[Aus dem Biologischen Laboratorium (Dr. E. Teichmann) des Städtischen
Hygienischen Instituts der Kgl. Universität Frankfurt
(Direktor: Prof. Dr. M. Neisser)]

Mischinfektionsversuche mit Trypanosomen.

Von

Dr. Ernst Teichmann

Privatdozent an der Universität.

I. Wie sich künstlich erzeugte Mischinfektionen mit Trypanosomen bei Mäusen verhalten, ist zuerst von A. Laveran und D. Roudsky (1912) untersucht worden. Sie stellten sich blepharoplastlose Stämme von *Trypanosoma Brucei*, *Trypanosoma Evansi* und *Trypanosoma sudanense* her, indem sie Oxazin auf die Parasiten einwirken ließen. Solche Trypanosomen, mit normalen Individuen desselben Stammes gemischt, verdrängen diese in 2 bis 10 Mäusepassagen vollständig. Danach hat R. Oehler (1914) experimentell geprüft, wie sich künstlich erzeugte Mischinfektionen mit Trypanosomen bei Mäusen verhalten. Oehler stellte sich durch Einzelzellenübertragung aus dem in unserem Institut gehaltenen, mit Stamm 4 bezeichneten Naganastamm (über seine Herkunft vgl. H. Braun und E. Teichmann [1912] S. 7 und [1914] S. 13) einen Einzelzellenstamm her. Ein Zweig dieses Stammes wurde gegen Salvarsan, ein anderer gegen *Tartarus stibiatus* festgemacht, während ein dritter unbehandelt und also arzneiempfindlich blieb. Jeder der arzneifesten Zweige wurde sodann mit dem arzneiempfindlichen gemischt, auf Mäuse überimpft und in diesen Tieren weitergezüchtet. Im Laufe der Passagen entmischten sich die Trypanosomen, und zwar immer so, daß die arzneifeste Komponente der Mischinfektion allmählich verschwand. Für die Entmischung macht Oehler die Differenz in der Vermehrungszahl verantwortlich und er gibt der Meinung Ausdruck, daß wohl alle akuten Stämme, „die durch viele Passagen fortgepflanzt wurden, als einheitlich anzusehen seien, so einheitlich, wie wenn sie von einem einzigen *Trypanosoma* abstammten“.

Eine einfache Überlegung zeigt, daß in der Tat ein Unterschied in der Vermehrungsgeschwindigkeit im Laufe der Passagen mit Notwendigkeit zur Unterdrückung der minder schnell sich teilenden Trypanosomen führen kann, vorausgesetzt, daß mit der größeren Vermehrungsgeschwindigkeit auch die stärkere Virulenz verbunden ist. Das Zahlenverhältnis wird sich in solchen Fällen unter Mithilfe der künstlichen Übertragungen schnell so sehr zuungunsten der langsamer sich vermehrenden Trypanosomen verschieben, daß sehr bald der Zeitpunkt eintreten kann, wo die eine Mischungskomponente überhaupt nicht mehr mitübertragen wird. Es fragt sich aber, was geschehen wird, wenn eine Infektion aus zwei oder mehreren Stämmen zustande kommt, die sich nicht durch Vermehrungsgeschwindigkeit und Giftigkeit voneinander unterscheiden lassen.

Die folgenden Versuche wurden unternommen, um der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen. Unter den zur Verfügung stehenden Naganastämmen wurden zwei ausgewählt, die sich nach Vermehrungsgeschwindigkeit und Virulenz gegen Mäuse anscheinend gleich verhielten; diese beiden in unserem Institut gehaltenen Stämme wurden dort als Stamm 4 und Stamm 90 Fl. bezeichnet. Die Herkunft des letztgenannten Stammes ist bei Braun und Teichmann (1914) auf S. 25f. beschrieben. Hier interessiert vor allem, daß er sich ebenso wie Stamm 4 in Mäusen sehr schnell vermehrt und den Tod der Tiere in 4 bis 6 Tagen herbeiführt. Auch aus der Anzahl der von beiden Stämmen in einer bestimmten Zeit durchlaufenen Mäusepassagen läßt sich erkennen, daß sie sich in dieser Hinsicht annähernd gleich verhalten. Stamm 4 durchlief vom 8. IV. bis zum 16. VIII. 1915, also in 131 Tagen, 47, Stamm 90 Fl. vom 8. IV. bis zum 14. VIII. 1915, also in 129 Tagen, 43 Mäusepassagen. Das ergibt für die Passage durchschnittlich etwa 2·8 Tage im einen und 3 Tage im anderen Falle. Eine genauere Bestimmung der Virulenz läßt sich mit der zwischen den Überimpfungen verstrichenen Zeit nicht errechnen, da ja der Spielraum, innerhalb dessen die Übertragung geschehen kann, einige Tage beträgt. Aus dem kleinen Unterschied in der Dauer der Passagen darf daher nicht auf einen, wenn auch geringen Unterschied in der Vermehrungsgeschwindigkeit geschlossen werden. Morphologisch sind die beiden Stämme nicht zu unterscheiden; sie sind beide monomorph.

