S. (VON) PROWAZEK
TASCHENBUCH
DER MIKROSKOPISCHEN TECHNIK
DER
PROTISTENUNTERSUCHUNG

DRITTE AUFLAGE
VOLLSTÄNDIG NEU BEARBEITET
VON
V. JOLLOS

LEIPZIG
JOHANN AMBROSIOUS BARTH

QL

369

P 83

2.4
A

MBL/WHOI

0 0301 0015913 3

P 89
3

TASCHENBUCH
der mikroskopischen Technik
der
PROTISTEN=
UNTERSUCHUNG

VON
S. (VON) PROWAZEK †

DRITTE AUFLAGE
VOLLSTÄNDIG NEU BEARBEITET VON
DR. V. JOLLOS

1 9 2 2

LEIPZIG, JOHANN AMBROSIVS BARTH

Alle Rechte,
insbesondere das der Übersetzung,
vorbehalten.

TASCHENBUCH
der mikroskopischen Technik
der
PROTISTEN=
UNTERSUCHUNG

VON
S. VON PROWAZEK †

DRITTE AUFLAGE
VOLLSTÄNDIG NEU BEARBEITET VON
DR. V. JOLLOS

1 9 2 2

LEIPZIG, JOHANN AMBROSIIUS BARTH

Alle Rechte,
insbesondere das der Übersetzung,
vorbehalten.

Vorwort zur 1. Auflage.

Das vorliegende Taschenbuch ist in erster Linie für den Mediziner bestimmt. Daher fanden bei der Zusammenstellung der technischen Hilfsmittel zunächst die pathogenen Protozoen Berücksichtigung, ohne daß dabei die anderen Protozoen vernachlässigt worden sind. Bezüglich der frei lebenden Protisten gelten zu meist dieselben Vorschriften, die in der allgemeinen Zytologie üblich sind und die in dem Buche „Grundzüge der mikroskopischen Technik für Zoologen und Anatomen“ von Lee und Mayer in vortrefflicher Weise behandelt werden; das Buch fehlt wohl auf keinem zoologischen Arbeitstisch. Wo die technischen Angaben nicht ausführlich und genau genug angeführt worden sind, dürfte diese Unterlassung nicht in allen Fällen dem Autor zur Last gelegt werden, vielmehr sind die Angaben oft in den verschiedenen Publikationen nur unvollkommen enthalten und wurden so wenigstens in ihrer fragmentarischen Form, soweit sie wichtig zu sein schienen, benutzt.

Batavia-Pegansaan, Oktober 1906.

Der Verfasser.

Vorwort zur 3. Auflage.

Die dritte Auflage bringt eine völlige Neubearbeitung des Taschenbuches. Die allgemeine Anlage ist zwar nach Möglichkeit beibehalten und auch der Umfang nicht wesentlich vergrößert worden; innerhalb der einzelnen Kapitel konnte aber nur verhältnismäßig wenig vom alten Texte übernommen werden, sollte das Büchlein den heutigen Stand der Untersuchungstechnik wiedergeben und es dabei auch dem Anfänger ermöglichen, sich in die Protistenforschung einzuarbeiten.

Neben den Bedürfnissen des Mediziners sind jetzt auch die Anforderungen des Zoologen durch etwas eingehendere Behandlung auch der frei lebenden Protozoen stärker berücksichtigt, neben der Fixierungs- und Färbetechnik auch die immer mehr an Bedeutung gewinnende Kultur der Protozoen ausführlicher behandelt worden. Zu den mannigfachen Streitfragen über die systematische Einteilung der Protozoen Stellung zu nehmen, erschien bei dieser rein praktischen Zwecken dienenden Darstellung nicht angebracht. Daher wurde das alte bekannte System im wesentlichen beibehalten.

Berlin-Dahlem, Sommer 1921.

Victor Jollos.

Inhalt.

