Arch. f. Hyg. Bd. 17. p. 265—288.)
5) Kolle, W., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Beih. p. 24.
6) Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 5. Aufl. Berlin 1909. p. 230.
7) Mayer, Martin, Ueber ein Halteridium und Leukocytozoon des Waldkauzes und deren Weiterentwickelung in Stechmücken. (Arch. f. Protistenk. Bd. 21. 1911. p. 232—253.)
8) Noeller, W., Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Uebertragung. (Arch, f. Protistenk. Bd. 31. 1913. p. 169—240.)
9) Oehler, R., Ueber die Gewinnung reiner Trypanosomenstämme durch Einzellenübertragung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 67. 1913. p. 569—571.)
10) —, Zur Gewinnung reiner Trypanosomentsämme. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. p. 110—111.)
11) Ogawa, M., Studien über die Trypanosomen des Frosches. (Arch. f. Protistenk. Bd. 29. p. 248—258.)
12) v. Prowazek, S., Ueber reine Trypanosomenstämme. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 68. H. 5—6.)

13) Rabinowitsch, Lydia u. Kempner, Walter, Beitrag zur Kenntnis der Blutparasiten, speziell der Rattentrypanosomen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 30. 1899. p. 251—294.)
14) Schuberg, A. u. Böing, W., Ueber den Weg der Infektion bei Trypanosomen- und Spirochätenerkrankungen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 57. Beih. p. 226—230.)
15) v. Schuckmann, W., u. Wernicke, K., Einiges über Methoden und Ergebnisse der Trypanosomenzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 68. p. 241—255.)

Lebenslauf.

Ich, Franz Karl Theodor Henningfeld, wurde am 28. September 1883 zu Münster i. W. geboren und bin katholischer Konfession. Vom 6.—9. Lebensjahre besuchte ich die Ludgerischule, dann bis zum 11. Lebensjahre das Paulinische Gymnasium, beide zu Münster i. W., vom 11.—15. Lebensjahre die Privatanstalt zu Telgte, ein Jahr das Progymnasium zu Dorsten und bis zum 19. Lebensjahre das Gymnasium zu Bocholt. Das Maturitätsexamen bestand ich am 20. September 1904 in Warendorf, worauf ich mich an der Königlichen Tierärztlichen Hochschule zu Berlin immatrikulieren ließ. Im Sommer 1907 gab ich das Studium vorläufig auf, um mich dem landwirtschaftlichen Berufe zuzuwenden, ließ mich jedoch im Sommer 1909 von neuem immatrikulieren, bestand am 4. Mai 1910 die naturwissenschaftliche und am 28. Januar 1913 die Fachprüfung, beide zu Berlin. Am 9. Februar erhielt ich die Approbation als Tierarzt. Dann beschäftigte ich mich unter Anleitung des Herrn Professor Dr. Knuth mit der Anfertigung meiner Dissertation.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

846000000578627

colorchecker DIGITAL SG
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
A B C D E F G H I J K L M N
calibrite
0 1 2 3 4 5 6 mm

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Freie Universität Berlin