Dagegen sind biologische Unterscheidungsmerkmale vorhanden. Der Stamm 4 ist seit dem Jahre 1911, in dem er von unserem Institut erworben wurde, stets in Ratten oder Mäusen fortgezüchtet worden; die Passagen sind in dieser Zeit niemals mit Arzneimitteln in Berührung gekommen. Trotzdem war dieser Stamm, als er im Jahre 1914 von mir gegen Chemikalien geprüft wurde, gegen Arsen hochgradig unempfindlich. Genauere

Angaben hierüber erfolgen an anderer Stelle. Der Stamm 90 Fl. dagegen erwies sich als arsenempfindlich. Hiermit stand ein Mittel zur Verfügung, mit dem die beiden Stämme voneinander unterschieden werden konnten. Eine zweite Möglichkeit, sie gegeneinander abzugrenzen, war durch ihr antigenes Verhalten an die Hand gegeben. Wie in der Arbeit von Braun und Teichmann (1914) auf S. 11ff. bewiesen ist, sind die von den beiden Autoren untersuchten ostafrikanischen Naganastämme immunisatorisch von Stamm 4 verschieden. Dies gilt auch, wie zahlreiche inzwischen angestellte Versuche bestätigten, für den Stamm 90 Fl. Kein Immunserum, das durch Infektion oder Vakzination mit Stamm 90 Fl. von Kaninchen gewonnen wurde, hatte schützende Eigenschaften gegen Stamm 4, und umgekehrt, kein mit Trypanosomen des Stammes 4 erzeugtes Immunserum schützt gegen eine Infektion mit Stamm 90 Fl. Durch zweckentsprechende Verwendung der beiden Sera ist es mithin möglich, festzustellen, welcher der beiden Trypanosomenstämme in dem infizierten Versuchstier vorhanden ist.

Die Frage, zu deren Beantwortung der folgende Versuch unternommen wurde, lautet: Findet bei Mischinfektion mit gleichvirulenten Naganastämmen eine Entmischung statt und, wenn dies der Fall ist, in welchem Sinne verläuft sie?

Um diese Frage zu beantworten, wurden möglichst gleich dichte Aufschwemmungen von Trypanosomen der Stämme 4 und 90 Fl. in Kochsalzlösung hergestellt, gleiche Mengen davon miteinander gemischt, und von dieser Mischung 5 Mäusen je 1 ccm subkutan injiziert. Von jeder dieser Mäuse wurden Passagen angelegt, und die fünf so erhaltenen Stämme mit den Ziffern I bis V bezeichnet. Dabei wurde Bedacht darauf genommen, daß stets reichlich Trypanosomen auf jede neue Passage übertragen wurden. Nachdem die 6. Passage erreicht war, wurde einer der fünf Stämme mit Serum geprüft.

5 Mäuse erhielten je $\frac{1}{2}$ ccm Immunserum von Stamm 90 Fl. intraperitoneal, 5 Mäuse erhielten je $\frac{1}{2}$ ccm Immunserum von Stamm 4 intraperitoneal, 5 Mäuse erhielten je $\frac{1}{2}$ ccm Immunserum von Stamm 90 Fl. und je $\frac{1}{2}$ ccm Immunserum von Stamm 4 intraperitoneal.

Diese 15 Mäuse wurden am folgenden Tage aus der 6. Passage des Stammes Maus V subkutan infiziert. Dazu wurden für jedes Serum 10 Kontrollmäuse angesetzt, von denen immer 5 mit dem homologen und 5 mit dem heterologen Stamm infiziert wurden (Serumkontrollen). Schließlich wurden mit den zur Infektion benutzten 3 Stämmen, nämlich Stamm 4, Stamm 90 Fl. und Stamm Maus V je 5 Mäuse zur Kontrolle infiziert. Diese Infektionskontrollen zeigten sämtlich am 3. oder 4. Tage nach der Infektion Trypanosomen im Blut und starben am 5. bis 7. Tage. Die

Serumkontrollen ergaben, daß jedes der beiden verwendeten Sera gegen den homologen Stamm schützt, nicht aber gegen den heterologen. Von den 15 Mäusen, die aus der 6. Passage des Stammes Maus V infiziert worden waren, blieben nur die 5 mit dem kombinierten Serum von Stamm 4 und Stamm 90 Fl. vorbehandelten Tiere frei von Trypanosomen; bei den beiden anderen Gruppen zeigten sich in derselben Zeit wie bei den Kontrollmäusen Parasiten im Blut, und der Tod trat gleichzeitig mit dem der Kontrolltiere ein.

Dieser Befund beweist, daß in der 6. Passage des Mischstammes V beide Mischungskomponenten vorhanden waren, und zwar, wie nach der fast völligen Gleichzeitigkeit des Auftretens der Trypanosomen und des dadurch bedingten Eintritts des Todes der Versuchstiere in den beiden mit nur einem Serum vorbehandelten Gruppen angenommen werden darf, in annähernd gleicher Stärke.

Da bei den von Oehler (1914) angestellten Versuchen jedesmal die giftigste Komponente im Laufe der Passagen aus der Mischinfektion entfernt wurde, konnte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der arsenfeste Stamm 4 auch in diesen Versuchen aus der Mischung verschwinden werde. Wenn dieser Fall eintrat, so mußte eine Arseninjektion die Trypanosomen aus dem Blut beseitigen. Es wurde daher Passagemäusen, nachdem von ihnen überimpft war, 0·01 g Arsazetin injiziert, eine Gabe, durch die die Trypanosomen des arsenempfindlichen Stammes 90 Fl. zum Verschwinden gebracht werden. Alle 5 Mischstämme enthielten in der 5. Passage arsenfeste Trypanosomen (Stamm 4); denn die Injektion des Arsazetins übte auf den Verlauf der Infektion keinen merklichen Einfluß aus. Dies änderte sich jedoch bei der nächsten Arsazetinprobe, die die Passage 10 der Stämme IV und V und die Passage 11 der Stämme I und III — der Stamm II war abgerissen — betraf. Während nämlich die Trypanosomen der Stämme I, III und IV auf 0·01 g Arsazetin nicht reagierten, waren sie bei Stamm V am Tage nach der Injektion verschwunden und traten auch in den folgenden Tagen nicht wieder auf. Nach diesem Befund hatte sich also der Stamm V in dem Sinne entmischt, daß die Stamm 4-Komponente ausgeschieden und der Stamm 90 Fl. allein übrig geblieben war.

