

[Aus dem Hygienischen Institut der Kgl. Tierärztl. Hochschule zu Berlin.]
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. P. Frosch.)
(Abteilungsvorsteher: Dr. P. Knuth.)

Gehen die bei Rindern kulturell nachweisbaren Flagellaten aus Trypanosomen hervor?

Von

Paul Behn,
Studiorendem der Militär-Veterinär-Akademie.

(Hierzu Taf. VII u. VIII.)

1. Einleitung.

Die Tatsache, daß auch in Europa bei Rindern Trypanosomen spontan vorkommen, ist noch nicht lange bekannt. Der erste Fall dieser Art wurde als gelegentlicher Befund von Weber (1) beschrieben. Weber fand im August 1900 Trypanosomen in Blutausstrichen einer finnländischen Kuh, die an Piroplasmose gelitten hatte und 2 Tage nach der Untersuchung daran zugrunde gegangen war. Genaueres über diesen Befund Webers führt Schaudinn (2) an, dem Weber folgende Mitteilungen darüber machte:

„Es gelang mir, in dem Blute dieser Kuh neben typischen Texasfieberparasiten Parasiten von Trypanosomenform zu finden, wie sie bisher noch nicht bei Texasfieber beobachtet wurden und die auch bedeutend kleiner als die bei der Surrakrankheit beschriebenen Trypanosomen sind. Die weitere Untersuchung muß lehren, ob es sich um eine besondere Entwicklungsform des Texasfieberparasiten handelt oder um eine zufällige Infektion mit einem Parasiten anderer Art.“

Ein weiterer durch die Begleitumstände besonders interessanter Trypanosomenbefund wurde dann nach langer Zwischenzeit im Juli 1908 von Frank (3) erhoben, der in Material von einem in Stein-Wingert,

Kreis Ober-Westerwald, unter Milz- und Rauschbrandsymptomen verendeten Ochsen sehr viele Trypanosomen fand, ohne Milzbrand- oder Rauschbrandbazillen nachweisen zu können. Frank und Frosch (4) waren der Ansicht, das der Tod des betreffenden Ochsen durch die Trypanosomen verursacht worden sei. Frosch (5) schlug für das von Frank gefundene Trypanosoma, daß er auf Grund ätiologischer Ermittlungen als neue Art hinstellte, den Namen Trypanosoma Frank vor. Die genaueren morphologischen und vergleichenden Studien wurden dann von Knuth (6) ausgeführt, der feststellte, daß dies Trypanosoma wegen des spitz zulaufenden Hinterendes mit anderen bei Rindern gefundenen Trypanosomen z. B. Trypanosoma theileri, himalayanum, indicum, muktasari und scheini in eine Linie zu stellen sei und speziell mit dem Trypanosoma theileri die größte Ähnlichkeit habe.

Auch noch an zwei anderen Orten wurden später Rindertrypanosomen gefunden und zwar beide Male bei der Blutuntersuchung nach Impfung mit piroplasmenhaltigem Blute. Hiervon wurde der eine Fall in England und der andere in Deutschland beobachtet:

Am 22. IV. 1910 impfte Stockman (7) in London zu Immunsierungszwecken gegen Piroplasmose 10 Rinder mit Blut einer Kuh, die spontan an Piroplasmose erkrankt war. Bei 6 Rindern traten in der Blutbahn neben Piroplasmen Trypanosomen auf, die sich in einem Falle am 9. Tage nach der Impfung zeigten und 8 Tage lang nachweisbar waren, in den anderen 5 Fällen am 16. Tage zuerst beobachtet wurden und nach 1 bzw. 2 Tagen wieder verschwanden.

Stockman betont die Ähnlichkeit dieser Trypanosomen mit dem Trypanosoma theileri.

Schmitt (8) in Stettin fand ferner Trypanosomen bei einer Kuh, die am 13. VI. 1910 subkutan und intraperitoneal mit einem Blutgemisch geimpft worden war, das von einer an Piroplasmose erkrankten Kuh und einem hiergegen schon immunen Bullen stammte. Die Trypanosomen, die auch in diesem Falle Ähnlichkeit mit dem Trypanosoma theileri aufwiesen, traten am 15. Tage nach der Impfung auf und waren 10 Tage hindurch sichtbar. Es gelang Schmitt nicht, die Bluttrypanosomen auf ein anderes Rind zu übertragen und in Agar und Bouillon zu züchten.

Nach dem mit tödlichem Ausgange verlaufenen Fall von Trypanosomiasis, den Frank 1908 beobachtet hatte, wurden von Knuth und Rauchbaa (9) im Kreise Ober-Westerwald, wo der mit Trypanosomen behaftete Ochse verendet war, Blutuntersuchungen auf Rindertrypanosomen vorgenommen, um eventuell die Ausbreitung dieser Blutparasiten festzustellen und außerdem Material zur eingehenden Untersuchung des

Trypanosoma franki zu gewinnen. Die Blutuntersuchungen blieben jedoch trotz zahlreichen Materials ohne den gewünschten Erfolg.

Im Sommer 1910 brachten dann Knuth und Rauchbaar zum ersten Male in Europa eine Kulturmethode zur Anwendung, durch welche Miyajima, Martini und Crawley Flagellaten hatten nachweisen können.

Im Jahre 1907 hatte Miyajima (10) bei dem Versuch, das *Piroplasma parvum* in Blutbouillon zu züchten, in mehrtägigen Kulturen viele Flagellaten gefunden, die sich lebhaft bewegten. Er war der Meinung, daß diese Flagellaten aus den Piroplasmen hervorgegangen seien. Die Untersuchungen von Martini (11) und Crawley (12), der die in Blutbouillonkulturen bei Rindern auftretenden Flagellaten mit dem Namen *Trypanosoma americanum* belegte, zeigten jedoch, daß das Auftreten von Kulturflagellaten — diese Bezeichnung soll im folgenden für die in den Kulturen nachweisbaren Flagellaten gewählt werden — nicht an das Vorhandensein von Piroplasmen gebunden ist, sondern daß es sich wahrscheinlich um einen bisher unbekannten Infektionserreger handelt, der aber weder von Martini noch von Crawley im Blute selbst aufgefunden werden konnte. Der Gedanke lag nahe, daß ein *Trypanosoma* in Betracht käme, welches ähnlich wie das *Trypanosoma lewisi* imstande sei, sich in Kulturen stark zu vermehren und nur wegen seiner Seltenheit bislang in Blutpräparaten nicht gefunden worden war.

Diesem Gedanken folgend, legten Knuth, Rauchbaar und Morgenstern (13) im Juni 1910 Bouillonkulturen aus dem Blute von 25 Rindern aus dem Kreise Ober-Westerwald an und konnten nach einigen Tagen feststellen, daß in den Blutbouillonkulturen von 7 Rindern wirklich Flagellaten vorhanden waren und zwar anscheinend von derselben Art, wie sie Miyajima, Martini und Crawley beschrieben hatten. In Blutausstrichen von den 7 Kühen wurden keine Trypanosomen oder andere Gebilde gefunden, die mit den Kulturflagellaten im Zusammenhang stehen konnten.

Die Frage, ob als Ursache der Kulturflagellaten ein *Trypanosoma*, vielleicht das *Trypanosoma franki*, in Betracht käme, trat jetzt in den Vordergrund.

Durch das eingehende Studium der jungen Kulturformen, durch Blutuntersuchungen und Versuche, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zusammengestellt sind, habe ich versucht, zur Lösung dieser Frage einen Beitrag zu liefern.

Vorliegende Arbeit wurde in der Tropenabteilung des Hygienischen Instituts der Tierärztlichen Hochschule zu Berlin unter der Leitung des Hrn. Abteilungsvorstehers Dr. Knuth angefertigt.

2. Technik und Untersuchungsmethoden.

Herstellung der Blutbouillonkulturen.

Das Blut für die Blutbouillonkulturen wurde den Rindern aus der Vena jugularis folgendermaßen entnommen: Nach Desinfektion der Jugularisgegend mit Alkohol wird die Halsvene durch einen um die untere Halsgegend gelegten und fest angezogenen Strick so zum Schwellen gebracht, daß sie deutlich zu fühlen ist. Nun sticht man mit der sterilen Hohnadel auf der Vene zunächst durch die Haut und dann mit kurzem Ruck in die mit zwei Fingern fixierte Halsvene. Das im Strahl ausfließende Blut wird in einer kleinen Glasflasche, die 100 bis 150 ^{cem} faßt und einige raue Glasperlen enthält, aufgefangen. Die sterilen Blutflaschen sind mit Wattepfropfen versehen. Sie werden so lange geschüttelt, bis weißlichgelbe Flocken die Gerinnung des Fibrins anzeigen, was nach 5 bis 10 Minuten zu geschehen pflegt. Die leicht alkalische Bouillon von der allgemein üblichen Zusammensetzung befindet sich in Reagensröhrchen von ungefähr 1.5 ^{cm} Durchmesser. Die Röhrchen sind mit Wattepfropfen versehen und enthalten 7 bis 10 ^{cem} Bouillon.

Das Auffüllen von Blut auf die Bouillonröhrchen wird am besten von zwei Personen besorgt, von denen die eine das Öffnen und Verschließen der Bouillonröhrchen vornimmt, während die andere in jedes Röhrchen ungefähr 2 bis 4 ^{cem} Blut gießt. Selbstverständlich muß bei der Herstellung der Kulturen steril gearbeitet werden.

Art der Färbung und Untersuchung.

Zur Färbung von Ausstrichen wurde fast ausschließlich die neue Giemsa-Lösung verwendet. Von dieser nahm ich gewöhnlich 2 Tropfen auf 3 ^{cem} destillierten Wassers. Die lufttrockenen Präparate wurden nach 3- bis 4 stündiger Fixation in 96 prozent. Alkohol 1½ bis 2 Stunden in die angegebene Farblösung gelegt und dann mit spritzendem Wasserstrahl von Farbniederschlägen befreit. Auf diese Weise wurde eine vorzügliche Färbung vor allem der Bluttrypanosomen erzielt; allerdings haben die später zu besprechenden großen breiten Trypanosomenformen durch die Trockenfixation zum Teil etwas gelitten.

Wenn es sich darum handelte, spärliche Bluttrypanosomen nachzuweisen, wurden gefärbte „dicke Tropfen“ hergestellt. Dies Verfahren besteht bekanntlich darin, daß man die als Tropfen in dicker Schicht angefertigten und lufttrocken gewordenen Präparate ohne vorherige Fixation sofort in Giemsa-Lösung färbt. Von mir wurden hierzu 2 Tropfen Giemsa-Lösung auf 1 ^{cem} destillierten Wassers genommen. Diese Lösung

ließ ich 7 bis 10 Minuten auf das Präparat einwirken; dann wurde dasselbe leicht in Wasser abgespült. Das Abtrocknen des Präparates mit Fließpapier empfiehlt sich nicht, weil der gefärbte Tropfen fast immer dadurch beschädigt wird. Allerdings gehört einige Übung dazu, die Trypanosomen in diesen Präparaten trotz des veränderten Aussehens zu erkennen. An den so gefärbten Trypanosomen sind meist Randfaden und Geißel nicht zu erkennen. Man sieht nur den schwach blau gefärbten Plasmaleib und in diesem die dunkelrot gefärbten Kerne. An den beiden ungleich großen Kernen im schmalen blauen, meist sichelförmigen Protoplasma erkennt man die Trypanosomen mit Sicherheit.

Die angetrockneten dicken Tropfen kann man auch zunächst einige Zeit in Wasser stellen, bis die rotbraune Farbe einer durchsichtig weißen gewichen ist, dann in Alkohol fixieren und mit Giemsa-Lösung färben. Hierbei erhält man oft gute Bilder.

Zum Auffinden spärlicher Trypanosomen in gefärbten Ausstrichen bedient man sich am besten des Trockensystems des Mikroskops, und zwar vor allem der DD-Linse des Zeiss'schen Mikroskops. Wegen ihrer Größe konnten die Trypanosomen jedoch auch mit der AA-Linse unter gleichzeitiger Verwendung des Kompensationsokulars 12 aufgefunden werden, was vor allem das Wiederauffinden von Trypanosomen sehr erleichterte.

3. Versuche über die Dauer der Infektion und den eventuellen Überträger.

Über die Verbreitung der in Rinderblutbouillonkulturen auftretenden Flagellaten wurden schon von Knuth und Rauchbaar (14) eingehendere Untersuchungen angestellt. Knuth und Rauchbaar konnten in einem Falle bei 10 von 17 untersuchten Rindern in angelegten Kulturen Kulturflagellaten nachweisen, bei einer weiteren Prüfung von 31 ausgewachsenen Rindern zeigten sich 67.7 Prozent infiziert, von den Jung-rindern 14.6 Prozent. Bei fünf untersuchten Kälbern konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Seither ist auch in anderen Ländern Europas das Auftreten von Kulturflagellaten in Blutbouillonkulturen, die mit Rinderblut beschickt waren, beobachtet worden. Die allgemeine Verbreitung des Blutparasiten, der sich in Blutbouillonkulturen zu Flagellaten entwickelt, ist somit erwiesen.

