

M



Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten - Hamburg.
(Vorst.: Medizinalrat Prof. Dr. Nocht)

Studien über Agglomeration und Immunität bei Trypanosoma Lewisi.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der hohen veterinar - medizinischen Fakultät

der

Universität Bern

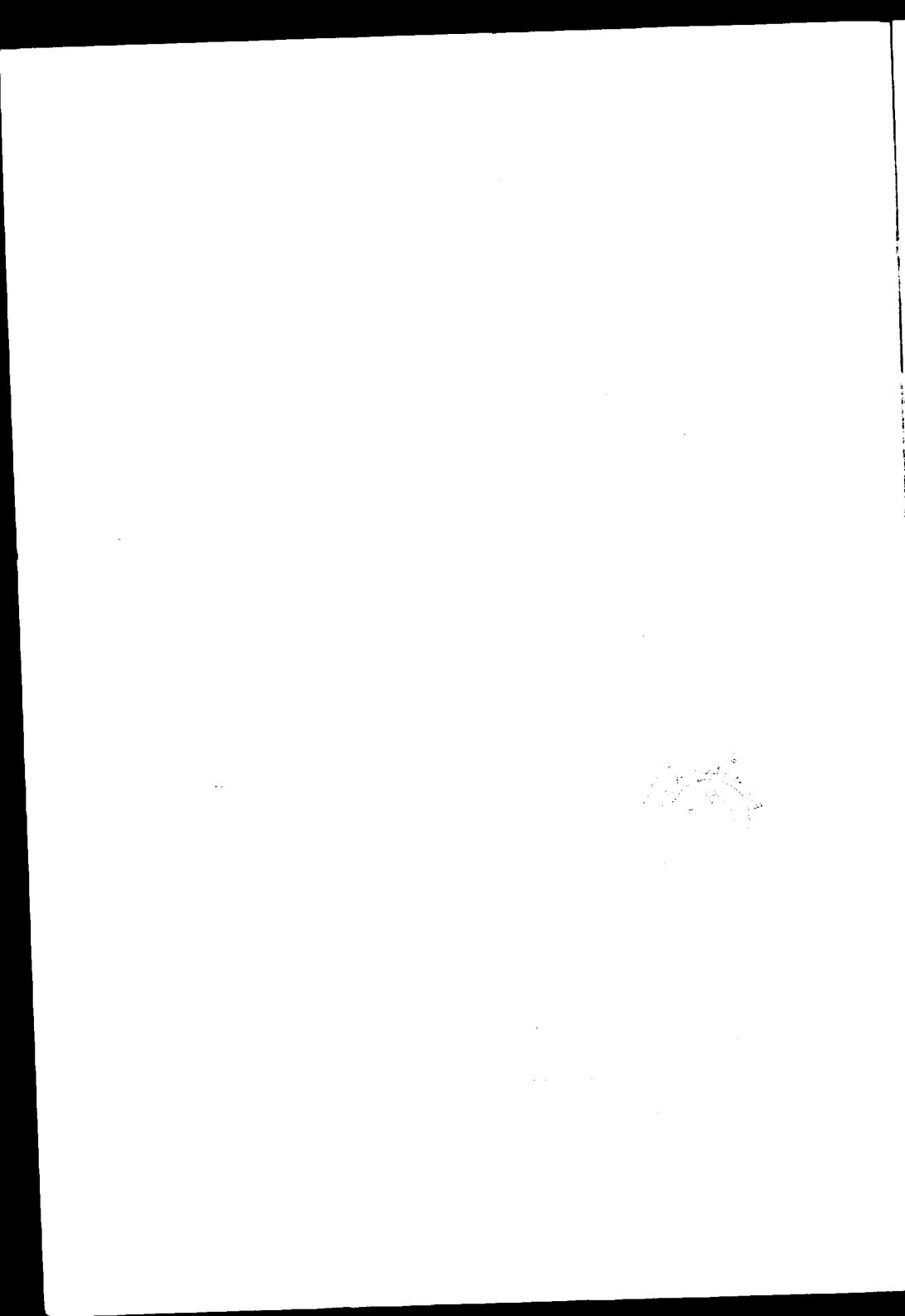
vorgelegt von

Arthur Düring,
Polizeitierarzt in Berlin.



BERLIN 1908.

Verlagsbuchhandlung von Richard Schoetz,
Wilhelmstraße 10.



Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten—Hamburg.
(Vorst.: Medizinalrat Prof. Dr. Nocht.)

Studien über Agglomeration und Immunität bei Trypanosoma Lewisi.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der hohen veterinär - medizinischen Fakultät

der

Universität Bern

vorgelegt von

Arthur Düring,
Polizeitierarzt in Berlin.



BERLIN 1908.

Verlagsbuchhandlung von Richard Schoetz,
Wilhelmstraße 10.

Von der Fakultät auf Antrag von Herrn Professor
Guillebeau zum Drucke genehmigt.

Bern, den 2. Juli 1908.

Der Dekan.
E. Heß.

Meiner Mutter

gewidmet.



Unter den Trypanosomen ist am genauesten *Trypanosoma Lewisi*, sowohl bezüglich der Morphologie der Entwicklungs geschichte als auch der Immunitätsverhältnisse, die in dem infizierten Organismus auftreten, studiert worden.

Es wurde im Jahre 1878 von Lewis im Blute von Ratten in Indien entdeckt. Kent nannte den Parasiten *Herpetomonas*. Durch Gruby fand der Name *Trypanosoma* Aufnahme als Bezeichnung dieses Blutparasiten. Die Entdeckungen von Lewis wurden von Crookshank nachgeprüft und bestätigt; ebenso bringt dieser wie auch Carter genauere morphologische Einzelheiten.