Ein Versuch mit Serum, der zugleich mit der Arsazetinprobe angesetzt worden war, ergab, daß sich der Stamm Maus V in der Tat bereits in der 10. Passage von der Stamm 4-Komponente völlig befreit hatte. Der Versuch wurde in der schon beschriebenen Weise ausgeführt. In den 3 mit Serum vorbehandelten Gruppen erkrankten nur die mit Stamm 4-Serum behandelten Mäuse, die anderen blieben trypanosomenfrei; sie enthielten mithin ausschließlich Trypanosomen des Stammes 90 Fl. (vgl. Protokoll Nr. 1). Da

in der 6. Passage des Stammes noch beide Komponenten hatten nachgewiesen werden können, muß die Entmischung in dem kurzen Zeitraum der 3 Passagen 7 bis 9 vor sich gegangen sein.

Nach dem, was sich aus den Versuchen mit Stamm V ergeben hatte, schien es wahrscheinlich zu sein, daß sich auch die drei anderen Mischstämme von der arsenfesten Stamm 4-Komponente befreien würden. In der 10. oder 11. Passage dieser Stämme waren giftigste Trypanosomen noch vorhanden gewesen. Auch in der 15. Passage, die wieder mit Arsazetin geprüft wurde, war die Resistenz gegen das Gift nicht aufgegeben. Danach wurde die 20. oder 21. Passage aller vier Stämme einer Prüfung mit Serum unterworfen. Es ergab sich, daß sich die Stämme I, III und IV ebenfalls entmischt hatten. Aber während Stamm V die Trypanosomen des Stammes 90 Fl. festgehalten hatte, waren gerade diese bei den drei anderen Stämmen verschwunden; sie enthielten nur noch Parasiten des arsenfesten Stammes 4. Ob die Reinigung hier früher oder später als bei Stamm V vollzogen wurde, darüber sagen die Versuche nichts aus. Dagegen zeigen sie, daß Empfindlichkeit oder Festigkeit gegen Arsen keinen Ausschlag dafür geben kann, welcher von zwei konkurrierenden Stämmen das Feld behauptet. Ich füge das Protokoll des Versuchs mit dem Stamm Maus III bei; der Verlauf bei den Stämmen I und IV war wesentlich der gleiche (vgl. Protokoll Nr. 2).

Bei Mischinfektion mit zwei möglichst gleich virulenten, akuten Naganastämmen führt mithin die Methode der Fortzüchtung der Trypanosomen durch Mäuse- oder Rattenpassagen, wie sie allgemein geübt wird, zur Entmischung der Stämme. Die Entmischung kann durch Unterdrückung des einen oder des anderen Stammes erfolgen. Empfindlichkeit oder Festigkeit gegen Arsen üben auf die Richtung der Entmischung keinen bestimmenden Einfluß aus.

II. Aus dem Verlauf der mitgeteilten Versuche ist nichts darüber zu entnehmen, durch welche Umstände die Entmischung zweier gleichvirulenter Trypanosomenstämme herbeigeführt werden könnte. Es war denkbar, daß Besonderheiten dabei eine Rolle spielten, die in der Methode der Übertragung der Parasiten von Maus zu Maus ihren Grund hatten. Vielleicht war in der zur Impfung verwandten Blutmenge zufällig nur der eine der beiden Stämme vertreten, während an anderen Stellen des Blutgefäßsystems Trypanosomen auch des anderen Stammes kreisten. Da im Herzen Blut aus allen Körpergegenden zusammenströmt, so darf angenommen werden, daß sich dort Trypanosomen aller im Kreisläufe etwa vorhandenen Stämme mischen. Jedenfalls war, wenn das Herzblut verimpft wurde, möglichst Gewähr dafür geboten, daß die angedeuteten Zufälligkeiten aus-

Protokoll Nr. 1.

Serum von dem mit Stamm 4 infizierten Rind Nr. 2 vom 18. IV. 1912. Serum von dem mit Stamm 90 Fl. infizierten Kaninchen Nr. 26 vom 30. X. 1913. Zur Infektion wurde die 10. Passage des Mischstammes Maus V benutzt.

Maus Nr.	Behandelt am 11. VIII. 15 mit:	Infiziert am 12. VIII. 15 mit:	Trypanosomenbefund										Gestorben am	Bemerkungen
			16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	
1	0.5 cem Immuner. von Stamm 4 + 0.5 cem Immuner. von Stamm 90 Fl. intrapertoneal	Stamm Maus V 10. Passage subkutan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	getötet
2			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
3			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	getötet
4			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
5			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	getötet
6	0.5 cem Immuner. von Stamm 4 intrapertoneal	Dasselbe	+	+										—
7			+	+										—
8			+	+										—
9			+	+										—
10			+											—
11	0.5 cem Immuner. von Stamm 90 Fl. intrapertoneal	Dasselbe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
12			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
13			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	getötet
14			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
15			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
16	— — — —	Dasselbe	+	+	+									—
17			+	+	+									—
18			+	+	+									—
19			+	+	+									—
20			+											—

Ergebnis: Serum von Stamm 4 + Serum von Stamm 90 Fl. schützt gegen die Infektion mit der 10. Passage des Mischstammes Maus V. Serum von Stamm 90 Fl. schützt gegen dieselbe Infektion.