	Seite
Die mikroskopische Ausrüstung	1
Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen .	2
Untersuchung lebender Protozoen	8
Fixieren und Färben	13
A. Fixierung mit Sublimatalkohol	15
B. Fixierung mit Pikrin-Essigsäure	16
C. Fixierung mit Chromosmiumessigsäure	16
I. Rhizopoda	23
1. Amöbina	23
2. Thekamöebina	35
3. Foraminifera	36
4. Heliozoa	37
5. Radiolaria	39
II. Flagellata	40
1. Frei lebende Flagellaten	40
2. Parasitische Flagellaten	44
III. Sporozoa	53
1. Haemosporidia	53
2. Coccidiida	61
3. Gregarinida	63
IV. Amoebosporidia	65
1. Cnidosporidia	65
2. Sarkosporidia	67
V. Ciliata	68
Anhang	78
I. Spirochäten	78
II. „Chlamydozoa“	89
Register	94

37425

Die mikroskopische Ausrüstung.

Eingehendere Untersuchungen an Protozoen verlangen eine wesentlich genauere Beobachtung und feinere Ausnutzung der technischen Hilfsmittel, als es bei histologisch- oder bakteriologisch-mikroskopischen Arbeiten meist erforderlich ist. Bei der Wahl des Instrumentariums, besonders des Mikroskopes, muß dies von vornherein berücksichtigt werden.

Den höchsten Anforderungen des Forschers auf diesem Gebiete genügt das große Mikroskopstativ von Zeiß mit Beleuchtungsapparat nach Abbé, beweglichem Objektisch, Kreuztisch und den Apochromatobjektiven 16 mm (Apert. 0,30), 8 mm (Apert. 0,65) und 2 mm (Apert. 1,30) homogene Immersion; dazu die Kompensationsokulare 4, 6, 8, 12, 18. Für die meisten — besonders für nur diagnostische — Untersuchungen kommt man jedoch auch mit den billigeren Stativen von Leitz oder Winckel und den achromatischen Objektiven Aa, DD, $\frac{1}{12}$ " Immersion von Zeiß, bzw. 3, 7, $\frac{1}{12}$ " Immersion von Leitz aus. Auch mit diesen Objektiven kann man sich der zuvor genannten Kompensationsokulare bedienen.

Erwünscht ist ferner ein Dunkelfeldbeleuchtungsapparat, am besten der Apparat von Leitz oder auch der Kardioidspiegelkondensor von Siedentopf (Zeiß).

Besonders für diagnostische Zwecke (Spirochäten-nachweis) ist der Dunkelfeldapparat kaum noch zu entbehren.

2 Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen.

Für das Präparieren feiner Objekte, wie Mücken, Fliegen, Zecken u. a., ist eine binokuläre Lupe von Zeiß empfehlenswert.

Gute Dienste für Untersuchungen mancher lebender Parasiten — z. B. Malariaerreger oder Dysenterieamöben — leistet ein heizbarer Objektisch.

Zum genauen Zeichnen der mikroskopischen Präparate, besonders für Publikationen, ist der Abbésche Zeichenapparat zu empfehlen, bei dem durch Brechung und Reflexion durch Spiegel und Prismen gleichzeitig das Bild des Zeichenpapiers, das auf einem Zeichentisch oder Zeichenkasten in der Höhe des Objektisches des Mikroskopes angebracht ist, und des Objektes sichtbar gemacht wird. Man braucht dann bloß bei entsprechender Abblendung mit einem harten, scharf gespitzten Bleistift die Konturen des sichtbaren Objektes nachzuzeichnen. Zum Messen der Objekte wird ein Okularmikrometer, zum Markieren bestimmter Stellen von Präparaten der Markierapparat von Winkel (Göttingen) benutzt.

Gebraucht werden endlich Glassachen (Deckgläschen, Objektträger, hohlgeschliffene Objektträger, Färbegläser u. a.), Präparierinstrumente (Scheren, Skalpelle, Pinzetten, Präpariernadeln u. a.) und Zeichenutensilien wie bei jedem mikroskopischen Arbeiten.

Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen.

Bei der Untersuchung der Protozoen kommt es nicht so sehr auf eine Anwendung von komplizierten Färb- und Untersuchungsmethoden als auf eine zweckmäßige Ausnutzung der optischen Instrumente (Irisblende, Kondensor usw.) an. In erster Linie muß man stets

sehr eingehend das lebende Objekt untersuchen. Erst, wenn dieses nach allen Richtungen hin geschehen ist, möge man an die Betrachtung des toten, gefärbten Objektes herantreten.

Als Objektive sind für die Betrachtung der Protozoenpräparate zunächst in der Mehrzahl der Fälle das schwache Objektiv, Apochromat 8 mm bzw. die schwachen achromatischen Objektive (Aa-Zeiß oder 3-Leitz), dann das Immersionsobjektiv 2 mm (homog. Immersion) von besonderer Wichtigkeit. Gute Dienste leistet aber auch das mit einer Deckglaskorrektur versehene, starke Trockensystem Apochromat 3 mm (Apert. 0,95). Kleine Objekte sucht man am bequemsten zuerst mit einem schwachen Trockensystem und starken Okular (Komp. ok. 8—12) auf.

Bei der Immersionslinse bringt man zwischen die Frontlinse und das Deckglas einen kleinen Tropfen Zedernöl (Ol. ligni Cedri $n_s = 1,515$ bei 18°C „homogene Immersion“), wodurch eine Brechung der Strahlen an der unteren Linsenfläche vom Einfallslot vermieden wird und die Lichtstrahlen, die sonst beim Übergang aus dem Deckglas in die Luft gebrochen und unausgenutzt bleiben würden, in das Objekt insgesamt einzudringen vermögen. Im Gegensatz zu den Trockensystemen erreichen wir auf diese Weise einen Strahlenkegel mit einem größeren Öffnungswinkel. Bei der Einstellung des Immersionssystems bringt man zunächst durch Senken des Tubus die Linse mit der Kuppe des Zedernöltropfens in Kontakt und versucht durch vorsichtige Handhabung des Triebrades ein eben noch sichtbares, verschwommen angedeutetes Bild von dem betreffenden Objekt zu erhalten. Die feinere Einstellung wird durch die Mikrometerschraube besorgt. Nach der Untersuchung entfernt man jedesmal sehr vorsichtig mit einem, mit Benzin oder Xylol getränkten, weichen Lappen (am besten altes, gewaschenes Battist-

tuch) den Öltropfen vom Objektiv. Vom Deckglas wird das Öl durch leichtes Streichen mit einem in Benzin oder Xylol getauchten Pinsel beseitigt. Diese Prozedur muß mit einiger Vorsicht geschehen, da sonst der durch eingedicktes Zedernöl befestigte Deckglasausstrich verschoben wird und sodann eventuelle Kreuztischnotizen unbrauchbar werden.

Von besonderer Wichtigkeit ist der Beleuchtungsapparat nach Abbé, der aus einem Spiegel, einer Irisblende und einem aus einem Linsensystem gebildeten Kondensor besteht. Als Spiegel dient ein Plan- oder Hohlspiegel. Da die meisten Strahlen im Objekt zur Vereinigung kommen, sofern sie die Kondensorlinse parallel treffen, so ist besonders bei den Immersionssystemen ein Planspiegel anzuwenden. Der Hohlspiegel liefert viele konvergente Strahlen, er tritt nur bei größerer Nähe der Lichtquelle in Dienst. Wenn man bei Tageslicht mikroskopiert, ist es zweckmäßig, das Licht von einer weißen Wolke oder von einer entsprechend montierten Mattscheibe aufzufangen. Um das andere Auge (falls es zugänglich ist, soll man mit dem linken Auge mikroskopieren) möglichst zu schonen, ist eine Abblendung des übrigen Lichtes durch eine große, passend angebrachte, schwarze Papptafel anzuraten. Auch kann man durch Einklemmen einer monokelartigen, schwarzen Korkscheibe o. e. ä. in das andere Auge denselben Zweck erreichen. Gute Dienste leistet die plastische Lichtschutzkappe nach Mayer (Firma Lautenschläger).