Versuch I.

Bei den Untersuchungen, die in der Abteilung für Tropenhygiene bezüglich des Prozentsatzes von Rindern, bei denen sich Kulturflagellaten nachweisen ließen, angestellt wurden, kamen, wie oben erwähnt, auch

5 Kälber zur Untersuchung, die von Knuth und Rauchbaar als negativ befunden wurden. Bei dem hohen Prozentsatz von Infektionen bei ausgewachsenen Rindern war dieser Befund auffällig. Deshalb habe ich zur Klärung der Frage, ob bei Kälbern nur selten oder nie Kulturflagellaten beobachtet werden können, 18 Kälber im Alter von 10 Tagen bis 10 Monaten der Prüfung auf Kulturflagellaten mittels der Blutbouillonmethode unterzogen. Bei keinem dieser Kälber, die alle während der Sommermonate untersucht wurden, konnte ich Kulturflagellaten nachweisen.

Bei Kälbern scheinen demnach Spontaninfektionen mit Kulturflagellaten gar nicht oder sehr selten vorzukommen.

Versuch II.

Rind 10, eins von den sieben Rindern, bei denen Knuth, Rauchbaar und Morgenstern am 25. Juni 1910 Kulturflagellaten nachgewiesen hatten, wurde, um die Dauer der Infektion festzustellen und außerdem Material zur morphologischen Untersuchung der Kulturflagellaten zu gewinnen, häufig der Prüfung mittels der Blutbouillonmethode unterzogen.

In der folgenden Zusammenstellung sind selbstverständlich nur diejenigen Kulturröhrchen in Rechnung gesetzt worden, die keine Verunreinigung aufwiesen. Erfahrungsgemäß zeigen nämlich die von vornherein mit Bakterien oder Pilzkeimen infizierten Röhrchen fast nie Kulturflagellaten; spätere Verunreinigungen haben dagegen oft nur wenig Einfluß auf das Wachstum derselben.

Bei Rind 10 waren:

am	8. August	von	8 Kulturröhrchen	8 positiv
„	9.	„	4	4 „
„	13.	„	12	9 „
„	22.	„	3	— „
„	30.	„	3	1 „
„	31.	„	12	— „
„	1. Septbr.	„	6	— „
„	2.	„	6	1 „
„	3.	„	5	— „
„	4.	„	6	— „
„	5.	„	6	— „

Alle übrigen Kulturen, die am 6., 7., 8., 9., 11., 13., 19., 21., 22., 25., 28. September und am 1., 4., 20., 28., 29. Oktober angelegt wurden, blieben negativ. Auch während der Wintermonate konnten trotz häufiger

Kulturanlage keine Kulturflagellaten nachgewiesen werden. Im Februar 1911 wurde Rind 10 dann zu Versuchen mit Naganatrypanosomen verwendet. Am 7. Mai konnten bei Rind 10 wieder Kulturflagellaten nachgewiesen werden. Es bestand zu dieser Zeit bei Rind 10 eine Mischinfektion zwischen Naganatrypanosomen und den Ausgangsformen der Kulturflagellaten. Drei mit Blut von Rind 10 geimpfte Mäuse gingen nämlich an Nagana zugrunde.

Am 7. Mai zeigten 6 von 10 Blutbouillonröhrchen Kulturflagellaten. Am 22. Mai waren alle 12 angelegten Blutbouillonröhrchen positiv.

Es ließen sich also bei Rind 10 während des Sommers 1910 Kulturflagellaten nachweisen. Nachdem zuerst immer fast alle angelegten Blutbouillonröhrchen Kulturflagellaten gezeigt hatten, nahm die Zahl der positiven Röhrchen dann im August immer mehr ab, bis vom 2. September ab bis zum 7. Mai des nächsten Jahres in den Blutbouillonkulturen von Rind 10 keine Kulturflagellaten mehr gefunden werden konnten. Vom 7. Mai ab gelang wieder der Nachweis von Kulturflagellaten.

Das allmähliche Verschwinden der Kulturflagellaten bei Rind 10 gab Anlaß zu ausgedehnteren Untersuchungen, die zunächst an Rindern des Hygienischen Instituts, dann aber auch an denen des Rassestalles hiesiger Hochschule vorgenommen wurden und den Zweck hatten, festzustellen, ob bei allen Rindern, bei denen Kulturflagellaten nachgewiesen worden waren, gegen Ende des Sommers zunächst ein Rückgang in der Anzahl der positiven Röhrchen und dann zum Winter das völlige Verschwinden derselben konstatiert werden könnte.

Versuch III.

Die zu diesem Versuche verwendeten 8 Rinder wurden zum Teil gleichzeitig zu Heilversuchen gegen Naganatrypanosomen, zum Teil zu Versuchen mit Tuberkulose verwendet. Das Resultat des Versuches dürfte aber dadurch nicht beeinträchtigt werden, da durch Versuch II bereits festgestellt ist, daß das gleichzeitige Vorhandensein von Naganatrypanosomen das Auftreten von Kulturflagellaten nicht verhindert. Diese 8 Rinder hatten bei einer am 11., bzw. 25. Juli 1910 vorgenommenen Prüfung mit der Blutbouillonmethode sämtlich Kulturflagellaten ergeben. Die Anzahl der positiven Röhrchen war zu dieser Zeit nicht notiert worden, da im Juli eine Abnahme der Infektion noch nicht zu bemerken war; es waren jedoch mindestens zwei Drittel der angelegten Röhrchen positiv gewesen.

Rind 1.

Am	30. August	von 12 Röhrechen	—	positiv
„	9. Septbr.	„ 4 „	—	„
„	29. „	„ 7 „	—	„
„	20. Oktober	„ 6 „	—	„

Rind 2.

Am	9. Septbr.	von 4 Röhrechen	—	positiv
„	17. „	„ 6 „	—	„
„	30. „	„ 7 „	—	„
„	20. Oktober	„ 6 „	—	„

Rind 3.

Am	30. August	von 12 Röhrechen	—	positiv
„	9. Septbr.	„ 4 „	1	„
„	17. „	„ 7 „	1	„
„	29. „	„ 7 „	2	„
„	10. Oktober	„ 6 „	—	„
„	20. „	„ 6 „	—	„

Rind 4.

Am	10. Septbr.	von 4 Röhrechen	—	positiv
„	29. „	„ 7 „	—	„
„	20. Oktober	„ 5 „	—	„

Rind 6.

Am	10. Septbr.	von 4 Röhrechen	—	positiv
„	29. „	„ 7 „	—	„
„	20. Oktober	„ 6 „	—	„

Rind 7.

Am	30. Septbr.	von 7 Röhrechen	1	positiv
„	11. Oktober	„ 5 „	—	„
„	12. „	„ 12 „	2	„
„	20. „	„ 7 „	—	„

Rind BI.

Am	10. Septbr.	von 7 Röhrechen	2	positiv
„	30. „	„ 6 „	—	„
„	20. Oktober	„ 6 „	—	„

Rind BIV.

Am	10. Septbr.	von 4 Röhrechen	3	positiv
„	30. „	„ 6 „	1	„
„	20. Oktober	„ 6 „	1	„
„	28. „	„ 10 „	—	„

Sämtliche 8 Rinder wurden nun während der Monate November bis März in jedem Monat einmal auf Kulturflagellaten geprüft, ohne daß es gelungen wäre, solche nachzuweisen. Bei einer am 7. Mai 1911 vorgenommenen Prüfung konnten dann in Blutbouillonkulturen der vier zuletzt angeführten Rinder wiederum Kulturflagellaten gefunden werden.

Dieser Versuch bestätigt das Resultat von Versuch II. Bei allen 8 Rindern ließen sich zum Herbst und während des Winters keine Kulturflagellaten nachweisen. Das Verschwinden der kulturell nachweisbaren Flagellaten bei den Rindern aus den Stallungen des Hygienischen Instituts vom Herbst bis zum Frühling und das Wiederauftreten derselben im Mai bei 4 von 8 Rindern macht es wahrscheinlich, daß das Wiederauftreten der Kulturflagellaten nicht durch Rezidive, sondern durch Neuinfektionen bedingt wurde und daß der Überträger während des Winters gefehlt hatte. Tatsächlich ließen sich in den Stallungen des Hygienischen Instituts während des Winters keine Fliegen oder andere blutsaugende Insekten nachweisen.

Versuch IV.

Das Hauptaugenmerk mußte bei der Suche nach dem Überträger in Anbetracht des hohen Prozentsatzes von Infektionen auf die gewöhnliche Stallfliege, *Stomoxys calcitrans*, gerichtet werden. Ich konnte mich nun überzeugen, daß diese Fliegenart zum Winter wohl aus den Ställen des Hygienischen Instituts, nicht dagegen aus dem Rassestall hiesiger Hochschule verschwand. Dies liegt daran, daß die Kühe des Rassestalles auf Milchergiebigkeit gefüttert und gehalten werden und deshalb im Winter einen warmen zugfreien Stall haben, während die zu Versuchszwecken gehaltenen Rinder des Hygienischen Instituts nur Erhaltungsrations bekommen und sich im Winter in verhältnismäßig kalten Stallungen aufhalten.

Es war unter diesen Umständen äußerst interessant zu erfahren, ob die Kulturflagellaten während des Winters auch bei den Kühen des Rassestalles verschwinden würden. Durch die Liebenswürdigkeit des Hrn. Geh. Regierungsrats Prof. Eggeling, welcher die zu diesem Zwecke nötigen Blutentnahmen von den Rindern des Rassestalles gestattete, wurde mir Gelegenheit geboten, hierüber Untersuchungen anzustellen, die in der folgenden Tabelle kurz zusammengestellt sind (s. S. 380).

Versuch IV ergibt, daß sich bei den Rindern des Rassestalles auch während des Winters Kulturflagellaten nachweisen ließen. Es waren übrigens nicht, wie z. B. bei Versuch III, immer nur einige wenige der angelegten Röhrchen, sondern meist sehr viele derselben positiv. Von der Kuh Marie, die bei den sechs Prüfungen jedesmal positiv war, zeigten meistens alle angelegten Blutbouillonröhrchen Kulturflagellaten.

Blutentnahme am	20. VII.	27. X.	14. XI.	16. I.	4. III.	22. IV.
Lady . . .	+	+				
Antonie . .		+	+	+	—	—
Blume . . .	—	—				
Sarah . . .		+	+	+	—	—
Nanny (alt) .	+	+		+		
Bertha . . .	+	—				
Nanny (neu) .		+		—		
Alma	—	—				
Anna	—	—				
Agathe . . .	+	—				
Marie	+	+	+	+	+	+
Babette . . .	—	—				
Olga		+			—	
Juno	+	+	—	+	+	
Laura	+	+			+	+
Auguste . . .	+	—				
Hulda	—	—				
Luiſe	+	—				
Adelheid . . .	—	—				
Louis	+	—				

Bezüglich des Auftretens der Kulturflagellaten besteht demnach zwischen den Rindern des Hygienischen Instituts und denen des Rassestalles ein scharfer Gegensatz, der leicht durch das Vorhandensein von Fliegen im Rassestall während des Winters erklärt werden kann.

Auch das Resultat dieses Versuchs spricht dafür, daß es sich bei den vier Rindern des Hygienischen Instituts, die erst im Frühling wieder Kulturflagellaten ergaben, nicht um Rezidive, sondern um Neuinfektionen handelte.

Zusammenfassung.

Aus den oben angeführten vier Versuchen geht folgendes hervor:

1. Da sich bei keinem von 18 Kälbern in Blutbouillonkulturen Flagellaten nachweisen ließen, muß auf eine hohe Resistenz der Kälber gegen Spontaninfektionen geschlossen werden.

2. Die Kulturflagellaten lassen sich bei manchen Rindern oft sehr lange Zeit hindurch ununterbrochen nachweisen (vgl. Kuh Marie aus Versuch IV).

3. Das Verschwinden der Infektionen bei Rindern, die in einem fliegenfreien Stalle lebten, und ihr Wiederauftreten zu einer Zeit, wo die Stechfliegen wieder vorhanden waren, ferner das Gelingen des Nachweises von Kulturflagellaten auch während des Winters bei Rindern, die in einem fliegenhaltigen Stalle lebten, macht es wahrscheinlich, daß in der

vorhandenen Stechfliegenart, es handelt sich um *Stomoxys calcitrans*, der Überträger zu suchen ist. Der Beweis für diese Annahme ist allerdings nur durch Übertragungsversuche mittels Fliegen und durch Fliegenuntersuchungen zu erbringen.