Eingehender beschrieben und beobachtet sind die Parasiten durch Rabinowitsch und Kempner, die das *Trypanosoma Lewisi* als selbständige Art von Rattentrypanosomen erkannten. Diese Angaben bestätigten Laveran und Mesnil, ebenso Wasielewski und Senn, welche sich ebenfalls eingehend mit dem Studium des *Trypanosoma Lewisi* beschäftigt haben. Was zunächst die Größenverhältnisse der Trypanosomen anbelangt, so weisen die Angaben der einzelnen Autoren gewisse Differenzen auf. Rabinowitsch und Kempner geben 14—18, Laveran und Mesnil 11—25, Wasielewski und Senn 8—20 μ an. Diese Differenzen mögen auf die Kontraktionen der Tiere beim Ausstrich zurückzuführen sein. Die erwähnten Autoren haben bereits die einzelnen Bestandteile der Trypanosomenzelle benannt, so wurde die Geißelwurzel, von der der Randfaden der undulierenden Membran ausgeht, Blepharoplast,

die das Protoplasma umgebende Hülle, welche sich vom letzteren durch ihre Färbbarkeit unterscheidet, (sie färbt sich mit Giemsas Eosinazur rot, das Protoplasma dagegen blau) Periplast genannt. Außerdem findet man ungefähr in der Mitte der plattspindelförmigen Zelle einen Kern, der nach dem Typus der bläschenförmigen Kerne gebaut ist. Er besitzt im Zentrum ein nach Giemsa violettrot färbbares Karyosom, das aus Chromatin und Plastin besteht. Die das Karyosom umgebende Zone wird zunächst von einem achromatischen Alveolargerüst gebildet, in dessen Wänden, besonders aber in den Knotenpunkten, Chromatinkörnchen auftreten, während die Zwischenräume des Alveolarwerks von einem Kernenchylema erfüllt sind. Vital kann man das Karyosom am besten durch Zusatz von Brillantkresylblau zur Darstellung bringen.

Neben dem Kern kommen gegen das Vorderende der Zelle im Protoplasma verschiedene Granulationen in wechselnder Zahl vor. Sie sind während des Lebens etwas lichtbrechend, färben sich mit Jodjodkali gelblich, schwärzen sich nicht mit Osmium und nehmen, mit Giemsas Eosinazur gefärbt, einen roten oder rotvioletten Farbenton an. Trotzdem dürften sie nur zum Teil aus Kernsubstanzen etwa im Sinne der Chromidien von Hertwig bestehen, da die Mehrzahl von ihnen sich mit Haematoxylin sowie mit Eisenhaematoxylin nach Breinl und Moore nicht färbt, sondern nur einen schmutziggelben Farbenton annimmt. Vielleicht sind sie mit dem Volutin von Meyer zu vergleichen, das jüngst Swellengrebel auch bei Schlafkrankheitstrypanosomen beschrieben hat.

v. Prowazek, der sich in neuester Zeit sehr eingehend mit dem Studium des Trypanosoma Lewisi beschäftigt hat, gibt als Größe 7–20 μ an. Er bringt auch genauere Angaben über die Bewegung der Parasiten und begründet gleichzeitig seine Behauptung, nach der das geißeltragende Ende als das vordere Ende aufzufassen ist. Es gelang ihm auch, die

Periplasthülle deutlich zur Darstellung zu bringen, und er beschreibt schließlich die Vermehrung des *Trypanosoma Lewisi*.

Während Rabinowitsch und Kempner den Rattenfloh als Zwischenwirt des *Trypanosoma Lewisi* angeben, konnte Prowazek den ganzen Entwicklungszyklus des Tryp. L. in der Rattenlaus (*Haematopinus spinalosus*, Bürmeister) beobachten. Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Tryp. L. unter gewissen Bedingungen agglomerieren, d. h. Häufchen bilden können, sowie daß bei den Ratten-trypanosomen auch eine aktive Immunität vorkommt. Wegen der großen Wichtigkeit der Trypanosomen für die moderne Protistenforschung soll es in folgendem meine Aufgabe sein, an der Hand der Literatur teils Nachprüfungen über oben angeführte Punkte anzustellen, teils zu versuchen, Lücken, die sich noch gezeigt haben, auszufüllen.

Laveran und Mesnil stellten zuerst auf Grund ihrer Versuche fest, daß die Tryp. L. im Rattenblut agglomerieren, sobald das Blut einige Zeit im Eisschrank aufbewahrt war. Dieselbe Agglomeration der Trypanosomen haben sie beobachtet, wenn sie zu den Parasiten Serum von einer Ratte, die eine Infektion mit Tryp. L. überstanden hatte und bei der nach einer folgenden Inokulation keine neuen Parasiten auftraten, hinzufügten. Diese Beobachtung hat auch schon Jürgens gemacht. Laveran und Mesnil konnten ferner feststellen, daß die Agglomeration der Tryp. L. auch eintritt, wenn zu denselben normales Serum von einem Pferde, Hund, Schaf, Kaninchen oder Huhn hinzugesetzt wird.

Weitere Studien haben ergeben, daß Agglomeration der Tryp. L. auch noch durch andere Stoffe bewirkt werden kann.