Bei Anwendung von künstlichem Licht pflegt man zwischen Mikroskop und Lampe eine mit Wasser oder noch zweckmäßiger mit blauer, ammoniakalischer Kupfersulfatlösung gefüllte Schusterkugel anzubringen, die das Licht konzentriert. Als Lichtquelle bewährt hat sich das Gasglühlicht, sowohl die gewöhnliche Auer-Lampe, wie auch das sog. hängende Gasglühlicht.

Besonders empfehlenswert und bequem sind ferner 100kerzige matte Spiraldrahtlampen, speziell auch die Osram-, Azo- oder Nitra-(A.E.G.) Lampen, für Dunkelfelduntersuchungen endlich die kleinen Mikroskopierbogenlampen von Zeiß oder Leitz. Blendendweißes Licht wird durch Einlegen von Mattscheiben oder blauen Glasscheiben gedämpft.

Der Kondensor selbst wird durch ein Linsensystem gebildet, dessen Brennpunkt für parallele Strahlen (Planspiegel) nahe der Objektebene liegt, so daß zu dem Objektiv ein Strahlenkegel mit einem großen Öffnungswinkel kommt. Aus dem hier angedeuteten Grunde ist wegen der verschiedenen Entfernungen der künstlichen Lichtquellen der Beleuchtungsapparat in der Richtung der optischen Achse nach unten oder oben durch Tribschrauben verschiebbar eingerichtet.

Durch Verschiedenheiten im Lichtbrechungsvermögen der einzelnen Teile des Protoplasmas im weitesten Sinne des Wortes entsteht durch Diffraktion der durchgehenden Strahlen das sog. Strukturbild des mikroskopischen Präparates, das gewissermaßen nur aus Linien und verschieden abgestuften Schatten besteht und für dessen Zustandekommen die maximale Beleuchtung überflüssig ist. In diesem Falle pflegt man den Kondensor auszuschalten und bedient sich der Blenden allein. Anders verhält sich dies bei dem Farbenbild, das durch Absorption der durchgehenden Strahlen im Präparat entsteht, und für das eine maximale Beleuchtung nötig ist; — es muß ein möglichst weiter Beleuchtungskegel erzielt werden, daher wird der Beleuchtungsapparat eingeschaltet.

Für das Studium der Protozoen ist eine richtige Ausnutzung des Kondensors, der Blenden — wichtig ist nicht nur die Untersuchung bei verschiedener Öffnungsweite, sondern häufig auch bei verschiedener Schief-

stellung der Blenden! — sowie der Mikrometerschraube eine unerläßliche Vorbedingung. Hierfür gibt es aber keine besonderen Vorschriften, sondern man muß sich diese Fertigkeit durch eine längere Übung aneignen.