4. Untersuchung von Blutbouillonkulturen.

Die günstigste Zeit zum Nachweis von Kulturflagellaten in Blutbouillonkulturen liegt zwischen dem 6. und 10. Kulturtage. Allerdings gelingt der Nachweis z. B. auch schon am 4. und 5. Tage nach Anlage der Kultur, aber erst in der angegebenen Zeit kommt es meist zu einer so starken Vermehrung, daß die Flagellaten mit Leichtigkeit nachgewiesen werden können. Die Kulturen erst nach dem 10. Tage zu untersuchen ist deshalb nicht ratsam, weil die eventuell in die Kulturen gelangten Bakterien in dieser Zeit die Flagellaten schon überwuchert und zum Absterben gebracht haben können. Wie schon Crawley betont, sind Kulturen, die Flagellaten enthalten, oft schon makroskopisch daran zu erkennen, daß sich auf der Oberfläche der abgesetzten Blutzellen kleine umschriebene, punktförmige Stellen von weißlich-gelber Farbe bilden, die vom 8. bis 10. Tage an allmählich zu einer, die ganze Oberfläche überziehenden, dünnen, gelblichen Haut zusammenfließen.

Zur Untersuchung der Kulturen bedient man sich einer Platinöse an möglichst langem Platindraht. Mit dieser geht man unter aseptischen Kautelen in das zu untersuchende Röhrchen bis zu den Blutzellen hinein und sucht von der Schicht, die auf den roten Blutkörperchen lagert und ein feines, aus weißen Blutkörperchen bestehendes Häutchen bildet, etwas in die Öse zu bekommen. Das erhaltene Tröpfchen untersucht man am einfachsten sofort unter dem Deckglas. Mit der DD-Linse des Zeiss'schen Mikroskops sind die Kulturflagellaten wegen der andauernden Bewegung, in der sie sich befinden, leicht auffindbar. Es empfiehlt sich, die Ränder der Klumpen von weißen Blutkörperchen genau zu mustern, da man sie hier am häufigsten findet.

5. Morphologisches über die Kulturflagellaten.

Für meine Untersuchungen kamen vor allem die Formen in Frage, die in den ersten Kulturtagen auftreten, weil durch sie vielleicht ein Rückschluß auf die ursprünglich im Blute befindlichen Formen gemacht werden konnte. Dieser Untersuchung stellten sich aber gewisse Schwierigkeiten in den Weg. Eine solche lag zunächst in dem Umstand,

daß während des Winters, wo ich diese Untersuchungen hauptsächlich vornahm, der Grad der Infektion meistens kein sehr hoher war, so daß ich immer nur sehr wenige Entwicklungsformen zu Gesicht bekam. Ich benutzte während des Winters Blut von Kühen des oben erwähnten Rassestalles. Eine weitere Schwierigkeit lag darin, daß sich die Blutkörperchen in den jungen Kulturen erst sehr langsam, d. h. in 2 bis 3 Tagen, einigermaßen fest absetzen. Erst am 4. Tage haben sich die weißen Blutkörperchen meist zu einem Häutchen zusammengeschlossen, das man mit der Platinöse fassen kann. Um diesen Übelstand zu beseitigen, zentrifugierte ich den Inhalt der zu untersuchenden Röhrchen in den ersten 3 Kulturtagen und erzielte damit gute Resultate. Der Inhalt der Kultur Röhrchen wurde meistens 20 bis 25 Minuten bei 1400 bis 1500 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Dann ließ sich die Schicht der weißen Blutkörperchen sehr gut untersuchen. Durch Zentrifugation in Abständen von einer oder mehreren Stunden versuchte ich einen Überblick über die entstehenden Formen zu bekommen. Die Versuche ergaben, daß die Kulturflagellaten das Zentrifugieren sehr gut aushielten, was auch ebenso von den weiter unten beschriebenen Trypanosomen behauptet werden kann. Versuche, die Flagellaten im sterilen, hängenden Tropfen zum Auftreten zu bringen, schlugen stets fehl, obgleich sie sehr oft vorgenommen wurden.

Die Untersuchung der in den ersten Tagen auftretenden Kulturformen wird ferner dadurch erschwert, daß die weißen Blutkörperchen in dieser Zeit ganz eigenartige Veränderungen zeigen, die wohl auf Degeneration beruhen und zu Verwechselungen mit Parasiten Anlaß geben können. Einige der Abbildungen, die Miyajima (10) seiner Arbeit: „On the Cultivation of a bovine Piroplasma“ beigegeben hat, möchte ich für solche Verwechselungen halten.

In einer vorläufigen Mitteilung über „Präflagellate Entwicklungsstadien der in deutschen Rindern kulturell nachweisbaren Trypanosomen“ (15) habe ich bereits darauf hingewiesen, daß mir bei 1- bis 2 tägigen Kulturen Formen aufgefallen waren, die ein endoleukozytäres Stadium darzustellen schienen. Wegen der Seltenheit dieser Formen habe ich mich damals noch nicht bestimmter äußern können. Solche in weißen Blutkörperchen enthaltenen Formen habe ich dann in ziemlich großer Menge gefunden, als ich Ausstriche untersuchte, die aus einer 5 tägigen Kultur stammten, bei der mir die ungewöhnliche Menge der schon am 5. Tage vorhandenen Kulturformen aufgefallen war. Leider waren von den stark parasitenhaltigen Röhrchen in den ersten Tagen keine Ausstriche zum Zwecke der Färbung gemacht worden. Auch eine neue Kulturanlage mit Blut derselben Kuh konnte nicht vorgenommen werden, weil sie inzwischen geschlachtet worden

war. Die endoleukozytären Formen befanden sich alle in polymorphkernigen, neutrophilen Leukozyten (Figg. 1 bis 3, Taf. VII). In jedem der oben erwähnten Ausstriche aus 5 tägiger Kultur waren ungefähr 12 bis 15 solcher Formen zu finden. Die in den polymorphkernigen Leukozyten zu beobachtenden Formen heben sich sehr gut von der gelblichen Plasmafärbung der Leukozyten ab. Sie sind mehr oder weniger tief blau gefärbt und enthalten meist Kern und Blepharoplasten, zuweilen aber nur einen von den beiden. Manchmal ist der Hauptkern zu Chromatinkörnern zerfallen. Meistens sind einige Granula im Protoplasma eingelagert. Die Kleinheit der Formen, ihre scharfe Abgrenzung und Färbung und schließlich die Anzahl der beobachteten Formen machen es sehr wahrscheinlich, daß es sich nicht um phagozytierte Formen, sondern um Entwicklungsstadien handelt. Neben Formen, die ziemlich klein und oft nur mit einem Kern ausgestattet sind, finden sich größere, wobei dann das Protoplasma der Neutrophilen gelber gefärbt ist und zur Vakuolenbildung neigt. Eine Geißel wurde bei diesen endoleukozytären Formen nie gefunden. Manchmal lagern sich sowohl Hauptkern und Blepharoplast als auch das Protoplasma am Rande ab, wodurch in der Mitte des Parasiten eine helle Stelle entsteht. Hierdurch kann eine Reifenform zustandekommen, wie sie in Fig. 3, Taf. VII abgebildet ist (vgl. auch Fig. 8, Taf. VII).

Die Frage, ob die späteren Flagellaten alle zuvor ein endoleukozytäres Stadium durchmachen müssen, habe ich nicht entscheiden können. Auffällig ist, daß endoleukozytäre Formen im allgemeinen sehr selten gefunden werden und nur einmal, und zwar am 5. Kulturtage, in größerer Anzahl beobachtet werden konnten.

Im Laufe des 3. Tages, frühestens und selten schon während des 2. Tages, wurden die ersten freien und geißellosen Formen beobachtet. Diese haben meist birnenförmige Gestalt, ihr Kern nimmt ziemlich starke Chromatinfärbung an und ihr Protoplasma ist tief blau gefärbt. Die Größe dieser Formen entspricht der der roten Blutkörperchen. Die ersten geißeltragenden Formen finden sich meistens am 3. Tage, im frühesten Falle nach meiner Beobachtung nach 42 Stunden. Die ersten Flagellatenformen sind immer sehr schmal und haben typische Crithidienform. Von dem meist in der vorderen Hälfte des Plasmaleibes und zwar dicht vor dem Hauptkern liegenden Blepharoplasten entspringt eine kurze undulierende Membran, die in eine am Ende meist mit einem Knöpfchen versehene Geißel ausläuft. Die zunächst auftretenden schmalen Formen scheinen aus den geißellosen, abgerundeten dadurch zu entstehen, daß sich in der Mitte des Plasmakörpers eine Vakuole bildet, wodurch der Kern an die Wand gedrückt wird. Vom Blepharoplasten aus, der dem Hauptkern immer sehr nahe liegt, entwickelt sich dann der Randfaden, der sich zunächst nur schwach rot

färbt. Schließlich wird die Geißel frei, und es erfolgt auf der dem Hauptkern gegenüberliegenden Seite die schräge Durchteilung. Hierauf strecken sich die Flagellaten erst allmählich. Von den Reifenformen habe ich verschiedene gesehen — eine solche ist in Fig. 8, Taf. VII abgebildet.

Die birnenförmigen kleinen Formen können auch eine Geißel bilden, ohne die Gestalt zu verändern (Fig. 7, Taf. VII). Das Hinterende bleibt bei diesen Formen abgerundet, eine undulierende Membran fehlt im Gegensatz zu den oben beschriebenen schmalen Formen mit spitzem Hinterende und kurzer undulierender Membran.

Während die langen schmalen Formen sich durch Längsteilung vermehren, teilen sich die birnenförmigen Flagellaten meist in vier Teile, die kleeblattartig zusammenhängen. Die hierdurch entstandenen neuen Individuen treten dann in eine Vielteilung ein. Hierbei entstehen in einem Plasmakörper zunächst zwei Blepharoplasten und zwei Hauptkerne, dann bei gleichzeitiger Ausdehnung des Plasmakörpers schließlich hunderte von Hauptkernen und Blepharoplasten, die dicht nebeneinander liegen. In diesem Stadium sieht man im gefärbten Präparat meist nur einen bläulich-violetten Fleck, in dem sehr viele kleine Punkte erkennbar sind. Diese Punkte sind die Blepharoplasten, die den Kernfarbstoff an sich gerissen haben. Hierauf wachsen die Geißeln aus den Blepharoplasten hervor (Fig. 10, Taf. VII). Erst jetzt kommt es zu einer allmählichen Scheidung in Einzelformen, was sich zunächst durch strichförmige helle Streifen im Protoplasma anzeigt. Die einzelnen Flagellaten haben jetzt meist eine wurstförmige, etwas gekrümmte Gestalt mit abgerundetem Hinterende (Fig. 11, Taf. VII). Durch allmähliche Streckung kommt das spitze Hinterende zustande. Die Flagellaten liegen vor der Trennung meistens zu Knäueln zusammen, oft zeigen sie auch eine Gruppierung, indem z. B. die Kerne alle nebeneinanderliegen und das Hinterende der Flagellaten noch verwachsen ist, wodurch eine Rosettenform zustandekommt. Die Bewegung der Geißeln ist in diesem Stadium eine sehr lebhaft. Die vollkommene Trennung ist am 10. Tage meistens beendet. Bemerkenswert ist noch, daß in der Mitte großer Haufen von Kulturflagellaten fast immer einige runde Formen zu finden sind, die viel Protoplasma haben und sich durch viel hellere Färbung desselben auszeichnen. Auch sie besitzen Geißeln, die aber, ohne daß eine undulierende Membran vorhanden wäre, frei nach außen ragen. Zur Zeit der Trennung voneinander zeigen die Kulturflagellaten im allgemeinen einen typischen Bau, sowohl was Größe als auch Gestalt anbelangt (Fig. 14, Taf. VII). Die beiden Kerne liegen dicht nebeneinander, und zwar der Blepharoplast vor dem Hauptkern, beide in der vorderen Hälfte des Plasmaleibes. Der Hauptkern ist fast immer rund und färbt sich gleichmäßig rot, der Blepharoplast ist

ziemlich groß und oft rechteckig geformt, er färbt sich sehr stark und ist quer gestellt, vor ihm ist häufig eine Vakuole gelegen. Die vom Blepharoplasten ausgehende kurze undulierende Membran läuft in eine Geißel aus, die an der Spitze gewöhnlich geknöpft ist. Das Hinterende ist zugespitzt. Die Länge dieser Formen beträgt ungefähr 30 bis 45 μ , die Breite $1\frac{1}{2}$ bis 3 μ , die Länge der Geißel $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der Gesamtlänge.