Die Agglomeration kommt in folgender Weise zustande:

Nachdem die starke Beweglichkeit der Parasiten etwas nachgelassen hat, legen sich zunächst zwei Flagellaten mit dem hinteren Ende an einander. Durch Anlagerung weiterer Parasiten bilden sich nun Agglomerationssterne. Laveran

und Mesnil haben für die beschriebenen Gebilde den Ausdruck „Rosetten“ gewählt. Diese Bezeichnung wird jedoch in neuerer Zeit nur für Teilungsformen benutzt. Verschmelzen mehrere Rosetten unter Bestehenbleiben der Agglomeration, so können die in der Mitte liegenden Individuen zugrunde gehen, und Laveran und Mesnil nehmen an, daß die Ursache des Untergangs der Tryp. L. in den ungünstigen Lebensbedingungen, in die sie durch die Zwischenlagerung gekommen sind, zu suchen sei.

Nocht und Mayer beschreiben Agglomerationen von in Blutagar gezüchteten Tryp. L., bei denen die Trypanosomen sich derartig gelagert hatten, daß die Geißeln nach innen gerichtet waren. Novy und Mc. Neal haben diese Formen auch im Kondenswasser von in Blutagar gezüchteten Tryp. L. beobachtet; sie sehen in diesen Rosetten aber nicht Agglomerations- sondern Entwicklungsformen. Da es sich im Laufe der verschiedenen Untersuchungen herausgestellt hatte, daß die Trypanosomen stets mit dem Ende, an welchem der Blepharoplast gelegen ist, agglomerieren, so konnten die letzteren Formen eventl. Jugendformen sein, bei denen der Blepharoplast eben aus dem Zentralkern nach dem Vorderende der Zelle herausgetreten war und sofort eine Geißel bzw. undulierende Membran gebildet hatte. Solche Entwicklungsstadien agglomerieren dann mit dem Vorderende, während bei den älteren Formen die Agglomeration mit den blepharoplast-führenden Hinterende erfolgt, wobei dann die Geißelenden nach außen gerichtet sind.

Von der Agglomeration, die unter dem Einfluß von heterologen Seren oder fremden Stoffen eintritt, ist die Autoagglomeration zu unterscheiden, die besonders gegen das Ende der Infektion im Tierkörper und zwar in der Milz und Leber auftritt.

Die Agglomeration der Trypanosomen ist von der ähnlichen Agglutination der Bakterien durch folgende Merkmale zu unterscheiden:

Agglomerierte Trypanosomen bilden spezifische Agglomerationssterne, während die Bakterien sich zu Agglutinationsklümpchen zusammenballen.

Agglomerierte Trypanosomen bleiben noch längere Zeit beweglich, können wiederum desagglomerieren und alsdann zum zweitenmal agglomerieren, während agglutinierte Bakterien bewegungslos sind und eine Desagglutination derselben noch nicht beobachtet worden ist. Auch konnte in jedem Fall, in dem die agglomerierten Trypanosomen sich noch als beweglich erwiesen, eine Infektion hervorgerufen werden.

Rabinowitsch und Kempner beobachteten keine Agglomerationen. Diesen Umstand glaubt Manteufel dadurch erklären zu können, daß Sera, die von weißen Ratten, welche eine einmalige Infektion überstanden hatten, gewonnen waren, noch keine oder nur eine angedeutete Agglomerationsreaktion lieferten und daß ebenso sonst gut agglomerierende Sera die Reaktion vermissen ließen, wenn man Blut verwendete, das nur geringe Mengen von Trypanosomen enthielt.

Zu meinen Versuchen bezüglich der Trypanosomagglomeration bediente ich mich stets sorgfältig ausgewaschenen Trypanosomenmaterials. Es wurden die auf der Höhe der Infektion stehenden Ratten in ein steriles Reagenzgläschen, das 5 ccm einer 0,9%igen sterilen Kochsalzlösung und (zwecks defibrinieren des Blutes) Glasperlen enthielt, entblutet. Durch Schütteln wurde das Blut defibriniert und darauf kurze Zeit zentrifugiert; hierauf setzten sich die schweren Blutkörperchen am Boden des Gläschens ab und die Trypanosomen blieben noch im Serum suspendiert. Jetzt wurde dieses Serum abgehoben und einige Zeit (ca. $1\frac{1}{2}$ Stunde) zentrifugiert; infolgedessen sanken die Trypanosomen zu Boden. Um die letzten Serumreste, die den Trypanosomen noch anhafteten, zu entfernen, wurden sie noch zweimal in phys. Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert.

Die Extrakte der Organe wurden in der Weise gewonnen, daß die mit der Schere zerkleinerten Organe in einem sterilen Mörser unter Zusatz von 5 ccm 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung fein verrieben, alsdann stark zentrifugiert und nur die vollständig klare obenaufstehende Flüssigkeit benutzt wurde.

Agglomerationen wurden nicht nur durch spezifische Sera erzielt, sondern auch durch das Hinzubringen einer Lösung von Brillantkresylblau zu ausgewaschenen Trypanosomen. Die Granulationen im Protoplasma der Parasiten färbten sich in diesem Falle violett und blau und dadurch traten die Agglomerationsterne außerordentlich deutlich zu Tage. Dieselbe Reaktion lieferte auch Methylblau, nur daß in diesem Falle die Färbung der Trypanosomen in den Agglomerationsterne nicht eine so schöne war, als bei dem Versuche mit Brillantkresylblau. Auch schwache Säuren, z. B. 0,3 %ige Salzsäure veranlaßten, wie weitere Versuche lehrten, Agglomerationen der Tryp. L. Der Versuch wurde in der Weise angestellt, daß zu etwa 10 ccm 0,9 %iger Kochsalzlösung 2--3 Ösen 0,3 %iger Salzsäure gesetzt und dann zu 2 Ösen dieser Flüssigkeit 3 Ösen Tryp. L. hinzugefügt wurden. Außerdem machte sich im Periplast der Protozoen eine zunächst nur ganz geringe, dann stärker werdende „Trübung“ bemerkbar. Beim stärkeren Säurezusatz hörten die Trypanosomen auf sich zu bewegen, doch trat der Kern und das Periplast außerordentlich klar zu Tage. Das letztere stellte eine deutliche, etwas lichtbrechende Kontur dar. Die Trübung ist vermutlich auf einen Niederschlag der Lipoide im Periplast zurückzuführen. Bekanntlich werden die Lipoide wie Lecithine durch Säuren niedergeschlagen, gewinnen ein milchiges Aussehen und um die einzelnen Tröpfchen bilden sich Niederschlagsmembranen aus. Hingegen wurde beim Hinzusetzen von Kalilauge im Verhältnis von 1:10 nur in einzelnen Fällen schwache Agglomeration beobachtet. Im Anschluß an diese Versuche wurden auch Experimente mit verdünnter Galle und