Protokoll Nr. 2.

Serum von dem mit Stamm 4 infizierten Rind Nr. 4 vom 18. IV. 1912. Serum von dem mit Stamm 90 Fl. infizierten Kaninchen Nr. 26 vom 30. IX. 1913. Zur Infektion wurde die 20. Passage des Mischstammes Maus III benutzt.

Maus Nr.	Behandelt am 7. IX. 15 mit:	Infiziert am 8. IX. 15 mit:	Trypanosomenbefund								Gestorben am	Bemerkungen
			11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.		
1	0.5 cem Immuner. von Stamm 4 + 0.5 cem Immuner. von Stamm 90 Fl. intrapritoneal	Stamm Maus III 20. Passage subkutan	—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	getötet
2			—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	"
3			—	—	0	0	(+)	0	0	(+)	18. IX.	"
4			—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	"
5			—	—	0	0	0	(+)	++	++	18. IX.	"
6	0.5 cem Immuner. von Stamm 4 intrapritoneal	Dasselbe	—	—	0	0	+	++	++	++	17. IX.	—
7			—	—	0	0	0	+	++	++	18. IX.	getötet
8			—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	"
9			—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	"
10			—	—	0	0	0	0	0	0	18. IX.	"
11	0.5 cem Immuner. von Stamm 90 Fl. intrapritoneal	Dasselbe	—	—	++	++	++	++	++	++	14. IX.	—
12			—	—	++	++	++	++	++	++	13. IX.	—
13			—	—	++	++	++	++	++	++	14. IX.	—
14			—	—	++	++	++	++	++	++	14. IX.	—
15			—	—	++	++	++	++	++	++	14. IX.	—
16	—	Dasselbe	0	—	+	+	+	+	+	+	15. IX.	—
17			0	—	++	++	++	++	++	++	15. IX.	—
18			0	—	++	++	++	++	++	++	15. IX.	—
19			0	—	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	16. IX.	—
20			(+)	—	++	++	++	++	++	++	14. IX.	—

Ergebnis: Serum von Stamm 4 + Serum von Stamm 90 Fl. schützt gegen die Infektion mit der 20. Passage des Mischstammes Maus III. Serum von Stamm 4 schützt gegen dieselbe Infektion.

geschlossen wurden. Es fragte sich also, wie sich die beiden gemischten Stämme verhalten würden, wenn die Übertragung von Maus zu Maus mit dem im Herzen angesammelten Blute vorgenommen wurde.

Um auf diese Frage eine Antwort zu erhalten, wurden abermals fünf Mischstämme aus Stamm 4 und Stamm 90 Fl. hergestellt. Dabei wurde jeder der beiden Stämme für sich überimpft. Die so erhaltenen Stämme VI bis X wurden in Passagen fortgezüchtet, indem den mit Äther betäubten Mäusen das Herz entnommen, und dessen Inhalt, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, intraperitoneal auf die nächste Passage übertragen wurde. Da die Stämme immer in je zwei Mäusen gehalten wurden, so wurde stets das von beiden Passagemäusen gewonnene Blut vermischt zur Überimpfung verwandt. Jeder Maus wurde auf diese Weise eine Blutmenge einverleibt, die dem Inhalt des Herzens einer Maus entsprach. Fast immer wurde die Weiterimpfung nach 24 Stunden, einige Male nach 48 Stunden vorgenommen. Nach Verlauf dieser Zeit waren nämlich die Trypanosomen bereits so zahlreich, daß es nicht anging, mit der Übertragung bis zum nächsten Tage zu warten.

Von den auf diese Weise fortgezüchteten Stämmen wurden zwei, nämlich Stamm VII und Stamm X, nachdem sie 21 Passagen durchlaufen hatten, mit Serum geprüft. Der Versuch wurde in der bereits beschriebenen Weise ausgeführt und ergab, daß in der 22. Passage dieser Stämme noch beide Komponenten vorhanden waren: Sowohl mit Stamm 4-Serum als auch mit Stamm 90 Fl.-Serum vorbehandelte Mäuse zeigten nach der Infektion gleichzeitig mit den Kontrollen Trypanosomen im Blut. Mit dem bei den Stämmen I, III, IV und V erzielten Ergebnis verglichen, macht sich hier ein Unterschied bemerkbar, insofern bei diesen die Entmischung schon in der 20. oder 21. Passage vollendet war; ja aus dem Verhalten von Stamm V, der bereits in der 10. Passage die eine Komponente verloren hatte, darf vielleicht geschlossen werden, daß die Entmischung auch bei den anderen Stämmen erheblich vor der 20. oder 21. Passage stattgefunden hatte.

Der Mischecharakter der Stämme VII und X erhielt sich noch länger. Bei Stamm VII enthielt auch die 30. Passage, bei Stamm X sogar noch die 36. Passage beide Trypanosomenarten. Dagegen hatte sich bei Stamm VII die 34. und bei Stamm X die 40. Passage von der Stamm 90 Fl.-Komponente befreit.

