

Aus dem Pathologischen Museum der Charité in Berlin.  
(Leiter: Geheimrat Orth.)

## Ueber die künstliche Weiterentwicklung (in vitro) des Tertian-Malariaparasiten.

Von Prof. H. Ziemann in Charlottenburg.

Die früheren Versuche der Malariaforscher, die Malaria-parasiten im Blut künstlich weiter zu kultivieren, sind stets negativ verlaufen. Ich selber habe Malariaparasiten früher in Blutegeln, die ich Malariapatienten angesetzt hatte, zu konservieren versucht, den Kern färberisch nach meiner Romanowsky-Methode auch tagelang noch weiter nachweisen, eine Vermehrung aber nicht erzielen können.<sup>1)</sup> Da veröffentlichten Bass und Johns, Oktober 1912<sup>2)</sup>, die Technik der erfolgreichen Kultivierung des Tertian- und Perniciosaparasiten.

Die springenden Punkte der betreffenden Technik sind, abgesehen von selbstverständlich strengster Asepsis, 1. Beimengung von Dextrose in bestimmter Menge zu dem Malariablut, 2. möglicher Schutz der malariainfizierten roten Blutkörperchen gegen die Einwirkung der Luft, 3. Aufbewahren der Kulturröhrchen bei 40° im Brutschrank, 4. Entfernung der Leukozyten aus dem Malariablut bei Anlegen von Tochterkulturen, indem man durch nicht zu starkes und nicht zu lange fortgesetztes Zentrifugieren die weißen Blutkörperchen aus der Tiefe allmählich in die Höhe treibt, worauf man sie abpipettieren kann. Die Parasiten können dann in den roten Blutkörperchen unter der schützenden, darüber stehenden, mindestens 2,5 cm hohen Serumschicht wiederum sporulieren.

Die mir von Bass am 25. September 1912 zur Begutachtung übersandten Präparate von künstlich weitergezüchteten Perniciosaparasiten gaben mir schon damals die Ueberzeugung, daß er in der Tat das hochwichtige und interessante Problem gelöst hatte. Es fanden sich speziell in dem Präparat von einer 60 Stunden alten Perniciosakultur überalterte Formen, die im peripherischen Blute niemals beobachtet werden. Bekanntlich beträgt ja die natürliche Entwicklungsdauer des Perniciosaparasiten in maximo auch nur 48 Stunden.

Außerdem konnte man in den 30—40 Stunden alten Kulturpräparaten die ganze Entwicklung des Perniciosaparasiten verfolgen, was im peripherischen Blute bekanntlich nicht oder selten möglich ist. Ueber meine an Hand der übersandten Präparate gemachten Wahrnehmungen (cfr.<sup>3)</sup>)

Meine sofort eingeleiteten Bemühungen, Fälle von Perniciosa mit reichlichem Parasitenbefunde behufs Nachprüfung zu bekommen, waren leider gerade in dieser Zeit negativ. Fast alle meine Patienten hatten vorher Chinin genommen, sodaß der Parasitenbefund derselben 0 bzw. nur festzustellen war bei Anwendung der sogenannten Methode des dicken Tropfens. Die Kulturversuche in einem solchen Falle mit äußerst spärlichem Parasitenbefund verliefen negativ.

Da stellte ich am 15. Januar, 7 pm bei einem ambulant behandelten Patienten G., (zur Jagd in Ostafrika gewesen) ein Tertianarezidiv fest. In den Präparaten einige spärliche geschlechtliche und ungeschlechtliche Parasiten von meist  $\frac{2}{3}$  bis  $\frac{3}{4}$  Größe eines roten Blutkörperchens und darüber. Schon in der Nacht zum 16. Januar starker Fieberanfall. Akme 2 Uhr nachts. Am 16. Januar. 9½ Uhr noch Schweißausbruch, Temperatur 37,7. Im peripherischen Blute jetzt schon endoglobuläre, noch ringförmige Parasiten. Einige geschlechtliche, endoglobuläre größere Formen mit lebhaft beweglichem Pigment, wenige pigmenthaltige Leukozyten. Blutentnahme behufs Kultur. Hierauf aufrechtes Einstellen in den Brutschrank bei 39,5°. Bei dem Patienten war die Temperatur nie über 39,5 hinausgegangen. Die Entnahme des Blutes und der Transport per Auto bis zum Laboratorium dauerte etwa 40 Minuten. Medikation: Chininum tannicum, 2 mal täglich 0,5. Am Rest des 16. Januar weiter Wohlbefinden, Apyrexie. Die Parasiten, entnommen aus der Schicht dicht unter der Oberfläche der Blutkörperchen-Sedimentschicht, waren am 16. Januar 3 pm in den Kulturen etwas gewachsen, noch mehr um 6 Uhr nachmittags. Am 17. Januar. 10 Uhr morgens Parasitenbefund in den Kulturen negativ, starkes Bakterienwachstum. Dieser Versuch konnte daher nicht als beweisend gelten. Am 17. Januar vormittags 10 am T. 36. Im Blute des Patienten einige halb, meist zu Zweidrittel erwachsene Parasiten und einige, scheinbar durch das am 16. Januar gegebene Chinin schon beeinflusste Formen. 6 Uhr nachmittags Temperatur 37,2. 1g Chin. hydrochlor. auf einmal. Vorher Punktion einer Vene. Sterile Entnahme von etwa 80 cem Blut für Kultur-