Die Bewegung dieser Flagellaten ist entweder eine Bewegung am Ort, indem die Geißel hin und her schlägt und der Plasmaleib nur in schwankende Bewegungen versetzt wird, oder eine Vorwärtsbewegung mit der Geißel voran. Der Plasmaleib ist fast immer ganz gerade und unbeweglich. Deshalb findet man in gefärbten Präparaten sehr selten solche Flagellaten, deren Leib geschlängelt ist. Die Geißelbewegung geschieht in Form einer fortlaufenden Welle. Diese Flagellaten vermehren sich durch Längsteilung (Fig. 9, Taf. VII). Sie beginnt mit der Teilung des Blepharoplasten und der Bildung einer neuen Geißel, worauf der Hauptkern sich teilt und die Durchschnürung des Plasmaleibes von der Geißel aus erfolgt. Die in Fig. 9, Taf. VII abgebildete Teilungsform zeigt nicht die gewöhnliche Durchschnürung des Hauptkerns, es treten hier vielmehr drei aus Chromatin bestehende Spiralen auf, an deren Ende je ein Blepharoplast liegt, der die Funktion eines Centrosomas übernommen zu haben scheint. Zuweilen sieht man Individuen, die mit dem Hinterende zusammenhängen, während die Geißeln in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Die Trennung dieser Formen (Fig. 15, Taf. VII) erfolgt durch schräge Querteilung in der Mitte, sodaß beide Individuen ein spitzes Hinterende bekommen.

Der einheitliche Typus der Flagellaten verliert sich dann schon innerhalb der nächsten Tage. Neben langen, dünnen Flagellaten mit viel Kernsubstanz treten breite Formen mit hellem Protoplasma und verhältnismäßig kurzer Geißel auf. Häufig werden dann ferner Formen beobachtet, bei denen beide Kerne in der vorderen Spitze des Plasmaleibes liegen, wodurch eine keulenförmige Anschwellung dieser Stelle bedingt wird. Gerade diese Formen haben oft mehrere Kerne und dementsprechend auch Geißeln, so daß man Formen beobachten kann, bei denen aus der meist vollkommen mit Kernen angefüllten Verdickung am Vorderende 3 oder 4 Geißeln hervorragen, die sich sehr lebhaft bewegen und ziemlich lang zu sein pflegen. Auch runde Formen treten auf, die meistens eine sehr lange, freie Geißel besitzen. In sehr alten Kulturen findet man auch ganz kleine Formen, die sich äußerst lebhaft bewegen (Figg. 18 und 19, Taf. VII), daneben Formen, die ziemlich schmal sind und Trypanosomen gleichen, bei denen es also zu einer Umlagerung der beiden Kerne gekommen ist, so daß der Hauptkern vor dem Blepharoplasten

liegt (Fig. 23, Taf. VII). Ausnahmsweise kann man übrigens auch in jungen Kulturen einmal Flagellaten von Trypanosomenform finden, bei denen der Blepharoplast dann fast immer dicht hinter dem Hauptkern liegt. Ist eine Kultur stark mit Bakterien verunreinigt oder mehrere Monate alt, so beobachtet man schließlich nur noch runde Formen mit schwacher Beweglichkeit, bei denen es zur Auflösung der Kerne und Abstoßung der Geißel kommt. Die Formen sehen hellrot aus und haben etwa den doppelten Durchmesser eines roten Blutkörperchens. Eine Kapsel habe ich bei diesen schließlich ganz homogen gewordenen runden Formen nie nachweisen können. Bei einigen Kulturröhrchen konnte ich nach ungefähr 4 Wochen eine erneute rapide Vermehrung der Flagellaten beobachten, die zu dieser Zeit eine sehr lebhaft bewegte zeigten; dabei verschärften sich die Gegensätze der Formen. Neben ganz dünnen, äußerst beweglichen Flagellaten mit viel Kernsubstanz, die an der Stelle, wo der Kern liegt, knotig verdickt erscheinen, sieht man dann vor allem geblähte, runde Formen mit heller Protoplasmafärbung und kleinem hellem Kern, dessen Chromatinsubstanz oft ringförmig angeordnet ist. Um die großen, schwerer beweglichen sammeln sich in der Regel schmale Formen an, wobei die nach innen gerichteten Geißeln oft ein unentwirrbares Knäuel bilden. Fast alle Kulturflagellaten, vor allem vom 10. Kulturtage an, zeigen mehr oder weniger Granula im Protoplasma. Es kommen Formen vor, die ca. 80 μ lang sind, daneben Formen, die nur eine Länge von 10 μ haben.

Während für die zu morphologischen oder vergleichenden Zwecken angestellten Versuche zur Anfertigung der Blutbouillonkulturen nur Rindfleischbouillon verwendet wurde, wurde andererseits versucht, diese Bouillon durch solche zu ersetzen, die aus Schaf- oder Hirschfleisch, ferner durch solche, die aus Liebig's Fleischextrakt hergestellt worden war. Mit diesen Bouillonarten wurden dieselben positiven Resultate erzielt wie mit Rindfleischbouillon. Auch in 10 prozentiger Peptonlösung konnte das Auftreten von Kulturflagellaten beobachtet werden. Noch nach 5 Monaten fand ich in solchen mit Peptonlösung hergestellten Kulturen äußerst lebhaft bewegliche Flagellaten.

Dagegen entstanden die Kulturflagellaten nie in defibriniertem, längere Zeit aufbewahrttem Blute und in Röhrchen, bei denen die Bouillon durch destilliertes Wasser oder durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt worden war.

Bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gedeihen die Kulturflagellaten am besten. In Kulturen, die von Anfang an einer Temperatur von 37.2° ausgesetzt waren, habe ich nie Kulturflagellaten gefunden. Auch Kulturen, die bei 0° gehalten wurden, gingen nicht an.

Wo die genaue Temperaturgrenze sowohl nach oben als auch unten hin liegt, habe ich nicht geprüft. Die Einwirkung von Sonnenstrahlen hemmt die Entstehung der Flagellaten nicht.

6. Übertragungsversuche.

Analog den Versuchen von Miyajima (10) und Martini (11) habe auch ich durch Injektion von Blut oder Kulturen bei nichtinfizierten Rindern Infektionen zu erzielen versucht. Miyajima war es gelungen, von drei mit Blutbouillonkulturen geimpften Kälbern bei zweien, in einem Falle nach 8 Tagen, in Blutbouillonkulturen wiederum Kulturflagellaten nachweisen zu können. Auch Martini berichtet von ähnlichen Erfolgen nach Verimpfung von Kulturen auf Kälber. Nach Injektion von Blut solcher Rinder, in deren Blutbouillonkulturen Flagellaten nachgewiesen werden konnten, sah Martini jedoch weder in Kulturen noch im Blut der geimpften Kälber irgend welche Formen auftreten, die mit den Flagellaten in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Übertragungsversuch I.¹

Während der Zeit, in der Rind 10 Kulturflagellaten aufwies, wurde ein Übertragungsversuch mit dem Blut dieses Rindes gemacht. Nachdem eine für diesen Zweck angekaufte, ca. 1½ Jahre alte Färse schon bei der Vorprüfung Kulturflagellaten gezeigt hatte und deshalb nicht verwendet werden konnte, wurde zu diesem Versuch ein Kalb (Nr. 11) gewählt, das erst 10 Tage alt war. Trotzdem ich bei Kälbern niemals Spontaninfektionen mit Kulturflagellaten beobachten konnte (vgl. Versuch I), wählte ich zu den Übertragungsversuchen in der Folge Kälber, und zwar angesichts der positiven Resultate, die Miyajima und Martini bei der Überimpfung von Kulturen auf Kälber erzielt hatten. Dem Kalbe (Nr. 11) wurden am 9. August je 5 ccm Blut von Rind 10 subkutan und intraperitoneal injiziert, nachdem sowohl dem Kalbe, als auch dem Rinde Blut zum Anlegen von Blutbouillonröhrchen entnommen worden war. In den mit Blut von Rind 10 angefertigten Kulturen entwickelten sich Flagellaten, in denen von Kalb 11 nicht.

Untersuchungen des Kalbes, die vom Tage der Injektion an sowohl an hängenden Tropfen und Blutaussstrichen als auch an Blutbouillonkulturen jeden 2. Tag vorgenommen wurden, fielen negativ aus.

Am 13. September wurde die Untersuchung abgebrochen.

¹ Die Übertragungsversuche I und II führte ich zusammen mit Herrn Oberveterinär a. D. Rauchbaar aus.

Es war somit nicht gelungen, ein Kalb durch Blut eines Rindes, bei dem sich in Blutbouillonkulturen Flagellaten entwickelten, zu infizieren.

Übertragungsversuch II.

Dem 10 Tage alten Kalb 12 wurde am 22. August der Inhalt von drei positiven 13tägigen Blutbouillonröhrchen subkutan injiziert.

Die fast täglich vorgenommene Untersuchung von hängenden Tropfen, Blutaussstrichen und Blutbouillonröhrchen blieb negativ.

Der Versuch wurde am 13. September abgebrochen.

Übertragungsversuch III.

Vorher erwähntes Kalb 11, das am 9. August ohne Erfolg mit Blut von Rind 10 geimpft worden war, wurde in der Erwägung, daß eine 13tägige Kultur, wie sie bei Kalb 12 (s. Übertragungsversuch II) verwendet worden war, vielleicht infolge ihres Alters nicht mehr infektiös-tüchtig gewesen sei, am 19. September mit 5tägiger Kultur subkutan geimpft. Die Untersuchung, die sich neben Blutaussstrichen vor allem auf sehr viele Blutbouillonröhrchen, die täglich angelegt wurden, erstreckte, fiel negativ aus und wurde daher am 5. November abgebrochen.

Zwei Versuche also, Kälber mit Kulturen zu infizieren, in denen Flagellaten vorhanden waren, schlugen fehl.

Bevor ich die weiteren Übertragungsversuche anführe, muß ich den Fund eines Trypanosomas im Blute eines Rindes erwähnen.

Seit Anfang August 1910 war ich bemüht, im Blute von Rindern, bei denen in Blutbouillonkulturen Flagellaten auftraten, Formen zu finden, aus denen die Kulturflagellaten hervorgehen könnten. Ich untersuchte zu diesem Zwecke sehr viele nach Giemsa gefärbte Blutaussstriche solcher Rinder, ohne zu einem positiven Ergebnis zu kommen. Da fand ich im Oktober 1910 in einem von 20 Blutaussstrichen, die am 8. August aus dem Ohrvenenblut von Rind 10 angefertigt worden waren, ein einziges und zwar auffällig großes und breites Trypanosoma, ohne auch bei genauester Untersuchung weitere Trypanosomen auffinden zu können. Der Blutaussstrich war zu einer Zeit von Rind 10 angefertigt worden, wo in Blutbouillonkulturen dieses Rindes Flagellaten aufgetreten waren (s. Versuch II auf S. 376). In einer vorläufigen Mitteilung über diesen Fund hat Verfasser (16) das bei Rind 10 (in der Mitteilung „Kuh Nachtigall“ genannt) gefundene Trypanosoma folgendermaßen beschrieben:

„Der sehr breite, plumpe Körper des Trypanosomas befindet sich in gekrümmter Stellung und weist folgende Maße auf:

Vom Hinterende bis zur Mitte des Blepharoplasten . . .	13 μ
Von der Mitte des Blepharoplasten bis zum hinteren Rand des Kerns	4 „
Kern in der Längsrichtung des Körpers	2 „
Vom vorderen Rand des Kerns bis zum Vorderende des Körpers	24 „
Länge des Protoplasma-körpers	43 „
Länge der freien Geißel	12 „
Gesamtlänge des Trypanosomas	55 „
Größte Breite	12 „

Das Protoplasma des Trypanosomas ist bläulich gefärbt und zeigt neben hellen Stellen, an denen sich wahrscheinlich Vakuolen befinden, eine starke Granulation. Die Granula sind fast sämtlich gleich groß und haben eine rötlich- bis bläulich-violette Färbung. Vor dem Kern befinden sich mehr rötlich-violette Granula, hinter demselben mehr bläulich-violette. Um den Hauptkern herum ist die Granulation weniger stark, auch ist hier das Protoplasma etwas heller gefärbt. Auch in dem hinter dem Kern gelegenen Protoplasma fällt eine solche Stelle auf, in deren Mitte der schwarz-violett gefärbte Blepharoplast liegt. Der Hauptkern ist quer gestellt und blaßrot gefärbt. In der Querrichtung füllt er die ganze Breite des Protoplasmaleibes aus, während er, in der Längsrichtung des Körpers gemessen, einen sehr geringen Durchmesser hat. Der Blepharoplast liegt hinter dem Hauptkern und zwar diesem näher als dem abgestumpften Hinterende. In seiner Nähe entspringt die undulierende Membran, die sich als roter Faden an derselben Seite bis kurz vor dem Vorderende entlang zieht. Hier biegt sie auf die andere Seite über und läuft dann in die ebenso gefärbte Geißel aus, deren genaue Länge leider nicht feststellbar ist, da das Ende derselben von einem roten Blutkörperchen verdeckt wird. Aus demselben Grunde kann man auch die Form der Geißelspitze nicht feststellen, die, nebenbei bemerkt, bei fast sämtlichen aus den Versuchsrindern kulturell gewonnenen Trypanosomen in einem Knöpfchen endigt.