Zur schnellen Auffindung und Diagnose von Spirochäten (speziell auch zur Schnelldiagnose von *Spirochaeta pallida*), dann aber auch zum Studium der Bewegungsvorgänge der Protozoen ist der Dunkelfeldapparat ein kaum noch zu entbehrendes Hilfsmittel geworden. Am bequemsten ist der Gebrauch der Spiegelkondensoren, die an Stelle des gewöhnlichen Kondensors des Abbéschen Beleuchtungsapparates in das Diaphragma des Mikroskopes bzw. des Beleuchtungsapparates eingeschoben werden. Mit schwachem Objektiv und Okular stellt man zunächst die in den Dunkelfeldkondensor eingeritzten Kreise scharf ein und zentriert sie genau zum Gesichtsfeldrand. Alsdann bringt man sowohl auf die Oberfläche des Kondensors wie auf die Unterseite des Objektträgers des zu untersuchenden Präparates einen großen Tropfen Zedernholzöl — bei nicht allzu lange dauernden Untersuchungen kann statt des Öles auch reines Wasser genommen werden — und legt den Objektträger vorsichtig, damit keine Luftblasen gebildet werden, so auf, daß sich die beiden Zedernholzöl- (oder Wasser-) tropfen vereinigen und die ganze Kondensoroberfläche überziehen. Betrachtet man alsdann das Präparat zunächst mit schwachem Objektiv und Okular, so sieht man ungefähr in der Mitte einen hellen Fleck, der durch vorsichtiges Heben oder Senken des Kondensors möglichst klein gemacht werden muß. Liegt der helle Fleck nicht in der Mitte des Gesichtsfeldes, so ist er durch entsprechendes Verstellen des Spiegels in die Mitte zu rücken.

Nur bei Befolgung dieser Vorschriften erhält man

ein wirklich klares und scharfes, den Dunkelfeldkondensor voll ausnutzendes Bild. Zu beachten ist ferner, daß die Oberfläche des Kondensors ganz klar und sauber sein muß und daß nicht zu dicke Objektträger, Deckgläser und Präparate verwandt werden. Objektträger und Deckgläser müssen absolut sauber sein (die käuflichen sind daher vor Gebrauch mit Alkohol, noch besser mit einer Mischung von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen, sorgfältig zu reinigen); eine Vorschrift, die übrigens ganz allgemein für die Herstellung von Protozoenpräparaten von Wichtigkeit ist.

Die Beobachtung des Dunkelfeldes erfolgt meist mit starken Trockenobjektiven, Apochromat 3 mm oder Achromat DD von Zeiß bzw. 7 von Leitz. Auch die Immersionslinsen sind gut verwendbar, doch muß man für sie besondere (käufliche) Blenden einfügen. Als Okulare dienen vor allem die Kompensationsokulare 8, 12, 18.

Für die Dunkelfeldbeobachtung ist eine starke Lichtquelle erforderlich, am besten eine kleine Mikroskopierbogenlampe (s. S. 5). Sonst genügen auch 100—150kerzige helle Osram-Azo- oder Nitralampen. Das Licht muß konzentriert auf den Spiegel des Mikroskopes fallen, und zwar wird ausschließlich der Planspiegel benutzt.

Während der Dunkelfeldapparat ursprünglich nur zur Beobachtung lebender, vor allem lebhaft beweglicher Protisten diente, wird er neuerdings nach dem Vorgange von E. Hoffmann auch zur Untersuchung gefärbter Präparate mit Erfolg herangezogen. Erforderlich ist hierbei die Einschaltung einer — auch sonst zur Schonung des Auges bei Verwendung der Bogenlampe sehr angenehmen — halbgeölten Mattscheibe zwischen Lichtquelle und Mikroskop. Bei dieser „Leuchtbild“-untersuchung erscheinen, wahrscheinlich

auf Grund von Polarisation des abgelenkten Lichtes sonst blau gefärbte Teile braun, sonst rot aussehende grün.

Für die Durchmusterung einer größeren Anzahl von Präparaten (z. B. zum Auffinden spärlicher Malariaerreger oder Trypanosomen) ist ein beweglicher Objektstisch sehr erwünscht. Durch zwei bewegliche, zueinander senkrecht stehende Schlitten, die längs einer Noniusskala laufen, kann das Präparat genau durchgesehen, jede einzelne Stelle scharf eingestellt und durch die Nonienindices bezeichnet werden, so daß man sie leicht und rasch wiederfinden kann. Um wichtige Stellen auch auf anderen Mikroskopen leicht wiederzufinden, empfiehlt sich ihre Markierung mit Hilfe des Winckelschen Markierapparates (besonders, wenn es sich um Objektträgerblutausstriche handelt).