versuche, da in der Nacht bzw. gegen Morgen noch Fieberanfall zu erwarten war. In dem peripherischen Blute  $\frac{3}{4}$  bis erwachsene Parasiten.<sup>1)</sup> Chromatinteilung erst im allerersten Stadium. Befund also fast genau wie am 15. Januar 7 Uhr nachmittags, zwei Tage vorher. In der Nacht Fieberanfall. Ein Teil des entnommenen defibrinierten Blutes wurde zur Kontrolle ohne Dextrosezusatz gelassen. Es sei vorweg bemerkt, daß es bei sonst gleicher Technik in diesem Blute nicht zur Sporulation der Parasiten kam. Der Rest des Blutes wurde mit 50 % iger Dextrose versetzt, und zwar zum Teil 8, 10, 12 cem Blut mit je  $\frac{1}{10}$  cem 50 % iger Dextroslösung. Das Verhältnis von  $\frac{1}{10}$  cem 50 % iger Dextroslösung: 8 cem Blut schien mir später die günstigste zu sein (nach Bass 1 : 10). Zeitdauer von Entnahme des Blutes bis zum Einstellen in den Brutschrank 39,5° C etwa 40 Minuten. Dort, wo das Serum nicht eine mindestens 2,5 cm hohe Flüssigkeitssäule abgab, fügte ich bei 45° C eine Stunde inaktiviertes steriles Ascites-Serum zu. Es sei gleich bemerkt, daß gegenüber dem Blutserum kein Unterschied zu konstatieren war. In allen Röhrchen ging während der Nacht die Sporulation der Parasiten vor sich. Leider konnte wegen Schluß des Museums während der Nacht die Entwicklung nicht häufiger kontrolliert werden.

Am 18. Januar, 10 Uhr morgens, zu einer Zeit, als Patient im Schweißstadium noch 38,6° zeigt, in der dicht unter der Oberfläche der Blutkörperchensedimentschicht befindlichen Kulturlage a) einige Formen mit 8—10 Kernen (Nachzügler in der Sporulation), b) eine mäßige Anzahl junger endoglobulärer ringförmiger Parasiten, einige ev. durch Chinin beeinflusst (die von ihnen infizierten roten Blutkörper mit deutlicher Schüffner-Tüpfelung), c) eine große Menge ausgebildeter Sporulationskörper, die nur im gefärbten Präparat als abgestorben zu bezeichnen waren, indem das Chromatin der Merozoiten staubförmige Auflösung zeigte und das Plasma keine Färbung mehr annahm, d) eine große Menge pigmenthaltiger Leukozyten, wie man sie im peripherischen Tertiana-Blut niemals in solcher Menge sieht. Die Phagozytose zeigte sich bei allen Leukozyten, nicht nur bei den großen einkernigen. Der Befund ad a—b und d entsprach in der Kultur also ganz dem im Fieberabfall im peripherischen Blute üblichen.

Am 18. Januar 4 Uhr pm. in der Kultur reife, lebende Sporulationsformen verschwunden, einige größere endoglobuläre junge Tertianaparasiten, sehr wenige männliche halb und ganz erwachsene, geschlechtliche (!) Parasiten mit lebhaft beweglichem Pigment. Da die Leukozyten garnicht entfernt waren, mußte die Mehrzahl der freigewordenen Merozoiten phagozytiert werden. Sonst Befund wie am 18. Januar. Patient fieberfrei. Von jetzt an drei Tage 4 mal täglich 0,5 Chinin. tannic. Parasiten im Patienten nicht mehr nachweisbar. 19. Januar. 10 Uhr morgens, in der Kultur jüngste endoglobuläre ungeschlechtliche Parasiten. Nach langem Suchen noch ein erwachsener Parasit und zwei geschlechtliche mit beweglichem Pigment. Sehr viel pigmenthaltige Leukozyten. Im peripherischen Blute des Patienten nur noch Mononukleose. Am 20. Januar 1 pm. in Kultur 1 Eyp. männlich und weiblich. Größerer Parasit. Pigmenthaltige Leukozyten.

Es hatte also, wenn man den Befund des peripherischen Blutes am 17. Januar 6 Uhr nachmittags mit dem der Kultur vom 18. Januar 10 Uhr vormittags, 4 Uhr nachmittags etc. vergleicht, eine unzweifelhafte Weiterentwicklung stattgefunden. Charakteristischerweise hatten die geschlechtlichen, als besonders resistent schon früher bekannten Formen sich länger behauptet als die ungeschlechtlichen.

Der Grund dafür, daß stärkere Weiterentwicklung noch nicht in mehrfacher Generation gelang, wird gelegen haben in der vorhergegangenen Chinisierung des Patienten, der relativ langen Abkühlung des Malariablutes während des Transportes und darin, daß zur Zeit des Versuchs für die Kultivierung mehrfacher Generationen nur Blut, das bereits 24 Stunden im Kühlschrank gestanden, zur Verfügung war. Außerdem macht Bass selbst auf die Schwierigkeit der Kultur gerade des Tertianparasiten aufmerksam. Die Dextrose, deren Bedeutung bei der Kultur Bass im Unklaren läßt, hat meines Erachtens auch die Aufgabe, rein mechanisch die Oberfläche der roten Blutkörper klebriger zu machen, sodaß die Merozoiten leichter festkleben und in die roten Blutkörperchen eindringen können. Ueber die große Bedeutung der Bassschen Entdeckung mehr in der ausführlichen Mitteilung. Herrn Geheimrat Orth sage ich für die Ueberlassung eines Laboratoriumsraumes herzlichen Dank.

<sup>1)</sup> Junge, ringförmige Parasiten waren nirgends zu sehen, wohl aber 16 h später im Kulturlut.

<sup>1)</sup> Ueber Malaria und andere Blutparasiten nebst Anhang. Eine wirksame Methode der Chromatin- und Blutfärbung. 1898. — <sup>2)</sup> Journal of experiment. Med. Oct. 1912. — <sup>3)</sup> Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. 67, H. 6.