stark verdünntem taurocholsaurem Natrium ausgeführt. Galle löst, wie Schilling und nach ihm Neufeld und Prowazek beschrieben haben, die Trypanosomen auf. Verdünnte Galle und verdünntes taurocholsaures Natrium wirkten in der Weise auf die Trypanosomen, daß die Kernsubstanz aufgelöst wurde und auch der ganze Zellleib zu verschwinden schien, jedoch zeigte sich bei genauerer Beobachtung oder besser unter Zusatz von Tusche, daß noch einige Zeit eine Art Schatten zu beobachten war. Wurde die Galle stark verdünnt, so bemerkte man, daß sie auf Trypanosomen zunächst agglomerierend und dann später langsam lösend wirkte. Dasselbe gilt von Lösungen des taurocholsauren Natriums. Auch durch Hinzusetzen von 1 %iger Kochsalzlösung zu den Parasiten ließ sich Agglomeration zur Darstellung bringen. Das gleiche Phänomen sah man ferner, wie schon Laveran und Mesnil beschrieben, beim Hinzufügen von Ziegenserum oder dem Serum einer aktiv immunisierten Ratte. Aber nicht nur diese Sera sondern, wie weiter beobachtet wurde, auch Affenserum und — allerdings nur in einem Falle — Menschenserum, — dieses stammte von einem Rekonvaleszenten, der an Malaria gelitten hatte —, ließen Agglomerationen bei Tryp. L. in Erscheinung treten. In anderen Versuchen konnten durch Menschenserum keine Agglomeration zur Darstellung gebracht werden.

Durch die neueren Forschungen ist die Frage des Nachweises einer Infektion durch serodiagnostische Reaktionen in den Vordergrund getreten. Die Methodik der Serodiagnose ist zuerst von Bordet und Gengou sowie auch von Moreschi ausgearbeitet worden. Die von ihnen entdeckte Methode, welche auf dem Zusammenbringen eines bekannten haemolytischen Systems und des zu untersuchenden fraglichen Serums mit dem unbekannten „Antigen“ und „Antikörper“ beruht, wurde Komplementbindung oder -Ablenkung genannt.

Max Neisser und Sachs führten diese Methode in die forensische Praxis ein und Wassermann, Neisser und Bruck gelang es auf Grund dieses Systems eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis festzustellen, Beobachtungen, die unter anderen auch von Sachs und Altmann, Nobl und Arzt sowie vielen anderen bestätigt wurden. Im Anschluß an diese Methode teilte Porges mit, daß beim Hinzufügen von 0,2 % iger Lezithinlösung zu dem Luesserum eine Ausflockung nach $\frac{1}{2}$ bis 24 Std. stattfände, wenn das beschickte Versuchsröhrchen einige Zeit vorher einer Brutschranktemperatur von 37° ausgesetzt war. Weiterhin beschrieb Klausner eine dritte serodiagnostische Methode, bei der er nur zu 0,2 ccm Blutserum eines Luetikers 0,7 ccm Aq. Destill. brachte und bei Zimmertemperatur stehen ließ. Nach einigen, höchstens 15 Stunden, beobachtete er deutlich sichtbare Ausflockung im Glase und einen dichten, durch Ausfällung entstandenen Belag auf dem Boden des Versuchsgläschens.

Angeregt durch diese Beobachtungen stellte ich Versuche nach dieser Richtung auch mit Tryp. L.-Serum an.

Nach sachgemäßer Gewinnung von Serum einer mit Tryp. L. infizierten Ratte wurde ein Reagenzgläschen mit 1 ccm Serum und 1 ccm 0,2 % ige Lezithinlösung beschickt, das Gläschen mit steriler Watte verschlossen, geschüttelt, darauf eine Stunde lang einer Temperatur von 37° im Brutschrank ausgesetzt und alsdann in den Eisschrank gestellt. Nach Verlauf von 16 Stunden sah man eine deutliche körnige Ausflockung.

Zu gleicher Zeit wurden analoge Versuche mit Milzextrakt und 0,2 % iger Lezithinlösung sowie mit Leberextrakt und 0,2 % iger Lezithinlösung gemacht. Hierbei machte sich eine viel dichtere Ausflockung als bei dem Serumversuch bemerkbar. Nach Hinzusetzen von Neutralrot zu den Gemischen in den drei Versuchsgläschchen zeigten alle drei eine rote Farbe, sie reagierten also mehr oder weniger sauer; eine Erscheinung, die bezüglich

des Serums insofern auffallend war, als dieses normal alkalisch reagiert. Allerdings läßt die Alkaleszenz bei älteren, selbst sterilen Seris etwas nach. Deutlicher sauer reagierte der Milz- und Leberextrakt.