Aus diesen Versuchen geht mithin hervor, daß die Entmischung zweier möglichst gleichvirulenter akuter Stämme auch dann eintritt, wenn die Überimpfungen mit dem Herzblut ausgeführt werden. Durch die Art, wie dies geschah, wurden große Mengen Blutes und dementsprechend sehr

zahlreiche Parasiten von Maus zu Maus übertragen. Trotzdem ging die eine Mischkomponente verloren; dies ereignete sich, nachdem etwa doppelt so viele Passagen durchlaufen worden waren, wie deren bei der gewöhnlichen Übertragungsweise zur Reinigung des Mischstammes nötig gewesen waren. Bei der Überimpfung mit Herzblut folgen sich aber die Passagen doppelt so schnell, wie bei der gewöhnlichen Überimpfungsart; in jenem Falle wurden 20 Passagen in 26 Tagen, in diesem die gleiche Anzahl in 53 Tagen angelegt. Hinsichtlich der Zeit, innerhalb deren die Reinigung erfolgte, besteht danach kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden.

III. Nach den bisher mitgeteilten Versuchen darf angenommen werden, daß sich Naganamischstämme, die eine akut verlaufende Krankheit bei Mäusen hervorrufen, auch dann, wenn die Komponenten gleichvirulent sind, nach kurzer Zeit reinigen. Um nun zu untersuchen, wie sich diese Verhältnisse gestalten, wenn Trypanosomenstämme verwandt werden, die bei Mäusen einen chronischen Verlauf der Infektion herbeiführen, ist die Methode der Prüfung mit Immunsera der gemischten Stämme nicht verwertbar. Denn da die Trypanosomen chronischer Stämme ihre antigenen Eigenschaften fortwährend ändern, gelingt es nicht, ein wirksames Immunsorum gegen sie zu erzeugen. Doch bietet sich ein Weg, der eine sichere Unterscheidung der Komponenten einer Mischinfektion gestattet, indem morphologisch verschiedene Trypanosomenarten verwendet werden. Bei den folgenden Versuchen wurden *Trypanosoma Brucei* und das kleine ostafrikanische *Trypanosoma*, das dem *Trypanosoma congolense* gleicht, miteinander gemischt. Bei der Auswahl der Stämme wurde Bedacht darauf genommen, daß die Krankheit, die jeder von ihnen hervorruft, in möglichst ähnlicher Weise verläuft. Es gelang, in dem Naganastamm 63 und dem Congolensestamm b zwei geeignete Komponenten zu finden. Der Stamm 63 wurde aus einem indischen Rinde in der Nähe von Dar-essalam gewonnen. Mit ihm infizierte Mäuse können mehr als 30 Tage lang Parasiten im Blute beherbergen. Dabei wechselt der Trypanosomenbefund. Fast immer erfolgt eine deutlich hervortretende Remission bald nach dem ersten Anstieg. Nimmt dann die Parasitenzahl wieder zu, so erreicht sie schnell eine Höhe, auf der sie sich während vieler Tage bis zum Tode des Tieres hält. Die Tabelle 3 gibt den Verlauf einer mit Stamm 63 erfolgten Infektion bei der Maus wieder.

Die Trypanosomen des Stammes b gehören zu der kleinen Form, der Braun und Teichmann (1914) in Deutsch-Ostafrika häufig begegneten, und die morphologisch mit *Trypanosoma congolense* übereinstimmt. Stamm b ist aus einer Ratte gewonnen, an der drei Glossinen

Tabelle Nr. 3.

Verlauf der Infektion bei *Trypanosoma Brucei* Stamm 63.

Tage nach der Infektion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 bis 29	30
Trypanosomenbefund	—	0	+	++	+++	+	0 Remission	+	++	+++	†

Tabelle Nr. 4.

Verlauf der Infektion bei *Trypanosoma congolense* Stamm b.

Tage nach der Infektion	1 bis 7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22 bis 29	30
Trypanosomenbefund	0	(+)	+	+++	+++	++	++	0	0	0	(+)	(+)	(+)	++	++	+++	†

gesaugt hatten (Braun und Teichmann [1914] S. 31ff., S. 36). Bei Mäusen verursacht dieser Stamm eine Erkrankung, die sich über 4 Wochen hinziehen kann; dabei ist die Neigung zu Remissionen sehr ausgesprochen. Der Trypanosomenbefund wechselt daher stark. Tabelle 4 zeigt den Verlauf einer Infektion bei der Maus. Die Remission erfolgt um die Mitte der Krankheitsdauer, während sie bei Stamm 63 im ersten Viertel liegt.

Es wurden nun 5 Mäuse (Nr. 1 bis 5) mit je $\frac{1}{2}$ ccm einer möglichst gleichdichten Aufschwemmung jedes der beiden Trypanosomenstämme subkutan infiziert, und der Verlauf der Infektion täglich beobachtet. Sobald die Parasiten einigermaßen zahlreich im Blute erschienen, wurden Ausstrichpräparate angefertigt, die an der Flamme fixiert und mit Fuchsin gefärbt wurden. Es gelingt dann leicht, mikroskopisch die Trypanosomenarten festzustellen, die im Blute vorhanden sind. Bei allen 5 Mäusen traten beide Formen auf. Die Mäuse lebten verschieden lange: Nr. 3 starb am 7., Nr. 4 am 8., Nr. 1 am 9., Nr. 5 am 18. und Nr. 2 am 24. Tage nach der Infektion.