Man gewöhne sich von vornherein daran, alle irgendwie bemerkenswerten Befunde zu zeichnen. Gerade die zeichnerische Wiedergabe zwingt besonders den Anfänger zu schärferer Beobachtung und lehrt manche sonst leicht übersehene Einzelheiten erkennen und festhalten. Für den eigenen Gebrauch genügt die unmittelbare Skizzierung des im Mikroskope Gesehenen. Für eine streng objektive Wiedergabe aller Größenverhältnisse, wie sie bei Publikationen zu verlangen ist, muß man sich des Abbéschen Zeichenapparates (s. S. 2) bedienen.

Untersuchung lebender Protozoen.

Die Untersuchung des lebenden Objektes soll, wenn irgend möglich, der Prüfung der abgetöteten und gefärbten Protozoen vorangehen und auch später zur Kontrolle der an gefärbten Präparaten gewonnenen Ergebnisse herangezogen werden.

Bei der Untersuchung lebender Protisten leistet die Methode des hängenden Tropfens gute Dienste. Die

zu beobachtenden Organismen werden mittels einer Kapillarröhre in einem kleinen Tropfen auf die Mitte eines reinen, entfetteten Deckglases gebracht und das derart beschickte Präparat mittels einer Ehrlichschen Pinzette umgekehrt über die eingeschliffene Mulde eines hohlen Objektträgers mit einem luftabschließenden Medium wie Vaseline festgekittet. Der Abschluß dieser feuchten Kammer muß möglichst dicht und genau sein. Bei der Untersuchung benutzt man eine enge Blende und ist bemüht, ein Strukturbild zu gewinnen. Nach dem oben angedeuteten Prinzip ist auch Schulze's feuchte Kammer gebaut, nur daß die Mulde des Objektträgers noch von einem eingeschnittenen rinnenförmigen Ring umgeben ist, der zur Aufnahme von Wasser dient. In manchen Fällen kann man in dieses Wasser noch kleine Grünalgen, wie *Spirogyra* oder *Desmidiaceen*, hineinbringen, die dann im Lichte O abspalten und so die Sauerstoffspannung in der feuchten Kammer regulieren.

Stark bewegliche Objekte werden durch Zusatz von zähflüssigen Medien (Gummi, Gelatine, Agar-Agar und vor allem *Alga Caragaheen*) in ihrer Beweglichkeit behindert und einer bequemerem Beobachtung zugänglich gemacht. Bei Infusorien mit pulsierenden Vakuolen kann man auf diese Weise die Entleerung der Vakuole studieren und den entleerten Flüssigkeitstropfen sogar neben dem Organismus eine Zeitlang beobachten.

Die Lebenduntersuchung von Parasiten erfolgt am besten in der Gewebs- oder Körperhöhlenflüssigkeit ihres Wirtes. Steht solche nicht hinreichend zur Verfügung, so setze man etwas physiologische Kochsalzlösung hinzu. Beim Studium von Warmblüterparasiten (*Malariaerreger*, *Dysenterieamöben* u. a.) empfiehlt sich die Anwendung eines heizbaren Objektisches.

In manchen Fällen werden die lebenden beweglichen Protisten in farbigen Medien beobachtet. Für das

Studium der Gregarinenbewegung z. B. ist die Anwendung von verschiedenen Tuschelösungen zu empfehlen. Certes (Bull. soc. Zool. France 13, 1888, p. 230) wendet eine Lösung von Anilinschwarz, Fabre-Domergue eine konzentrierte Lösung von Diphenylaminblau an (Ann. Microgr. Paris Tome 2, 1889, p. 545).