Die Reaktion der Lezithinausflockung dürfte sich demnach für Trypanosomenkrankheiten besonders der Haustiere, bei denen man nicht immer die Trypanosomen im peripheren Blute nachweisen kann, empfehlen. Es müssen natürlich vorerst noch zahlreiche Kontrollversuche angestellt werden.

Um zu sehen, ob eine Präzipitation mit verschiedenen Seris zu Tage tritt, wurde auf 0,7 ccm Lewisi-Serum dasselbe Quantum Mal de Caderas-Serum vorsichtig aufgeschichtet, ebenso in einem zweiten Röhrchen zu 0,7 ccm Lewisi-Serum genau so viel Tsetse-Serum; dann wurden diese so beschickten Röhrchen $\frac{3}{4}$ Stunden in den Brutschrank bei 36° und hierauf in den Eisschrank gestellt. Es wurde weder nach 8 noch nach 16, ebensowenig 24 Stunden eine Reaktion beobachtet. Diese Versuchsanordnung war von den diesbezüglichen Kontrollversuchen begleitet. Bekanntlich konnten Fornet und seine Mitarbeiter mit Hilfe der Präzipitation eine annähernd spezifische Luesserodiagnose herausarbeiten, denn sie tritt bei selbst verwandten Spirochaetenkrankheiten wie bei Rekurrens und Hühnerspirillose nicht auf. Aus meinen Versuchen geht hervor, daß die Methode der Präzipitation auf die Trypanosomenkrankheiten nicht anwendbar ist. In anderen Fällen wurde zu 0,2 ccm Lewisi-Serum in einem engen Standglase 0,7 ccm Aq. destill. gebracht und dieses nach guter Vermischung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 5 Stunden zeigte sich eine ganz geringe Ausflockung, die nach weiteren 7 Stunden sehr deutlich war und einen Belag am Boden des Gläschens gebildet hatte. Demnach lieferte die Klausnersche Reaktion hier ein positives Resultat und ist sie für Lues nicht spezifisch.



Durch die Versuche von Rabinowitsch und Kempner ist ermittelt worden, daß bei zahmen Ratten nach überstandener einmaliger Infektion mit Tryp. L. eine aktive Immunität, die durchschnittlich etwa 3 Monate lang dauern soll, erreicht wird. Spritzt man also während dieser Zeit ein- oder mehrmals infektiöses Tryp. L.-Material einer derartigen Ratte ein, so wird eine Infektion nicht zustande kommen. Dieselbe Meinung teilen auch Laveran und Mesnil, ebenso Jürgens.

Im Anschluß an diese Feststellungen wurde, um die Wirkung des Serums einer immunen Ratte auf Tryp. L. zu beobachten, folgender Versuch angestellt:

I. Es wurde von einer einwandsfrei immunen Ratte Serum gewonnen und dieses $\frac{1}{2}$ Stunde einer Temperatur von 57° ausgesetzt und dadurch inaktiviert. Dann wurden 0,8 ccm von mit 0,9 % iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt gewaschenen lebenden Tryp. L. mit 0,8 ccm oben erwähnten Immun-Serums in einem sterilen Gläschen gemischt. Das Gläschen wurde hierauf eine Stunde lang einer Brutschranktemperatur von 36° ausgesetzt.

II. Als Kontrolle wurde ein Gläschen mit 0,8 ccm inaktivierten Immun-Serum, 0,8 ccm aufgeschwemmt Tryp. L. und demselben Quantum Normal-Serum als Komplement beschickt, dann ebenso wie das vorhergehende Röhrchen eine Stunde lang bei 36° in den Brutschrank gestellt und darauf „hängende Tropfen“ aus beiden Gläschen unter dem Mikroskop beobachtet. Es zeigte sich, daß die Trypanosomen in dem Gemisch I von inaktiviertem Immun-Serum plus Tryp. L. plus Normalserum nach einiger Zeit etwas gelähmt waren, während die Parasiten aus dem Gemisch II von inaktiviertem Immun-Serum plus Tryp. L. nichts an Beweglichkeit eingebüßt zu haben schienen. Weitere Beobachtungen, die nach 24 stündiger Aufbewahrung der Gemische im Eisschrank vorgenommen wurden, zeigten, daß man in dem Gemisch von Tryp. L. plus inaktiviertem Immun-Serum nur lebende Trypanosomen erkennen

konnte. Die Trypanosomen aus dem Gemisch von Tryp. L. plus inaktiviertem Immun-Serum plus Normal-Serum erschienen zumeist etwas in die Länge gezogen und unbeweglich, jedoch waren außerdem immer noch einzelne lebende Parasiten zu beobachten.

Zu derselben Zeit, in der ich die vorhergehenden zwei Vitroversuche anstellte, wurde der gleiche Versuch *in vivo* an gesunden Ratten ausgeführt, indem man der einen Ratte 0,8 ccm Tryp. L.-Aufschwemmung plus 0,8 ccm inaktiviertem Immun-Serum plus 0,8 ccm Normal-Serum intraperitoneal einspritzte. Am sechsten Tage nach der Injektion waren in dem Blute dieser Ratte Trypanosomen nachweisbar. Aus diesem Versuche geht hervor, daß die Trypanosomen durch das Immun-Serum nicht direkt abgetötet oder aufgelöst werden, daß sie jedoch nach einiger Zeit *in vitro* eine gewisse Immobilisierung zur Schau tragen, an der scheinbar ein Ambozeptor und ein Komplement des Immun-Serums beteiligt ist. Dieser Teil der Immunitätsreaktion schließt sich an die bekannten Erscheinungen der Bakterien- und Spirochaetenimmunität an und ist ein komplexer Vorgang. Der zweiten Ratte wurden 0,8 ccm Tryp. L.-Aufschwemmung plus 0,8 ccm inaktiviertem Immun-Serum intraperitoneal injiziert. Bei dieser Ratte ließen sich auch nach 14 Tagen auffallender Weise noch keine Trypanosomen im Blute nachweisen; offenbar wurde der spezifische Ambozeptor allmählich von dem eignen Komplement der Ratte aktiviert und verhinderte in diesem Falle die Infektion.