Von Maus Nr. 2 wurde am 21. Tage nach der Infektion, zu einer Zeit, wo beide Trypanosomenarten etwa in gleicher Zahl im Blute kreisten, auf die Mäuse Nr. 16 bis 20 überimpft. Bei den Mäusen Nr. 17 und 19 erschienen beide Arten, bei den Mäusen Nr. 16 und 18 nur *Trypanosoma Brucei* und bei Maus Nr. 20 nur *Trypanosoma congolense*. Bei Maus Nr. 18 trat am 12. Tage eine ausgesprochene Remission ein; am 26. Tage nach der Infektion starb das Tier. Maus Nr. 16 starb am 28., Maus Nr. 17 am 5., Maus Nr. 19 am 6. und Maus Nr. 20 am 12. Tage nach der Infektion. Von keinem dieser Tiere wurde weitergeimpft.

Dagegen wurden von Maus Nr. 5 am 9. Tage nach der Infektion die Mäuse Nr. 11 bis 15 infiziert; am Tage der Impfung waren beide Arten im Blute der Maus Nr. 5 in etwa gleicher Anzahl nachzuweisen. Die Tabelle 5 zeigt den Verlauf der Mischinfektion bei Maus Nr. 11. Zur Erklärung der verwandten Zeichen diene folgendes: Die Anzahl der Parasiten ist in der üblichen Weise durch Kreuze bezeichnet; b bedeutet *Trypanosoma Brucei*, c *Trypanosoma congolense*; einfache Klammer () besagt, daß die eingeklammerte Trypanosomenart in der Minderzahl ist, doppelte Klammer (()) deutet an, daß nur vereinzelte Exemplare der eingeklammerten Art gefunden wurden.

Tabelle Nr. 5.

Verlauf der Mischinfektion aus Stamm 63 und Stamm b
in der Maus Nr. 11.

Tage nach der Infektion	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Zahl der Trypanosomen	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Art der Trypanosomen	b und c	Remission			(b) und c	b und c	b	b	b	b und ((c))	b und ((c))
Tage nach der Infektion	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27
Zahl der Trypanosomen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	†
Art der Trypanosomen	b und (c)	b und c	b und c	b und c	(b) und c	b und c	b und (c)	b und c	b und c	b und c	—

Die Mischinfektion stellt, wie ein Vergleich mit Tabelle 3 und 4 ergibt, eine sehr genaue Addition des Infektionsverlaufes ihrer beiden Komponenten dar. Es ist deutlich zu sehen, wie zunächst *Trypanosoma Brucei* (b) remittiert, dann nach einigen Tagen *Trypanosoma congolense* (c) folgt. Dann steigt die Zahl der Parasiten beider Arten zu gleicher Höhe an und hält sich auf ihr mit geringen Schwankungen, bis der Tod des Tieres eintritt. Auch bei den vier übrigen Mäusen dieser Passage waren beide Trypanosomenarten nachzuweisen; auch bei ihnen schwankte deren Zahlenverhältnis, wenn das auch infolge des früher eintretenden Todes dieser Tiere nicht in so ausgeprägter Weise wie bei Maus Nr. 11 zur Erscheinung kam.

Am 17. Tage nach der Infektion wurde von Maus Nr. 11 auf die Mäuse der 3. Passage (Nr. 21 bis 25) überimpft. Der Trypanosomenbestand war

an diesem Tage b und ((c)); Congolense war also nur in vereinzelter Exemplaren in den Blutaussstrichen nachzuweisen gewesen. Trotzdem erschienen beide Arten von Trypanosomen in allen Mäusen der 3. Passage. Bei den Mäusen Nr. 21, 22, 23 und 25 trat zunächst nur Brucei auf, bei Nr. 24 war es wenigstens in der Mehrzahl. Aber nach wenigen Tagen stellte sich auch bei den anderen Tieren Congolense ein und vermehrte sich so, daß beide Trypanosomenarten binnen kurzem gleich stark vertreten waren; in einzelnen Fällen kam es zu ausgesprochener Remission von b.

Am 12. Tage nach der Infektion wurde abermals eine Passage angelegt. Der Trypanosomenbestand der Maus Nr. 21 war an diesem Tage b und c. Mit dem Blute dieses Tieres wurden die Mäuse Nr. 26 bis 30 (4. Passage) infiziert. Wiederum kamen in sämtlichen Tieren beide Trypanosomenarten zur Beobachtung. Am 9. Tage nach der Infektion wurde von Maus Nr. 30 bei dem Parasitenbefund (b) und c auf die Mäuse Nr. 31 bis 35 (5. Passage) abgeimpft. Es ergab sich das gleiche Bild wie vorher: wiederum traten beide Arten bei sämtlichen Tieren in unter sich wechselnder Zahl auf. Nun wurde von zweien dieser Mäuse je eine Passage angelegt. Von Maus Nr. 31 wurden am 11. Tage nach der Infektion, während sich infolge der Remission von b nur c in den Blutaussstrichen vorfand, die Mäuse Nr. 36 bis 40 (Passage 6a) und am selben Tage von Maus Nr. 33 bei einem Parasitenbefund von (b) und c die Mäuse Nr. 41 bis 45 (Passage 6b) infiziert. Maus Nr. 43 ging bereits am 6. Tage nach der Infektion ein, am Tage vorher hatte sich nur Trypanosoma congolense nachweisen lassen. Bei den neun übrigen Tieren dieser Passage (6a und 6b) waren beide Trypanosomenarten im Blute zu finden, indem je nach der obwaltenden Remissionsperiode bald b, bald c in der Überhand war.