Über die Zugehörigkeit dieses Trypanosomas zu irgendeiner Art, auch darüber, welche Entwicklungsform dieses auffällige Gebilde darstellt, läßt sich bisher aus Mangel an Material nichts sagen, da es mir nicht gelang, andere Trypanosomen in der Blutbahn aufzufinden.“

Dieser beachtenswerte Fund veranlaßte mich, nochmals einen Übertragungsversuch mit Blut solcher Rinder, bei denen in Blutbouillonkulturen Flagellaten auftraten, zu machen.

Übertragungsversuch IV.

Zum Versuchstier wurde in Ermangelung eines neuen Kalbes wiederum Kalb 11 genommen, das schon zu den Übertragungsversuchen I und III gedient hatte.

Am 14. November 1910 nahm ich von vier Rindern des Rassestalls hiesiger Hochschule, bei denen die Prüfung der am 27. bzw. 28. Oktober angelegten Blutbouillonkulturen Kulturflagellaten ergeben hatte, Blut aus der Jugularis, defibrinierte es und injizierte von dem durch ein ausgekochtes Leinentuch filtrierten und mit etwas physiologischer Kochsalzlösung versetzten Blutgemisch 150 ^{ccm} dem nun 3½ Monate alten Kalb 11 intravenös. Bei drei dieser Rinder aus dem Rassestall entwickelten sich in den am Tage der Injektion angelegten Bouillonkulturen Flagellaten. Während nun bei Kalb 11 bislang weder im Blut noch in Kulturen Trypanosomen gefunden wurden, traten bei demselben am 25. November, also 11 Tage nach der Injektion, mikroskopisch nachweisbare Trypanosomen in der Blutbahn auf, die bis zum 1. Dezember sichtbar blieben. Die Anzahl der Trypanosomen war äußerst gering. In den auf Objekträgern angefertigten Ausstrichen waren durchschnittlich fünf Trypanosomen zu finden. Die Temperatur des Kalbes war nicht wesentlich erhöht. Auffällig an den Trypanosomen war vor allem ihre Größe und Vielgestaltigkeit. [Dieser Befund wurde bereits als vorläufige Mitteilung (17) veröffentlicht.]

Es gelang mir also, bei einem Kalbe nach Injektion von Blut von Kühen, bei denen Kulturflagellaten nachweisbar waren, Trypanosomen in der Blutbahn nachzuweisen. Gleichzeitig konnten auch in den während der Zeit des Auftretens von Trypanosomen bei Kalb 11 angelegten Blutbouillonkulturen Flagellaten beobachtet werden, die aber nicht wie sonst frühestens nach 2 Tagen, sondern schon nach einem Tage in großer Anzahl auftraten, und deren Vermehrung dann aufhörte. In Blutausstrichen von den vier Kühen des Rassestalls konnten keine Trypanosomen gefunden werden.

Nun suchte ich festzustellen, ob durch Injektion von Blut von Kalb 11 bei einem Rinde, das schon früher bei der Prüfung von Blutbouillonkulturen Flagellaten ergeben hatte, Trypanosomen zu erzielen sein würden.

Übertragungsversuch V.

Zu dem Versuch wurde Rind 6 gewählt, das am 25. Juli Kulturflagellaten ergeben hatte, seitdem aber keine mehr gezeigt hatte. Am 2. Dezember 1910, also gerade nach dem Verschwinden der Trypanosomen

bei Kalb 11, wurden dem Rind 6 50^{cem} Blut von Kalb 11 intravenös injiziert.

Trotz täglicher genauer Untersuchung von dicken Tropfen, Ausstrichen und Blutbouillonkulturen wurden weder Trypanosomen noch Kulturflagellaten bei Rind 6 beobachtet.

Der Versuch wurde deshalb am 5. Januar abgebrochen.

An die Übertragungsversuche IV und V schließen sich die drei folgenden Versuche eng an. Es galt nämlich festzustellen:

1. Ob das Blut von Kalb 11 für andere Kälber infektiös ist, dergestalt, daß auch bei ihnen Trypanosomen nachzuweisen sind.

2. Ob eine Wiederholung des Übertragungsversuches IV dasselbe Resultat ergibt.

3. Ob das Blut von Rind 6, das nach Injektion von Blut des Kalbes 11 keine Trypanosomen gezeigt hatte, für ein Kalb infektiös ist, so daß bei diesem Trypanosomen auftreten.

Übertragungsversuch VI.

Am 17. Januar 1911 wurden dem ungefähr 6 Monate alten Kalb 15 100^{cem} Blut von Kalb 11 zusammen mit 50^{cem} physiologischer Kochsalz-

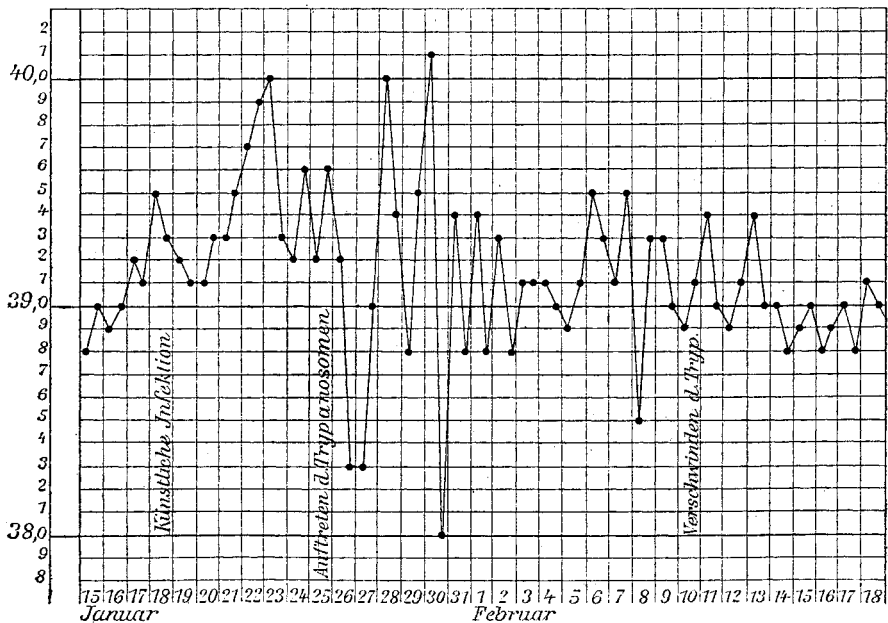


Fig. 1.

lösung intravenös injiziert, nachdem mit Blut desselben vorher 10 Blutbouillonröhrchen angelegt worden waren, die bei der Untersuchung ein negatives Resultat ergaben.

Am 25. Januar traten bei Kalb 15 Trypanosomen im Blute auf, die sich bis zum 10. Februar nachweisen ließen. Während der Inkubationszeit, die in diesem Falle nur 8 Tage betrug, und auch während des Vorhandenseins der Trypanosomen in der Blutbahn war die Temperatur des Kalbes zeitweise leicht fieberhaft erhöht und ziemlichen Schwankungen ausgesetzt, wie die Fieberkurve (Fig. 1) zeigt.

Die Trypanosomen traten bei Kalb 15 in weit größerer Anzahl auf als bei Kalb 11. Auch bei Kalb 15 traten in Blutbouillonkulturen nur so lange Kulturformen auf, als im Blute Trypanosomen nachzuweisen waren.

Der Versuch ergibt, daß das Blut von Kalb 11 1½ Monate nach dem Verschwinden der Trypanosomen aus der Blutbahn noch für ein anderes Kalb infektiös war.

Übertragungsversuch VII.

Wiederholung von Übertragungsversuch IV.

Am 16. Januar wurden dem etwa 6 Monate alten Kalb 13 100^{cem} eines Gemisches von Blut von denselben 4 Kühen des Rassestalles, vermischt mit 50^{cem} physiologischer Kochsalzlösung, intravenös injiziert, nachdem sowohl von Kalb 13 als auch von den vier Rindern Blutbouillonkulturen angelegt worden waren. Die Blutbouillonkulturen von allen vier Rindern aus dem Rassestall zeigten Kulturflagellaten.

Trotz eifrigster Untersuchung von dicken Tropfen und Ausstrichen, die täglich angefertigt wurden, konnten bei Kalb 13 niemals Trypanosomen gefunden werden. Die Körpertemperatur von Kalb 13 zeigte in der kritischen Zeit große Schwankungen und stieg einmal sogar bis 40.5° C.

Der Versuch wurde am 20. Februar abgebrochen.

Am 13. August 1911 wurde nachgeprüft, ob Kalb 13 wirklich infiziert worden war oder nicht. Es wurden nämlich einem anderen Kalbe (Nr. 23) 50^{cem} Blut von Kalb 13 intravenös injiziert und Kalb 13 am selben Tage mit Blut von einem Kalbe, das Trypanosomen in der Blutbahn hatte, geimpft. Bei dem mit Blut von Kalb 13 geimpften Kalbe traten keine Trypanosomen auf, dagegen bei Kalb 13. Da es mir bis jetzt nicht gelungen ist, Kälber, die schon einmal Trypanosomen gezeigt haben, wieder neu zu infizieren, muß ich annehmen, daß Kalb 13 seinerzeit nicht infiziert worden war. Das Resultat dieses Versuches überrascht um so mehr, als sich zur Zeit, wo Kalb 13 geimpft wurde, bei sämtlichen zur Impfung verwendeten Kühen Kulturflagellaten nachweisen ließen.

Übertragungsversuch VIII.

Dieser Versuch sollte dartun, ob das Blut von Rind 6, das nach Injektion von Blut des Kalbes 11 keine Trypanosomen ergeben hatte, für ein Kalb infektiös wäre, so daß bei diesem wiederum Trypanosomen nachgewiesen werden könnten.

Zu diesem Zwecke wurden dem etwa 5 Monate alten Kalb 14 am 17. Januar 100^{cem} Blut von Rind 6, vermischt mit 50^{cem} physiologischer Kochsalzlösung, intravenös injiziert.

Je 6 von Kalb 14 und Rind 6 vorher angelegte Blutbouillonröhrchen blieben negativ.

Weder durch dicke Tropfen noch durch Ausstriche konnten bei dem geimpften Kalbe Trypanosomen beobachtet werden, obgleich 1 Monat hindurch täglich Untersuchungen daraufhin angestellt wurden.

Die Temperatur von Kalb 14 zeigte in der ganzen Zeit nichts Auffälliges.

Am 20. Februar wurde der Versuch abgebrochen. Kalb 14 zeigte, nachdem es am 31. III. mit trypanosomenhaltigem Blut von Kalb 19 geimpft worden war, Trypanosomen im Blute, war also im Januar nicht infiziert worden.

Dieser Versuch bestätigt das Resultat von Übertragungsversuch V.

Es war somit nicht gelungen, Rind 6 mit Trypanosomen zu infizieren.

Übertragungsversuch IX.

Am 3. August 1911 injizierte ich dem Kalb 11, bei dem vom 25. November bis 1. Dezember 1910 Trypanosomen nachgewiesen worden waren (vgl. Übertragungsversuch IV), intravenös 100^{cem} Blut von Kalb 22, das gerade Trypanosomen zeigte. Bei Kalb 11 konnten trotz genauer Untersuchung Trypanosomen nicht gefunden werden. Dieser Versuch, zusammen mit anderen gleichartigen, zeigt, daß es bei einem Kalbe, das schon früher mit Trypanosomen infiziert wurde, nicht mehr zu einer erneuten Vermehrung dieser Blutparasiten nach Injektion von infektiösem Blut kommt.

Übersicht.

1. Zwei Versuche, bei jungen Kälbern durch subkutane Injektion von 5- bzw. 13 tägigen Blutbouillonkulturen, die Flagellaten aufwiesen, Trypanosomen oder Kulturflagellaten zu erzielen, ergaben ein negatives Resultat. Diese Versuche bestätigen also die von Miyajima und Martini hierüber gemachten Angaben nicht.