In der Absicht, das Phänomen der Immunität klarzustellen, mußte auch die Rolle der Phagozyten in den Bereich spezieller Untersuchungen gezogen werden. Bekanntlich nimmt Metschnikoff und seine Schule an, daß die Phagozyten beim Zustandekommen der Protozoenimmunität eine Hauptrolle spielen.

Zwecks Studiums der Phagozytose wurden folgende Versuche angestellt:

Einer Ratte wurden 24 Stunden vorher 2 ccm steriler Aleuronatbouillon intraperitoneal eingespritzt und dann von dieser Ratte in der Weise Leukozyten gewonnen, daß der chloroformierten Ratte nach steriler Eröffnung der Bauchhöhle unter Zusatz von 3 ccm 0,9 % iger Kochsalzlösung die intraperitoneale stark leukozytenhaltige Flüssigkeit steril entnommen und dann nach öfterem Auswaschen mit phys. Kochsalzlösung wiederholt zentrifugiert wurde. Das Zentrifugat bestand so gut wie nur aus Leukozyten. Nun wurden zu 0,8 ccm einer Aufschwemmung dieser Leukozyten in phys. Kochsalzlösung 4 Normalösosen Tryp. L. gebracht, das Gemisch alsdann eine Stunde lang im Brutschrank einer Temperatur von 36° ausgesetzt und nachher in den Eisschrank gestellt. Zu gleicher Zeit wurde ein zweites steriles Röhrchen mit 0,8 ccm eben solcher Leukozytenaufschwemmung wie bei dem vorhergehenden Versuche, 0,8 ccm frischem Lewisi-Serum, das spezifische Opsonine (Wright) oder Bakteriotropine (Neufeld) enthalten sollte, und 4 Normalösosen Tryp. L. beschickt. Dieses Gemisch wurde dann wie im vorigen Versuch angegeben weiter behandelt.

In nach Giemsa gefärbten Ausstrichpräparaten aus beiden Röhrchen sah man neben freiliegenden Trypanosomen auch solche, die um einen Leukozyten herumgelagert waren; weiter bemerkte man in einigen Fällen Kerne von Tryp. L. am Rande der Phagozyten und auch 1—5 Kerne im Phagozyten selbst. In fast allen Fällen handelte es sich um mononucleare Mikrophagen, aber es kamen auch polynucleare Leukozyten in Betracht. Zwischen dem einen Trypanosomenmaterial und den Trypanosomen, denen der Voraussetzung zufolge mit dem Serum ein Opsonin oder Bakterio- (Trypano-) tropin hinzugefügt wurde, konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Immerhin war die Phagozytose *in vitro* nicht so bedeutend, daß man auf sie allein die Immunität zurückführen dürfte. Als vergleichender Versuch am lebenden Tiere wurde Trypano-

somenaufschwemmung intraperitoneal einer einwandsfrei aktiv immunen Ratte initiiert. Nach einer halben Stunde und später nach einer Stunde wurde mittelst steriler Glaskapillaren entnommenes Peritonealexudat zunächst im hängenden Tropfen und dann auch in nach Giemsa gefärbten Präparaten untersucht. Im hängenden Tropfen ließen sich schöne Aggregationen beobachten, in den Ausstrichpräparaten ausgesprochene Phagozytose ähnlich den Bildern aus den Vitroversuchen; und zwar in den aus dem nach einer Stunde entnommenen Exsudat hergestellten Präparaten eine stärkere Phagozytose als in denen, welche aus dem nach einer halben Stunde entnommenen Exsudat gemacht waren. Derselbe Versuch wurde alsdann bei einer aktiv immunen Ratte gemacht, der zwecks Phagozytenanreicherung 24 Stunden vorher intraperitoneal Aleuronatbouillon injiziert war. Es zeigte sich in den Präparaten, daß die Phagozytose durch das Aleuronat angeregt eine erheblich lebhaftere war, als in dem Kontrollversuch, bei dem die Immunratte nicht mit Aleuronat vorbehandelt wurde. Bei keiner der beiden Ratten haben sich nachträglich innerhalb 14 Tagen im Blute Tryp. L. nachweisen lassen. Als Ursache der aktiven Immunität geben Laveran und Mesnil an, daß die Leukozyten der immunen Ratten die lebenden Trypanosomen phagozytieren; nach den hier angeführten Versuchen spielt die Phagozytose zwar eine Rolle, daneben kommt aber auch das früher bereits beobachtete Immobilisin des Immun-Serums zur Geltung und die Phagozyten haben in diesem Falle nur die Trypanosomenleichen wegzuschaffen.

Behufs Beobachtung, ob eine Ratte durch Einverleiben von abgetöteten Tryp. L. zu immunisieren sei, wurden derselben innerhalb 10 Tagen viermal durch einstündiges Aussetzen einer Temperatur von 58° im Brutschrank abgetötete Trypanosomen intraperitoneal eingespritzt. Genaue Nachkontrollen zeigten, daß die Trypanosomen wirklich abgetötet und im Blut der Ratte auch 6 Tage nach der letzten Injektion keine

Tryp. L. nachweisbar waren. Am sechsten Tage wurde dieser Ratte ein Tropfen Blut einer stark infizierten Lewisiratte in 2 ccm 0,9 % iger Kochsalzlösung verdünnt, subkutan eingespritzt. Nach 5 Tagen ließen sich im Blut der Ratte Tryp. L. nachweisen. Dasselbe gilt von den Kontrollversuchen. Es ist also durch eine Injektion von abgetötetem Material in dem angegebenen Zeitraum weder eine Immunität noch eine Verzögerung der Infektion zu erreichen.