Schließlich wurde eine 7. Passage von einer dieser Mäuse (Nr. 37) angelegt (Maus Nr. 46 bis 50), und zwar geschah das zu einer Zeit, wo b remittierte und seit 2 Tagen ausschließlich c im Blute gefunden wurde. In der neuen Passage erschien c zwar überall zuerst, aber b folgte in wenigen Tagen nach, und beide Trypanosomenarten bestanden von da ab nebeneinander.

Der ganze Versuch zog sich fast über ein Vierteljahr hin. — Sehen wir zunächst von dem Stamm Maus 2 ab, so zeigt der Verlauf, den der Versuch bei den sieben Passagen des Stammes Maus V nahm, daß die beiden Trypanosomenarten, mit denen die Stammmaus infiziert wurde, lange Zeit von Passage zu Passage weiter gegeben werden können, ohne daß eine von ihnen unterdrückt oder überwuchert würde. Vielleicht darf der Schluß, der aus dem vorliegenden Ergebnisse zu ziehen ist, noch erweitert werden. Die Überimpfung wurde nämlich mehrere Male gerade

in dem Augenblick vorgenommen, wo die eine der beiden Trypanosomenarten sich sehr erheblich in der Überzahl befand, so daß die Bedingungen für das Aufkommen der anderen ungünstig waren. Der Umstand aber, daß die bei der Überimpfung benachteiligte Form trotzdem ausnahmslos in kurzer Zeit den Vorsprung wieder einholte, den die begünstigte Art gewonnen hatte, spricht dafür, daß hier eine Entmischung auch bei noch so langer Fortsetzung der Passagen durch Überwucherung überhaupt nicht zustande kommen kann. Durch die Remissionsperioden, denen chronische Trypanosomenstämme unterliegen, wird offenbar eine schrankenlose Vermehrung der einen oder der anderen Mischungskomponente unmöglich gemacht. Hierbei ist noch zu bedenken, daß periodische Schwankungen auch dann vorhanden sein werden, wenn die grobe Methode, nach der die Stärke der Infektion geschätzt wird, dies nicht mehr nachzuweisen vermag; so zeigt sich in dem Beispiel, das die Tabelle 5 wiedergibt, daß am 22. und am 24. Tage kleinere Schwankungen stattgefunden haben; solche können schon leicht übersehen werden, wenn sie um ein Geringes weniger ausgeprägt hervortreten, als es hier der Fall ist. Auf diese Weise werden die beiden Mischungskomponenten miteinander im Gleichgewicht gehalten: sinkt b, so steigt c, bis dieses remittieren muß und dadurch b wieder hochkommt.

Tabelle Nr. 6.

Verlauf der Mischinfektion mit Stamm 63 und Stamm b in 7 Passagen.

Maus Nr. 5 (Passage 1) wurde mit Stamm 63 und Stamm b infiziert.

Maus Nr.	11—15	21—25	26—30	31—35	36—40	41—45	45—50
Infiziert aus Maus Nr.	5	11	21	30	31	33	37
Trypanosomenbestand der infizierenden Maus	b + c	b + (c)	b + c	(b) + c	c	(b) + c	c
Trypanosomenbefund bei der infizierten Maus	b + c	b + c	b + c	b + c	b + c	b + b	b + c
Passage	2	3	4	5	6a	6b	7

Trotzdem nun Mischinfektionen mit solchen Trypanosomenstämmen wie sie in Stamm 63 und Stamm b vorliegen, wohl durch beliebig viel Passagen fortbestehen können, ohne daß jemals eine Entmischung stattfindet, kann es doch unter Umständen zur Ausschaltung der einen Komponente kommen. Die Passage 2 des Stammes Maus 2 beweist das (vgl. S. 520f.). Daß bei Maus Nr. 20 nur *Trypanosoma congolense* festgestellt wurde, beruht vielleicht auf dem Zufall, daß das Tier schon am 4. Tage nach dem

Auftreten der Parasiten einging. Bei Maus Nr. 16 und 18 liegen aber die Verhältnisse anders; denn bei ihnen nahm die Infektion, was ihre Dauer anlangt, einen durchaus normalen Verlauf. Hier muß damit gerechnet werden, daß in der Tat die *c*-Komponente ausgemerzt worden ist. Es hätte vielleicht durch Übertragung auf eine weitere Passage die Sicherheit dieses Urteils noch verstärkt werden sollen; aber das, was die Passagen des Stammes Maus 5 lehrten, ließ sich zu Anfang der Versuche noch nicht überblicken, so daß kein Grund zu der Annahme zwang, es liege hier ein von der Regel abweichendes Geschehen vor. Wie dem auch sei, es fragt sich, ob für das ausnahmsweise Verhalten der Trypanosomen in den Mäusen Nr. 16 und 18 eine Erklärung zu finden ist. Eine solche läßt sich aus dem Umstande ableiten, daß der Stamm *b* in Mäusen, besonders bei schwacher Infektion, in manchen Fällen schwer oder selbst gar nicht angeht. So ist es mehrere Male vorgekommen, daß in Passagemäusen erst 8 Tage nach der Infektion Trypanosomen nachzuweisen waren, und zweimal blieb die Infektion überhaupt aus. Hier spielen wohl individuelle Faktoren des Mäuseorganismus eine Rolle, indem bei einzelnen Tieren die Abwehrkräfte stark genug sind, um die eingedrungenen Parasiten zu vernichten. Der Mechanismus der Unterdrückung der einen Mischungskomponente wäre hier so zu verstehen, daß beide Komponenten zwar übertragen werden, die eine aber in der Maus vernichtet wird. So interessant daher der hier mitgeteilte Befund ist, so darf er doch wohl nur als Ausnahme gewertet werden. Die Regel muß aus dem Verlauf abgeleitet werden, den die Mischinfektion in den von Maus Nr. 5 abstammenden Passagen nahm. Nach ihr wird eine Mischinfektion mit chronisch krank machenden und annähernd gleich virulenten Trypanosomenstämmen durch die Fortzüchtung in Passagen nicht beseitigt, sondern kann beliebig lange bestehen bleiben.