2. Es gelang unter drei Versuchen einmal, bei einem Kalbe durch Injektion von Blut solcher Rinder, die bei der Prüfung Kulturflagellaten ergaben, Trypanosomen in der Blutbahn hervorzurufen.

3. Das Blut eines Kalbes, bei dem die Trypanosomen aufgetreten waren, erwies sich für ein anderes Kalb als infektiös, so daß bei diesem Trypanosomen nachgewiesen werden konnten, nicht dagegen für ein Rind, bei dem die Prüfung auf Kulturflagellaten 4 Monate vorher solche ergeben hatte. Ob dieser negative Ausfall des Infektionsversuches darauf zurückzuführen ist, daß das Blut von Kalb 11 am Impfungstage keine Trypanosomen enthielt oder ob Rind 6 gegen die Infektion immun war, läßt sich nicht genau entscheiden.

4. Es gelang nicht, ein Kalb, bei dem 8 Monate vorher Trypanosomen nachgewiesen worden waren, durch Injektion von trypanosomenhaltigem Blut eines anderen Kalbes von neuem dergestalt zu infizieren, daß wiederum Trypanosomen auftraten.

7. Morphologie der neu aufgefundenen Trypanosomen.

Die Trypanosomen, die bei Kalb 11 und 15 (vgl. Übertragungsversuch IV und VI) in der Blutbahn beobachtet wurden, weisen eine große Mannigfaltigkeit der Formen auf. Besonders auffallend sind die Schwankungen in bezug auf Größe und Breite. Die Länge der Trypanosomen schwankt nämlich zwischen 20 und 70 μ , die Breite zwischen 1.6 und 12 μ . Die verschiedenartigen Formen lassen sich unschwer in drei Gruppen gliedern, nämlich in:

- a) große schlanke Formen,
- b) große breite „
- c) kleine schlanke „ ,

zwischen denen Übergänge nicht gerade häufig zu bemerken sind.

Neben den Unterschieden in bezug auf Größe und Breite, die schon aus den Bezeichnungen zu entnehmen sind, unterscheiden sich diese Formen auch durch ihre Färbbarkeit und ihren inneren Aufbau.

Einige Merkmale sind aber allen Trypanosomen gemeinsam. Ein solches ist zunächst das Hinterende derselben, das immer in eine meist sehr feine Spitze ausläuft und in gefärbten Ausstrichen stets mehr oder weniger stark hakenförmig gebogen ist. Ferner liegt der Hauptkern der Trypanosomen immer in der hinteren Hälfte des Plasma-leibes. Der Blepharoplast ist randständig. Teilungsformen konnte ich bei den Trypanosomen nur außerordentlich selten nachweisen. Die in Figg. 27 und 28, Taf. VIII abgebildeten Teilungsformen sind die einzigen, die ich aufzufinden vermochte. Das in Fig. 27, Taf. VIII abgebildete Trypanosoma zeigt zwei hintereinander gelagerte Hauptkerne. Der Teilung des Hauptkernes ist aber merkwürdigerweise die des Blepharoplasten nicht vorausgegangen, wie es sonst bei der Teilung von Trypanosomen die Regel

zu sein pflegt. Ob die in Fig. 28, Taf. VIII abgebildete Form wirklich als Teilungsform anzusehen ist, könnte zweifelhaft erscheinen. Man sieht hier zwar eine zweite Geißel, die frei nach außen ragt, man sollte aber auch hier eine vorherige Teilung des Blepharoplasten erwarten.

Unter den vielen Trypanosomen, die ich zu Gesicht bekam, befanden sich drei, bei denen der Blepharoplast vor bzw. neben dem Hauptkern lag. Diese Formen gleichen den beim *Trypanosoma theileri* zuerst beobachteten Formen, die von Laveran als besondere Trypanosomenart angesehen und mit dem Namen *Trypanosoma transvaaliense* belegt wurden. Es steht jedoch fest, daß es sich hierbei nur um Entwicklungsstadien bzw. Variationen einer einzigen Art handelt. Eine solche typische Form ist in Fig. 25, Taf. VIII abgebildet. Dann fanden sich einige wenige kleine Formen, bei denen sich der Blepharoplast dicht hinter dem noch immer ziemlich weit nach hinten gelegenen Hauptkern befand (Fig. 26, Taf. VIII). Es scheint also, als wenn der zuerst hinter dem Blepharoplasten gelegene Hauptkern bei diesen Formen allmählich nach vorn in seine gewöhnliche Lage wandert.

Die ersten nach der Infektion auftretenden Formen waren äußerst spärlich und gehörten größtenteils den kleinen schlanken Formen an. Überhaupt traten die Trypanosomen in so geringer Menge auf, daß ich nur mit einem verschiebbaren und auf Zahlen einstellbaren Objektisch, vermittelt dessen sich jederzeit die einmal gefundenen Trypanosomen wieder einstellen ließen, erfolgreich arbeiten konnte. Mit der Zunahme der Trypanosomen traten dann gleichzeitig alle drei Formen auf, die bis zum Ende der Infektion nachweisbar blieben. In bezug auf das Mengenverhältnis der drei Formen war bei den Infektionen von Kalb 11 und 15 ein Unterschied wahrzunehmen.

Bei Kalb 11 waren

29	Prozent	große	schlanke	Formen,	
45	„	große	breite	„	und
26	„	kleine	schlanke	„	

vorhanden, dagegen bei Kalb 15

55	Prozent	große	schlanke	Formen,	
23	„	große	breite	„	und
22	„	kleine	schlanke	„	

Ähnlich wie bei Kalb 15 war das Mengenverhältnis bei den folgenden Passagen.

Aus der Menge der großen breiten Formen bei Kalb 11 erklärt sich die Durchschnittsbreite, die an 86 Trypanosomen gemessen wurde. Sie

betrug bei Kalb 11 bei einer Durchschnittslänge von $52.7 \mu = 4.3 \mu$, dagegen bei Kalb 15 bei einer Länge von 51.02μ nur 2.96μ .

Die drei verschiedenartigen Formen der Trypanosomen sollen im folgenden näher beschrieben werden.

A. Große schlanke Formen (Figg. 31 und 32, Taf. VIII).

Die großen schlanken Formen bewegen sich, im hängenden Tropfen beobachtet, äußerst lebhaft. Eine Ortsbewegung tritt aber meistens nicht ein. Mit Giemsa-Lösung färbt sich vor allem das Protoplasma dieser Formen intensiv und zwar bläulich-violett. Bei vielen Exemplaren sieht man — oft nur im Vorderende vorhandene, oft über den ganzen Plasma-leib verlaufende — parallele Streifen (Myoneme), die sich dunkler färben als das dazwischenliegende Protoplasma. Der hinter der Mitte des Plasma-leibes gelegene Hauptkern färbt sich tief rot, ist meistens rund und von kompakter Struktur. Der Blepharoplast ist randständig und färbt sich dunkelviolett, außerdem liegt er dem Hauptkern näher als dem Hinterende; oft hat er eine bohnenförmige Gestalt. In dem dadurch entstehenden Ausschnitt entspringt dann der Randfaden, der sich in vielen Windungen am Plasmaleib entlang zieht und in die Geißel ausläuft. Der Randfaden ist manchmal nicht wellenförmig, sondern zickzackartig gestaltet. Mit dem Trypanosoma ist der Randfaden durch eine gut ausgebildete undulierende Membran verbunden, die ein dünnes, sich durchscheinend gelblich färbendes Plasmahäutchen bildet und am Plasmakörper gerade entlang läuft. Die Geißellänge beträgt ungefähr $\frac{1}{5}$ der Gesamtlänge des Trypanosomas. Das Hinterende desselben läuft fast immer in eine feine Spitze aus, die etwas gekrümmt erscheint. Oft sieht man eine feine rötliche Fibrille als Verlängerung des Randfadens über den Blepharoplasten hinaus nach hinten verlaufen; durch diese mag die Krümmung des Hinterendes bedingt sein.

B. Große breite Formen (Figg. 33 und 34, Taf. VIII).

Diese Formen sind ungefähr ebenso lang wie die oben beschriebenen langen schmalen, unterscheiden sich jedoch von den letzteren zunächst durch die hellere Farbe des Protoplasmas, die hier himmelblau ist; das Protoplasma zeigt oft einen alveolären Bau. Von dem spitzen Hinterende aus verdickt sich der Körper des Trypanosomas allmählich und erreicht meist zwischen Blepharoplasten und Hauptkern die größte Breite, die bis zu 12μ betragen kann; durchschnittlich beträgt sie 5 bis 6μ . Oft ist das Protoplasma, und zwar hauptsächlich vor dem Kern, von sehr vielen Granula erfüllt, die kugelig und etwas kleiner als der Blepharoplast sind und sich wie dieser dunkelviolett färben. Bei starker Lichtquelle nehmen

sie eine leuchtend rote Farbe an. Der Hauptkern ist quer gestellt und füllt oft die ganze Breite des Trypanosomas aus; dagegen pflegt der Längsdurchmesser des Kerns ein sehr geringer zu sein. Oft ist die Mitte des Kerns hellrot gefärbt, während an den Rändern desselben dunkle Chromatinmassen lagern. Der randständige Blepharoplast liegt ungefähr in der Mitte zwischen Hauptkern und Hinterende, oft ersterem etwas näher. Von einer undulierenden Membran ist bei diesen breiten Formen meist sehr wenig zu sehen, man sieht nur den Randfaden, der dem Plasmaleib eng anliegt und häufig in einer großen S-förmigen Schraubenwindung bis zum Geißelansatz verläuft. Die Bewegung dieser Formen im hängenden Tropfen ist nicht besonders stark. Sie ist entweder so, daß sich das Trypanosoma um die eigene Längsachse dreht, oder sie geschieht schnellend. Zu den großen breiten Formen gehört das in einem Blutausstrich von Rind 10 gefundene und auf S. 389 beschriebene Trypanosoma. Die abweichende starke Färbung dieses in Fig. 35, Taf. VIII wiedergegebenen Trypanosomas rührt daher, daß es aus einem nachgefärbten Präparate stammt und bei Tageslicht gezeichnet wurde.

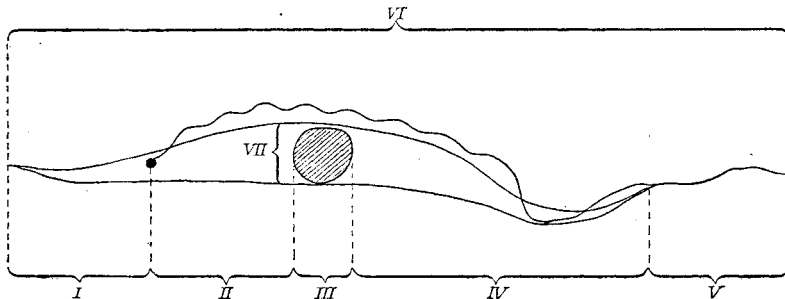


Fig. 2.

- I. Abstand zwischen Hinterende und Blepharoplasten.
- II. Abstand zwischen Blepharoplasten und Hinterende des Hauptkerns.
- III. Länge des Hauptkerns.
- IV. Abstand zwischen dem Vorderende des Hauptkerns und dem Vorderende des Plasmaleibes.
- V. Länge der freien Geißel.
- VI. Gesamtlänge des Trypanosomas.
- VII. Größte Breite des Trypanosomas.

C. Kleine schlanke Formen (Figg. 29 und 30).

Typisch für diese Formen ist zunächst das eigenartig gefärbte Protoplasma, das häufig an die Färbung der roten Blutkörperchen erinnert, oder doch neben blau gefärbten rötlich-bräunliche Stellen aufweist. Der

Hauptkern färbt sich sehr stark und ist in der Längsachse ausgezogen, so daß er oft zweimal so lang wie breit ist. Ein weiterer Unterschied von den anderen Formen liegt darin, daß der Blepharoplast dem Hinterende näher liegt als dem Hauptkern. Der Blepharoplast ist ziemlich groß und zeigt oft eine Einschnürung. Die undulierende Membran ist nicht stark ausgebildet, der Randfaden zeigt nur geringe Windungen. Der Plasmaleib erscheint bei diesen Formen an der Geißelwurzel schärfer von der Geißel abgesetzt. Die Geißel ist ziemlich lang, sie beträgt $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ der Gesamtlänge des Trypanosomas. In den gefärbten Präparaten ist das Hinterende solcher Formen meist stark hakenförmig gekrümmt. Die Länge der kleinen schlanken Formen beträgt etwa 39 μ . Im lebenden Zustande zeigen diese Trypanosomen eine sehr große Beweglichkeit.