Zur Feststellung, welche Schutzwirkung der Milz, die nach einigen Autoren ein trypanosomenzerstörendes Organ darstellt, zuzuschreiben ist und ob Milzextrakt einer immunen Ratte noch infektiös wirken kann, wurde zunächst einer gesunden Ratte der Milzextrakt einer immunen und als Vergleich einer zweiten gesunden Ratte der Milzextrakt einer stark mit Tryp. L. infizierten Ratte intraperitoneal einverleibt. Die Ratte, welcher der Milzextrakt der infizierten Ratte injiziert war, zeigte am siebentem Tage darauf Tryp. L. im Blute, während bei der Ratte, welcher Milzextrakt der immunen eingespritzt war, auch nach 14 Tagen keine Tryp. L. im Blute nachzuweisen waren.

Daraus geht hervor, daß in dem untersuchten Falle in der Milz keine besonderen Ruhestadien wie etwa bei der Malaria (Makrogameten) vorkommen, die eine zweite Infektion auslösen. Die aktiv immune Ratte war demnach tatsächlich immun, es handelte sich nicht um eine *immunitas non sterilans*, die leider sonst bei den Protozoenkrankheiten vorherrscht und „Parasitenträger“ schafft.

Um zu ermitteln, ob eine Vorbehandlung einer gesunden Ratte mit Milzextrakt einer immunen von irgend welchem Einfluß wäre, wurde einer gesunden Ratte 10 Tage nach Einverleibung des Milzextraktes einer immunen Ratte Tryp. L. auch intraperitoneal eingespritzt. Nach 5 Tagen waren im Blut der Ratte die Trypanosomen nachweisbar. Es zeigte sich also, daß eine Vorbehandlung einer gesunden Ratte mit

Milzextrakt einer immunen erstere nicht vor der Infektion schützte, noch letztere verzögerte.

Aus diesen Versuchen, die allerdings noch erweitert werden müßten, geht bezüglich der Immunität bei Tryp. L. hervor:

1. Bei den weißen und gefleckten Ratten tritt eine echte aktive Immunität, eine Immunitas sterilans, auf.
2. Dem Serum kommen zunächst agglomerierende und erst in zweiter Linie nicht stark immobilisierende Eigenschaften komplexer Natur (Ambozeptor und Komplement) zu.
3. Die Phagozytose, die tatsächlich beobachtet wurde, spielt bei der Immunität nicht eine ausschlaggebende Rolle.
4. Man kann mit Milzextrakten nicht passiv immunisieren.
5. Spritzt man einer Ratte gleichzeitig mit den Trypanosomen inaktiviertes spezifisches Serum ein, so kann man die Infektion zurückhalten.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Vorstand des Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten zu Hamburg, Herrn Medizinalrat Prof. Dr. Nocht, für die Erlaubnis in diesem Institut mein Thema bearbeiten zu können, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Herrn Dr. v. Prowazek, Leiter des zoologischen Laboratoriums des genannten Instituts, der mir Gelegenheit bot, in diesem Laboratorium zu arbeiten, mir das Thema überließ und meine Arbeit geleitet hat, danke ich herzlichst für die stets gleiche Bereitwilligkeit und für die mir gewidmete Zeit und Mühe.

Ebenso sage ich dem Herrn Kollegen Dr. Sieber von obengenanntem Institut für sein bereitwilliges Entgegenkommen meinen besten Dank.

Literatur-Verzeichnis.

Carter. Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India. 1887, vol. 4, pag. 50.

Crookshank. Flagellated protozoa in the blood of deceased and apparently healthy animals. Journ. of the Royal Microscopial society. Nov. 1886, pag. 913.

Eisler, M. v. Über Komplementablenkung und Lezithinausflockung. Wien. Klin. Wochenschrift No. 13. 1908.

Fornet und S. Schereschewsky. Serodiagnose bei Lues, Tabes und Paralyse durch spezifische Niederschläge. Münch. Med. Wochenschr. 1907. No. 30.

Fornet, Schereschewsky, Eisenzimmer und Rosenfeld (Straßburg). Spezifische Niederschläge bei Lues, Tabes und Paralyse. Deutsche Med. Wochensehr. 1907. No. 41.

Hertwig, R. Die Protozoen und die Zelltheorie. Archiv für Protistenkunde. 1902. S. 1.

Hertwig, R. Über das Wechselverhältnis von Kern und Protoplasma. Sonderabdruck. Vorgetragen in den Sitzungen d. Ges. f. Morph. und Phyl. München. 4. Nov. 1902 und 19. Mai 1903.

Jürgens. Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen. Archiv für Hygiene. 1902. Bd. 42.

Klausnér, E. Vorläufige Mitteilung bei einer Methode der Serum Diagnosistik bei Lues. Wien. Klin. Wochenschr. 1908. No. 7.

Klausner, E. Über eine Methode der Serumdiagnostik bei Lues. II Wien. Klin. Wochenschr. 1908. No. 11.

Kleine, F. U. Möllers, B. Eine für Tryp. Brucei spezifisches Serum und seine Einwirkung auf Tryp. gambiense. Sep. Abdr. a. d. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankheiten v. Koch, Pflügge, Gafsky. 1906. Bd. 52.