Es fragt sich nun, ob dieser Befund, der zu dem bei Mischinfektionen mit akuten Naganastämmen erhobenen in bemerkenswertem Gegensatz steht, praktisch von Bedeutung sein könnte. Daß Mischinfektionen aus verschiedenen Trypanosomenarten in der Natur vorkommen, ist nicht von der Hand zu weisen. Yorke und Blacklock (1911) berichten von einem Pferde, das mit *Trypanosoma vivax* und *Trypanosoma dimorphon* natürlich infiziert war. Braun und Teichmann (1914 S. 21f.) haben eine Mischinfektion mit *Trypanosoma Brucei* und *Trypanosoma congolense* erhalten, als sie Glossinen aus der Umgebung von Amani, die in der Regel nur *Trypanosoma congolense* übertragen, an mit Nagana infizierten Ratten fütterten und diese Fliegen dann zu Übertragungsversuchen verwendeten. Selbst wenn solche Fälle nur ausnahmsweise eintreten, so

ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß Mischinfektionen mit chronischen Stämmen derselben Art nicht selten sind. Solche werden sich aber wohl in derselben Weise verhalten, wie es der hier beschriebene Versuch gezeigt hat. Handelt es sich nun um Mischinfektionen mit verschiedenen Arten von Trypanosomen oder um solche mit verschiedenen Stämmen derselben Art, so ist damit ein Umstand gegeben, der für die Therapie der Trypanosomenkrankheiten nicht ohne Bedeutung ist. Wie bekannt, zeigen die Trypanosomen verschiedener Spezies gegen dasselbe Arzneimittel ein sehr verschiedenes Verhalten (Laveran und Mesnil S. 199f.), und daß das auch in gewissem Umfange für verschiedene Stämme derselben Trypanosomenart zutrifft, haben Versuche erwiesen, deren Ergebnisse an anderer Stelle veröffentlicht werden sollen.

Die beschriebenen Versuche ergeben kurz zusammengefaßt folgendes:

1. Bei Mischinfektionen mit zwei gleich virulenten akuten Naganastämmen entmischen sich im Laufe weniger Passagen durch Mäuse die beiden Komponenten.

2. Die Entmischung kann durch Unterdrückung der einen oder der anderen Komponente erfolgen.

3. Empfindlichkeitsunterschiede der Komponenten gegen Arsazetin üben auf die Richtung, in der die Entmischung vor sich geht, keinen bestimmenden Einfluß.

4. Die Entmischung zweier gleich virulenter akuter Naganastämme wird auch dann nicht hintangehalten, wenn das Herzblut der mischinfizierten Mäuse zur Überimpfung verwendet wird.

5. Bei Mischinfektion mit bei Mäusen chronischen Krankheitsverlauf erzeugenden Trypanosomenstämmen (*Trypanosoma Brucei* und *Trypanosoma congolense*) tritt infolge der dabei stattfindenden Remissionen eine Entmischung der Komponenten nicht ein.

6. Ausnahmsweise kann eine Entmischung stattfinden, wenn die eine der beiden Komponenten bei der Überimpfung zwar weiter übertragen wird, aber nicht angeht.

Literaturverzeichnis.

Blacklock, B., The trypanosomes found in a horse naturally infected in the Gambia. A double infection. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1912. Vol. VI. p. 107—116.

Braun, Hugo und Ernst Teichmann, *Versuche zur Immunisierung gegen Trypanosomen*. Jena 1912, Gustav Fischer.

Braun, H. und E. Teichmann, Erfahrungen über die tierischen Trypanosomenkrankheiten Deutsch Ostafrikas. *Beihefte zum Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene*. 1914. Bd. XVIII. Beiheft 1.

Laveran, A. und F. Mesnil, *Trypanosomes et Trypanosomiasés*. II. Aufl. Paris 1912. Masson et Cie.

Laveran, A. und D. Roudsky, Resultats obtenus en mélangeant un virus à trypanosomes acentrosomiques avec un virus normal de même espèce. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1912. Tome LXXII. p. 313 et 314.

Oehler, R., Untersuchungen über den Dimorphismus von *Trypanosoma Brucei*. *Diese Zeitschrift*. 1914. Bd. LXXVII. S. 356 bis 370.

Yorke, W. und B. Blacklock, The trypanosomes found in two horses naturally infected in the Gambia. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1911. Vol. V. p. 413.

Die Mittel, aus denen die Kosten dieser Untersuchungen bestritten wurden, sind teils von dem Kaiserlichen Kolonialamt, teils von Herrn Dr. F. Roeßler in Frankfurt a. M. zur Verfügung gestellt worden. Beiden Gebern sei an dieser Stelle gedankt.