Über die Größenverhältnisse der drei Formen geben genaue Messungen die beste Übersicht. Ich habe deshalb annähernd 200 Trypanosomen gemessen. Hierzu wurde das von Lingard vorgeschlagene Schema (siehe S. 397) verwendet.

a) Große schlanke Formen.

I	II	III	IV	V	VI	VII
12	10	2	24	14	62	2.4
13	8	2	22	12	57	2.2
10	8	2	18	12	50	3
17	10	2.4	26	13	68.4	3
10	9	2.3	24	13	58.3	2.6
10	8	2	26	10	56	2.4

Der Durchschnitt von 75 Exemplaren ergibt folgende Zahlen:

11.50	8.68	2.21	23.26	11.36	57.01	2.41
-------	------	------	-------	-------	-------	------

b) Große breite Formen.

I	II	III	IV	V	VI	VII
8	9	3	30	10	60	6
8	10	2.5	24	8	52.5	7
10	9	2.4	24	10	55.4	5
9	11	2	34	10	66	12
12	6	2	27	10	57	7
10	8	2.2	26	10	56.2	4

Durchschnitt von 65 Exemplaren:

9.51	8.78	2.29	23.42	10.48	54.48	5.91
------	------	------	-------	-------	-------	------

c) Kleine schlanke Formen.

I	II	III	IV	V	VI	VII
4	5	2.4	12	7	30.4	1.7
6	6	2.8	14	10	38.8	2
4	9	2.4	14	10	39.4	2
6	6	2.4	16	16	46.4	1.6
3	4	2	9	9	27	2
4	6	2.2	12	12	36.2	2

Durchschnitt von 61 Exemplaren:

4.93	6.27	2.28	14.17	11.42	39.07	2.09
------	------	------	-------	-------	-------	------

Zusammenstellung.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Große schlanke Formen .	11.50	8.68	2.21	23.26	11.36	57.01	2.41
Große breite „ .	9.51	8.78	2.29	23.42	10.48	54.48	5.91
Kleine schlanke „ .	4.93	6.27	2.28	14.17	11.42	39.07	2.09

Aus dieser Tabelle, die die absoluten Größenverhältnisse der drei Formen angibt, sind vor allem die Unterschiede in bezug auf Länge und Breite zu ersehen. Will man dagegen den inneren Bau der drei Formen vergleichen, so gibt eine Zusammenstellung, in der die Gesamtlänge aller drei Formen = 100 gesetzt ist, den besten Aufschluß. Eine solche Tabelle ergibt folgende Zahlen:

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Große schlanke Formen .	20.19	15.21	3.87	40.72	20.01	100	4.23
Große breite „ .	17.50	16.11	4.20	42.92	19.27	100	10.82
Kleine schlanke „ .	12.72	16.05	5.82	36.24	29.17	100	5.34

Nach den heutigen Anschauungen über verschiedene bei einer Trypanosomenart vorkommende Formen kann man annehmen, daß es sich hier um einen Geschlechtstrimorphismus handelt, und zwar wären die in der Mehrzahl vorhandenen stark beweglichen, großen schlanken Formen, die sich intensiv färben, vielleicht als indifferente Formen anzusehen, während die beiden anderen Formen für Geschlechtsformen zu halten wären. Von diesen sind die hellblau gefärbten, großen breiten Formen mit alveolärem Bau; die sich wegen der nur sehr schwach ausgebildeten undulierenden Membran und ihrer Breite nicht besonders gut bewegen können, dann als weibliche Individuen anzusehen. Auch das Auftreten

von Granula in ihnen spricht dafür, ebenso wie die Tatsache, daß gerade sie es vor allem sind, die sich in Blutbouillonkulturen vermehren. Gegen die Annahme, daß es sich bei den großen breiten Formen um absterbende Individuen handeln könnte, spricht die soeben erwähnte Tatsache, daß sie sich einige Zeit nach der Blutentnahme sowohl in Blut als auch besonders in Blutbouillonkulturen sehr lebhaft zu teilen beginnen, wovon im nächsten Kapitel die Rede sein soll. Die schwach gefärbten kleinen schmalen Formen wären wegen des großen sehr chromatinreichen Kerns und Blepharoplasten und auch wegen der lebhaften Beweglichkeit als männliche Formen anzusehen.

8. Verhalten der gefundenen Trypanosomen in Blutbouillonkulturen.

Die Trypanosomen verhalten sich in Blutbouillonkulturen folgendermaßen:

In den ersten Stunden nach dem Anlegen der Kultur sieht man zunächst bei den großen breiten Formen eine Verkürzung des Längendurchmessers und eine zunehmende Verbreiterung. Hierbei stumpft sich das bis dahin spitze Hinterende ab. Dann beginnt das Individuum, sich zu teilen, was nach 8 bis 12 Stunden zu geschehen pflegt. Diese Teilung ist in den meisten Fällen eine ausgesprochene Querteilung. Zunächst teilt sich der Blepharoplast, nachdem er sich dem Hauptkern bedeutend genähert hat. Von den beiden Blepharoplasten liegt derjenige, welcher an der Geißel bleibt, dem Hauptkern am nächsten, während der andere weiter nach hinten liegt und anfängt, eine neue Geißel zu bilden, die frei seitwärts aus dem Plasmaleibe hervorragt, nie eine undulierende Membran hat und auch nie die Länge der anderen Geißel, d. h. der Geißel des Mutterindividuums, erreicht. Zugleich mit der Bildung der neuen Geißel pflegt sich der Hauptkern mittels Durchschnürung zu teilen. Die beiden Kerne sind noch einige Zeit hindurch miteinander durch eine dünne fadenförmige Spindel verbunden. Sie lagern sich hintereinander. Von den neuen Kernen liegt der eine entweder vor oder neben demjenigen Blepharoplasten, der an der Hauptgeißel sitzt, während der andere sich so weit nach hinten lagert, daß er schließlich hinter dem zweiten Blepharoplasten liegt. Dann erfolgt die Durchschnürung des Plasmakörpers, die sich zunächst durch einen hellen Streifen andeutet, der quer über das Trypanosoma geht.¹ Nach vollständiger Trennung voneinander beginnen nun die beiden selbständigen Individuen eine lebhafte Teilung,

¹ Weil es sich bei der Querteilung von Trypanosomen um einen sehr interessanten und teilweise immer noch bestrittenen Vorgang handelt, sind in Taf. VIII, Figg. 36 bis 38 drei derartige Formen abgebildet.

wobei die Geißel des ursprünglichen Trypanosomas immer einem Individuum verbleibt und durch ihre bedeutende Länge sofort zu erkennen ist (Taf. VIII, Fig. 39). 24 Stunden nach dem Anlegen der Kultur sieht man zuweilen 8, oft noch mehr kleine Flagellaten, die alle aus einem Trypanosoma hervorgegangen sind, zusammenliegen. Die so entstandenen crithidienähnlichen Flagellatenformen vermehren sich durch Längsteilung, wenn sie gestreckt sind und eine kleine undulierende Membran haben oder aber durch einfache Durchschnürung, wenn sie rundlich sind (Taf. VIII, Figg. 40 u. 41). Nie zeigen die auftretenden Formen ein so spitzes Hinterende, wie es bei den Kulturflagellaten die Regel ist, auch ist die Geißel bei ihnen niemals geknüpft. Die Kulturformen der Trypanosomen sind fast immer mit feinen rötlichen Granula im Protoplasma versehen, außerdem kann man bei ihnen oft, und zwar hauptsächlich vor dem Blepharoplasten, Vakuolen bemerken.

Am ersten, spätestens am zweiten Kulturtage hört die Vermehrung der entstandenen Flagellaten auf. Dieselben halten sich zwar noch einige Tage — ich habe sie spätestens am 12. Tage auffinden können —, degenerieren aber vollständig. Sie nehmen eckige, unregelmäßige Formen an, bewegen sich gar nicht mehr oder äußerst schwach und färben sich sehr schlecht.

An Stelle der Zweiteilung der ursprünglichen Trypanosomen kann man zuweilen auch Vierteilung beobachten, wobei dann die Tochterzellen kleeblattartig zusammenhängen.

Zu der Bildung von Kulturformen tragen nicht alle drei oben beschriebenen Trypanosomenformen in gleichem Maße bei, sondern die weitaus meisten Kulturformen gehen aus den großen breiten Trypanosomen hervor. Die großen schlanken Formen sind nur in geringem Grade daran beteiligt, die kleinen schlanken Formen scheinen überhaupt nicht daran teilzunehmen, ich habe jedenfalls nie Stadien gefunden, die sich auf diese Formen zurückführen ließen. Dazu kommt, daß man die kleinen schlanken Formen in den Kulturen verhältnismäßig häufig und in ihrer typischen Gestalt antrifft; so sah ich z. B. eine solche Form noch am 5. Tage in lebhafter Bewegung.

Die Kulturformen der Trypanosomen können auch in defibriniertem, steril aufbewahrttem Blut beobachtet werden, allerdings nicht in so großer Anzahl und nicht so lange, wie in Blutbouillonkulturen. Sobald die Trypanosomen im Blute nicht mehr färberisch nachweisbar sind, treten auch in Blutbouillonkulturen keine Kulturformen mehr auf.

Daß diese Trypanosomen auch auf anderen Nährböden Kulturformen bilden können, zeigen die Untersuchungen von K. Behn (18), dem es gelang, dieselben auf Rinderblutagar zu züchten.

9. Besteht ein Zusammenhang zwischen den gefundenen Trypanosomen und den sogenannten Kulturflagellaten?

Stellen wir die bei den Kulturflagellaten und die bei den Trypanosomen gewonnenen Resultate einander gegenüber, so ergibt sich folgendes:

1. Die noch nicht genauer bekannten Blutparasiten, die in Blutbouillonkulturen die Kulturflagellaten entstehen lassen, können im Blute von Rindern verschieden lange, sogar $\frac{1}{2}$ Jahr lang ununterbrochen (s. Versuch IV) vorhanden sein, so daß während der ganzen Zeit durch Blutbouillonkulturen Flagellaten nachzuweisen sind. Während der Zeit, in der Kulturflagellaten auftreten, sind im Blut der betreffenden Rinder der Regel nach keine Trypanosomen zu finden. Eine Ausnahme bildet allerdings der auf Seite 389 beschriebene Fund eines Trypanosomas bei einem Rinde, bei dem sich gleichzeitig Kulturflagellaten nachweisen ließen. Da dieser Befund aber ganz vereinzelt dasteht, kann er sehr wohl auf eine Mischinfektion zurückgeführt werden.

Die Trypanosomen dagegen sind nur in einer bestimmten Zeit nachzuweisen, deren Grenze ungefähr zwischen dem 4. und 20. Tage nach der künstlichen Infektion liegt. Nur während dieser Zeit, d. h. nur so lange, als Trypanosomen gefunden werden können, treten in den Blutbouillonkulturen die oben beschriebenen Kulturformen der Trypanosomen auf. Nachher sind, trotzdem das Blut der Kälber infektiös bleibt, in Blutbouillonkulturen nie wieder Flagellaten zu beobachten. Es gelingt auch nicht, Kälber, die einige Zeit vorher mit diesen Trypanosomen infiziert wurden, von neuem dergestalt zu infizieren, daß wiederum Trypanosomen und demgemäß in Blutbouillonkulturen Kulturformen der Trypanosomen auftreten.

2. Bei den Kulturflagellaten sind präflagellate, zum Teil endoleukocytaire Formen zu finden. Die ersten geißeltragenden Formen sind — und zwar in äußerst geringer Anzahl — frühestens nach 42 Stunden nachweisbar. Zwischen dem 6. und 10. Kulturtag kommt es zu einer Vielteilung, bei der typische Flagellaten von Chrithidienform, deren Geißel geknöpft und deren Hinterende zugespitzt ist, auftreten. Die Kulturflagellaten halten sich in den Kulturen sehr lange; sie ließen sich beispielsweise noch in 6 Monate alten Kulturen nachweisen.

Im Gegensatz zu den eigentlichen Kulturflagellaten können bei den Kulturformen der Trypanosomen nie Formen beobachtet werden, die als präflagellate Formen anzusprechen sind. Die ersten in Blutbouillonkulturen aus Trypanosomen hervorgehenden Flagellatenformen, deren Geißeln nie geknöpft sind, treten bereits während des 1. Kultur-

tages auf. Unter diesen sind immer solche zu finden, die durch sehr lange Geißel und stark ausgebildete undulierende Membran auf ihre direkte Abstammung von einem Trypanosoma hindeuten. Zur Ausbildung einer typischen Form, wie bei den Kulturflagellaten, kommt es nicht; es treten allerdings crithidienähnliche Formen auf, die aber in Größe und Bau ziemlich variieren. Die Vermehrung der Kulturformen der Trypanosomen hört am 2. Tage bereits auf. Von dieser Zeit an degenerieren dieselben und gehen spätestens bis zum 12. Kulturtage zugrunde.