Laveran, A. et Mesnil, F. Trypanosomes et Trypanosomiases. Masson et Cie. Paris 1904.

Laveran, A. et Mesnil, F. Infektions Naturelles de Rats Blanks Par Trypanosoma Lewisi. Compt. Rend. Hebd. d. S. et. M. de la Société de Biologie. Année 1904.

Lewis. Flagellated organisms in the blood of healthy rats. Appendix 14 to the Annual. Rep. of San. Comm. Gov. of India 1878. Quart Journ. of Micr. Sc. 1879 vol. 19, pag. 109.

Lewis. Further observations on flagellated organisms in the blood of animals. Ibid. 1884, vol. 24.

Manteufel. Untersuchungen über spezifische Agglomeration und Komplexbildung bei Trypanosomen und Spirochaeten. Arb. a. d. K. Gesundheitsamt. 1908. Bd. 28. Heft 1.

Mayer, M. Experimentelle Beiträge zur Trypanosomeninfektion. Zeitschr. f. experim. Path. u. Ther. Bd. 1. (pag. 539 — 546).

Metschnikoff, E. Immunität der Infektionskrankheiten. E. autor. Übers v. Dr. J. Meyer, Charlottenburg. Verlag v. Fischer. Jena 1902.

Meyer, A. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volintins. Botan. Zeitung. Jahrg. 62. 1904. S. 113 — 152.

Moreschi, C. Zur Lehre von den Antikomplementen (1. Mittl.). Berl. Klin. Wochenschr. 1905. No. 37.

Moreschi, C. Zur Lehre von den Antikomplementen (2. Mittl.). Berl. Klin. Wochenschr. 1906. No. 4.

Moreschi, C. Über den Wert des Komplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik. Berl. Klin. Wochenschr. 1906. No. 38.

Mc. Neal & Novy. Cultivation of Trypanosoma Lewisi. Contribution to Med. Research to V. C. Vaughan. Juni 1903.

Mc. Neal & Novy. The life history of Tryp. Lewisi and Brucei. Ibid. 1904, vol. 1, pag. 517.

Neisser, A. (Breslau). Die experimentelle Syphilisforschung nach ihrem gegenwärtigen Stande. Springer. Berlin 1906.

Neufeld, F. u. Hüne. Untersuchungen über baktericide Immunität und Phagozytose nebst Beiträgen zur Frage der Komplementablenkung. Arb. a. d. K. Gesundheitsamt. 1907. Bd. XXV.

Neufeld, F. u. v. Prowazek. Über die Immunitätserscheinung bei der Spirochaetenseptikämie der Hühner und über die Frage der Zugehörigkeit der Spirochaeten zu den Protozoen. Arb. a. d. K. Gesundheitsamt. 1907. Bd. XXV.

Nissle, A. Zur Kenntnis der Nagana- und Rattentrypanosomen. Hygien. Rundschau. 1904. No. 21.

Nissle, A. Beobachtungen am Blute mit Trypanosomen geimpfter Tiere. Arch. f. Hygiene. 1905. Bd. LIII.

Nobl u. Arzt. Zur Serodiagnostik bei Syphilis. Porges, Meyer und Klausnersche Reaktion. Wien. Klin. Wochenschr. 1908. No. 9.

Nocht, B. u. Mayer, M. Trypanosomen als Krankheitserreger. Hob. d. path. Mikroorganismen h. v. Kolle u. Wassermann. I. Ergänzungsband. Jena 1907.

Porges, O. u. Meyer, G. Über die Rolle der Lipoide bei der Wassermann'schen Syphilis Reaktion. Berl. Klin. Wochenschr. 1908. No. 15.

Prowazek, S. v. Studien über Säugetiertrypanosomen. Arb. a. d. Ksl. Gesundheitsamt. Berlin 1905. Bd. XXII, Heft 2.

Rabinowitsch, L. und Kempner, W. Beitrag zur Kenntnis der Blutparasiten, speziell der Rattentrypanosomen. Zeitschrift f. Hyg. und Infekt.-Krankh. Koch & Flügge 1899. Bd. XXX.

Sachs, H. und Altmann, K. Über den Einfluß der Reaktion auf das Zustandekommen der Wassermannschen Komplementbindung bei Syphilis. Berl. Klin. Wochenschr. 1908, No. 14.

Salvin-Moore, J. E. and Breintl, A. Note on the Life Cycle of the Sleeping Sickness. The Lancet 1907. May 4.

Schütz, J. (Wien). Über Opsonine und ihre praktische Bedeutung. (Sammelreferat über die Literatur bis Ende 1907.) Wien. Klin. Wochenschr. 1908, No. 12.

Schütze, A. Zur Heilung akuter Infektionskrankheiten mittelst spezifischer Seren. Zeitschr. f. Infektionskrht. und parasitäre Krankheiten u. Hyg. der Haustiere. Berlin 1906. Bd. I.

Strubell, A. Beiträge zur Immunitätslehre: Über Opsonine. Münch. Med. Wochenschr. 1907. No. 44.

Swellengrebel, N. H. (Amsterdam). La volutine chez les Trypanosomes. Compt. Rend. Hebdo. d. S. et M. de la Société de Biologie. 1908 Tome LXIV No. 2.

Wasielewski und Senn, G. Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten des Rattenblutes. Sep. Abdr. a. d. Zeitschrift für Hyg. u. Infektionskrht. Koch & Flügge, Gaffky. 1900. Bd. XXXIII.

Wassermann, A., Neisser, A. und Bruck, C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutsche Med. Wochenschr. 1906. No. 19.



13184

1867

Druck von Gebrüder Grunert, Berlin SW.