3. Die sogenannten Kulturflagellaten gelangen in aufbewahrtm defibriniertem Blute nicht zur Entwicklung. Bei den Kulturformen der beschriebenen Trypanosomen ist dies jedoch der Fall.

Aus dieser Gegenüberstellung dürfte deutlich hervorgehen, daß zwischen den Kulturflagellaten und den Kulturformen der Trypanosomen sehr erhebliche Unterschiede nicht nur morphologischer, sondern auch biologischer Art bestehen. Wenn auch z. B. der Fund eines Trypanosomas bei dem Rinde Nr. 10, bei dem sich während der betreffenden Zeit Kulturflagellaten nachweisen ließen, und auch das Resultat von Übertragungsversuch IV dafür zu sprechen scheinen, daß ein Zusammenhang zwischen dem Rindertrypanosoma und den Kulturflagellaten besteht, so muß doch in Betracht gezogen werden, daß in diesen Fällen sehr wohl eine Mischinfektion bestanden haben kann. Es ist sehr gut denkbar, daß eine der vier Kühe, deren Blut dem Kalb 11 injiziert wurde (vgl. Übertragungsversuch IV) mit Trypanosomen infiziert war und diese auf Kalb 11 übertragen hat. Für diese Annahme spricht der Ausfall von Übertragungsversuch VI. Es ist nämlich ziemlich unverständlich, warum bei Kalb 13 keine Trypanosomen auftraten, trotzdem es mit Blut derselben vier Kühe des Rassestalles geimpft wurde und diese alle in Blutbouillonröhrchen Kulturflagellaten ergaben, während bei Übertragungsversuch IV nur drei derselben solche Flagellaten gezeigt hatten. Daß Kalb 13 nicht resistent war, bewies ein später gelungener Infektionsversuch.

Aus allen bisherigen Ausführungen kann man ersehen, daß für die Zusammengehörigkeit von Trypanosomen und Kulturflagellaten keine einwandfreien Beweise zu erbringen sind. Alle Versuche können dagegen dahin gedeutet werden, daß es sich um verschiedenartige Erreger handelt. Diese Annahme wird insbesondere durch die morphologischen Untersuchungen gestützt.

Ich komme somit zu dem Schlusse, daß die bei Rindern kulturell nachweisbaren Flagellaten nicht aus Trypanosomen hervorgehen. Auf

Grund der in den ersten Kulturtagen auftretenden präflagellaten Formen könnte man vermuten, daß die in Blutbouillonkulturen sich entwickelnden Flagellaten im Blute der betreffenden Rinder als sehr kleine, geißellose, vielleicht endolenkozytäre Parasiten vorhanden sind.

10. Stellt dieses Rindertrypanosoma eine neue Art dar?

Das von mir gefundene Trypanosoma habe ich nur mit den in Deutschland bisher beobachteten Rindertrypanosomen verglichen.

Hier kommt vor allem als Vergleichsobjekt das Trypanosoma franki in Betracht, über das morphologische Studien vorliegen. Schon aus einem oberflächlichen Vergleich des oben beschriebenen Trypanosomas mit dem Trypanosoma franki ersieht man jedoch, daß beide nicht identisch sind. Bezüglich der Größen- und Breitenverhältnisse der beiden Trypanosomenarten bestehen nämlich ganz bedeutende Abweichungen.

Knuth (6) unterscheidet beim Trypanosoma franki drei der Größe nach verschiedene Formen und gibt für diese folgende Durchschnittszahlen an:

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Große Exemplare . . .	5	7	3.5	16	8	39.5	2
Mittelgroße Exemplare . .	4.59	6.09	3.16	10.36	6.27	30.30	2.13
Kleine Exemplare . . .	3	5	3.4	6.7	3	21.1	2

Die oben beschriebenen Trypanosomen haben dagegen folgende Maße:

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Große schlanke Formen .	11.50	8.68	2.21	23.26	11.36	57.01	2.41
Große breite „ .	9.51	8.78	2.29	23.42	10.48	54.48	5.91
Kleine schlanke „ .	4.93	6.27	2.28	14.17	11.42	39.07	2.09

Ob das Trypanosoma mit den von Stockman und Schmitt beschriebenen Trypanosomen identisch ist, läßt sich wegen der kurzen und in mancher Beziehung unvollständigen Beschreibung dieser Autoren nicht mit Sicherheit feststellen.

Von anderen ähnlichen Trypanosomenarten, z. B. Trypanosoma theileri, scheint sich das von mir aufgefundene Trypanosoma vor allem durch das Auftreten von drei differenten Formen, seine Züchtbarkeit auf Blutagar und die Entwicklung von Kulturformen in Blutbouillon und defibriertem Blut, die von Theiler bisher wenigstens nicht beschrieben worden sind, zu unterscheiden.

11. Schlußfolgerungen.

1. Die bei Rindern kulturell nachweisbaren Flagellaten gehen nicht aus Trypanosomen hervor.

2. Es gelang, bei den Kulturflagellaten präflagellate Stadien — zum Teil als endoleukozytäre Formen — nachzuweisen.

3. Als Überträger des Blutparasiten, der die Kulturflagellaten hervorruft, dürfte *Stomoxys calcitrans* in Betracht kommen.

4. Eine Infektion von Kälbern durch positive Blutbouillonkulturen oder Blut solcher Rinder, die Kulturflagellaten ergaben, dergestalt, daß in Blutbouillonkulturen der Impflinge wiederum typische Kulturflagellaten nachgewiesen werden könnten, gelang nicht. Vielleicht liegt dies daran, daß Kälber gegen die Infektionen immun sind; es konnten nämlich bei Kälbern niemals Spontaninfektionen beobachtet werden.

5. Dagegen gelang es, bei Versuchen dieser Art ein Rindertrypanosoma zu entdecken, das sich durch seine Größe und Breite auszeichnet und bei dem man drei verschiedene Formen, nämlich große schlanke, große breite und kleine schlanke Formen, unterscheiden kann; es stellt anscheinend eine neue Art dar. Dieses Trypanosoma bildet in defibriniertem, einige Zeit aufbewahrtem Blut und vor allem in Blutbouillon erithridienähnliche Kulturformen, die sich aber von den eigentlichen Kulturflagellaten wesentlich unterscheiden.

6. Das neu entdeckte Trypanosoma läßt sich auf Kälber leicht übertragen. Kälber, die einmal infiziert wurden, bleiben auch nach dem Verschwinden der Trypanosomen aus der Blutbahn noch mehrere Monate lang infektiös. Bei den Infektionen mit diesem Trypanosoma wurden bei den geimpften Kälbern außer geringgradigem Fieber keine Krankheitserscheinungen wahrgenommen.

Literatur.

1. Weber, *Beihefte zum Archiv f. Schiffs- u. Tropenhygiene*. Bd. XIII. S. 143.
2. Schaudinn (1904), Generations- und Wirtswechsel bei Trypanosoma und Spirochäte. *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*. Bd. XX. S. 387—439.
3. Frank, Über den Befund von Trypanosomen bei einem in Stein-Wingert (Westerwald, Reg.-Bez. Wiesbaden) verendeten Rinde. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten der Haustiere*. 1908/09. Bd. V. S. 313—315.
4. Frank und Frosch, Über die Bedeutung des Befundes rinderpathogener Trypanosomen in Deutschland. *Ebenda*. 1908/09. Bd. V. S. 330—334.
5. Frosch, Ätiologische Ermittlungen über das Trypanosoma Frank. *Ebenda*. 1908/09. Bd. V. S. 316—329.
6. Knuth, Über die Morphologie des Trypanosoma Frank. *Ebenda*. 1909. Bd. VI. S. 39—45.
7. Stockman, Preliminary Note on a Trypanosome of British Cattle. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1910. Vol. XXIII. Part. 2.
8. Schmitt, Zum Vorkommen von Trypanosomen vom Typus des Trypanosoma theileri in deutschen Rindern. *Berliner tierärztl. Wochenschrift*. 1910. Nr. 44.
9. Knuth u. Rauchbaar, Weitere Nachforschungen nach Trypanosomen beim Rinde im Kreise Westerwald nebst einem Beitrage zur Kenntnis der in deutschen Stechfliegen (Spezies: Tabanus und Haematopota) parasitierenden Flagellaten. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten der Haustiere*. 1910. Bd. VIII. S. 140—154.
10. Miyajima (1907), On the cultivation of a bovine piroplasma. *Philippine Journ. Sc. B. Manila Med. Sc.* v. 2, May. p. 83—92. pls. 1—3. figs. 1—12.
11. E. Martini, Über die Entwicklung eines Rinderpiroplasmas und -trypanosomas im künstlichen Nährboden. *Diese Zeitschrift*. Bd. LXIV. S. 385—410.
12. Crawley, Trypanosoma Americanum n. sp. a Trypanosome, which appears in cultures made from the blood of American Cattle. *Journ. of Trop. Veter. Sc.* 1910. V. p. 295—308.
13. Knuth, Rauchbaar und Morgenstern, Nachweis von Trypanosomen beim Rinde im Kreise Oberwesterwald mittels Züchtung in Blutbouillon. *Berliner tierärztl. Wochenschrift*. 1910. Nr. 27.
14. Knuth und Rauchbaar, Zum Vorkommen von Trypanosomen bei Rindern in Deutschland. *Ebenda*. 1910. Nr. 31.
15. P. Behn, Präflagellate Entwicklungsstadien der in deutschen Rindern kulturell nachweisbaren Trypanosomen. *Ebenda*. 1910. Nr. 46.
16. Derselbe, Über Entwicklungsformen des Trypanosoma franki. *Ebenda*. 1910. Nr. 42.
17. Derselbe, Infektion eines Kalbes mit Trypanosomen vom Typus des Trypanosoma theileri mittels Blut von Kühen, in denen nur kulturell Flagellaten nachweisbar waren. *Ebenda*. 1910. Nr. 50.
18. K. Behn, Wachstum von Bluttrypanosomen aus deutschen Rindern auf Blutagar. *Ebenda*. 1911. Nr. 17.

Erklärung der Abbildungen.

(Taf. VII u. VIII.)

Tafel VII.

Figg. 1 bis 24 Kulturflagellaten.

- Figg. 1 bis 3. Endoleukozytäre Stadien.
Figg. 4 bis 6. Geißellose Formen aus sehr jungen Kulturen.
Fig. 7. Birnförmiger Flagellat.
Fig. 8. Reifenform.
Fig. 9. Kulturform in Längsteilung.
Figg. 10 und 11. Multiple Teilung.
Figg. 12 und 13. In der Streckung begriffene Formen.
Fig. 14. Typischer Kulturflagellat (Crithdienform).
Fig. 15. Zwei mit dem Hinterende noch verwachsene Kulturflagellaten.
Figg. 16 bis 24. Formen aus älteren Kulturen.
Fig. 17. Kulturflagellat mit drei hintereinander liegenden Hauptkernen.
Figg. 18 und 19. Kleine, sehr bewegliche chromatinreiche Formen.
Figg. 21 und 22. Kaulquappenähnliche Formen.
Fig. 23. Kulturflagellat mit typischer Trypanosomenform.
Fig. 24. Form mit keulenartig verdicktem Vorderende.
-

Tafel VIII.

Figg. 25 bis 35 Trypanosomen aus der Blutbahn.

- Fig. 25. Trypanosoma, bei dem der Blepharoplast dicht vor dem Hauptkern liegt.
Fig. 26. Blepharoplast dicht hinter dem Hauptkern.
Figg. 27 und 28. Teilungsformen.
Figg. 29 und 30. Kleine schlanke Formen.
Figg. 31 und 32. Große schlanke Formen.
Figg. 33 und 34. Große breite Formen.
Fig. 35. Das bei Rind 10 gefundene Trypanosoma. [Die starke Färbung rührt daher, daß das Trypanosoma aus einem nachgefärbten Präparat stammt und bei Tageslicht gezeichnet wurde, im Gegensatz zu allen anderen Bildern, die bei Gaslicht gezeichnet wurden.]

Figg. 36 bis 41 Kulturformen der Trypanosomen.

Figg. 36 bis 38. Querteilung von Trypanosomen.

Fig. 39. Vollendete Teilung in vier Flagellaten.

Figg. 40 und 41. Kulturformen bei der Teilung.

Die mit Hilfe eines Zeichenapparates unter Verwendung des Apochromaten und des Kompensationsokulars 6 des Zeiss'schen Mikroskops angefertigten Zeichnungen sind das Werk des Hrn. Kunstmalers M. Landsberg. Sie stellen eine genaue Wiedergabe der mikroskopischen Bilder dar.