Bei Verfüttern von Karmin- oder Tuschekörnchen läßt sich bei Infusorien die Aufnahme dieser Körnchen und die Wanderung der Nahrungsvakuolen sehr schön im Leben beobachten. —

Bei der Untersuchung der lebenden Objekte leisten gelegentlich die sog. Vitalfarbstoffe in verschiedenen hohen Verdünnungen (in physiologischer Kochsalzlösung oder Leitungswasser, das allerdings meist alkalisch reagiert) gute Dienste. Unter der großen Menge der bis jetzt erprobten Vitalfarbstoffe wären folgende zu empfehlen:

I. Das zur Gruppe der Eurhodine gehörige Neutralrot, das Ehrlich zuerst in die histologische Technik einführte. Es ist ein von Witt entdeckter, sog. küpnbildender Farbstoff, der in die Zelle aufgenommen und am Ort seiner elektiven Speicherung in eine gefärbte Oxyform übergeführt wird, die je nach dem Farbenton sogar die Alkali- und Säureverteilung im Protoplasma bis zu einem gewissen Grade anzeigt (gelbrot = alkalisch, kirschrot = sauer). Durch Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd oder Spuren von Eisenchlorid kann das Leukoprodukt des Farbstoffes in der Zelle nachgewiesen werden.

Unter dem Einfluß der intramortalen Reduktionen entfärben sich die tingierten Einschlüsse. Es kann jedoch später wieder eine Färbung (Paramäzium) eintreten.

Mit dem Farbstoff färben sich in manchen Protistenzellen die Kerne, besonders in schwach alkalischen Medien (Bikalziumphosphat), und können gelegentlich im gefärbten Zustande sogar den ganzen Teilungsprozeß

durchlaufen. Relativ noch am besten scheinen die Kerne der parasitischen, auf eine geringe O-Spannung abgestimmten Infusorien den Farbstoff anzunehmen. Bei parasitischen Flagellaten können sich auf verschiedenen Entwicklungsstadien die Innenkörper der Kerne (Karyosome bei *Trichomastix* und *Trichomonas*) tingieren.

Außerdem färben sich verschiedene Granulationen, die zu der Verdauung und Assimilation in naher Beziehung stehen und zum Teile Fermentträger sind. In dieser Hinsicht sei besonders auf die auch technisch interessante Arbeit von Nirenstein hingewiesen (Zeitschrift für allgemeine Physiologie, 1905).

Ferner kann man mit dem Farbstoff apoplasmatische Strukturen, die mit Myelinen und Paramyelinien verwandt sind, zur Darstellung bringen. Bei manchen Infusorien färbt sich regionär das zuweilen lokomotorisch stark beanspruchte Protoplasma.

Mit dem Farbstoff kann man ferner alle Etappen der Verdauung in den sog. Nahrungsvakuolen der Ziliaten verfolgen. Wendet man den Farbstoff in höherer Konzentration an, so ist man in der Lage, den Nachweis zu erbringen, daß die kontraktilen Vakuolen (z. B. bei *Paramäcium*) auf gewissen Stadien alkalisch (gelbrot) reagieren.

Trotzdem ist das Neutralrot für die Protistenzellen kein absolut indifferenter Körper. Nach Heinz (Handbuch der experimentellen Pathologie und Pharmakologie) ist es in Verdünnungen von 1 : 800 oder 1 : 1000 für *Paramäzien* giftig. — Man setzt am besten mit einer engen Öse einen kleinen Tropfen der sehr verdünnten, nicht zu alten Neutralrotlösung zu dem Deckglaspräparat hinzu oder läßt einen gleichen Tropfen auf dem Objektträger eintrocknen und setzt später auf die angetrocknete Farbschichte den Tropfen mit den Infusorien dazu.

12 Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen.

II. Dem Neutralrot ähnlich ist das Neutralviolett, nur daß es in stärkeren Lösungen noch giftiger als Neutralrot ist. Metachromasie.

III. Bismarckbraun. Wird in Lösungen von 1:3000 bis 1:30000 benutzt. Es färbt oft das Protoplasma gelblich, vor allem aber verschiedene Granulationen rotbraun.

IV. Methylenblau rectific. (Methylenblau B. X. wird weniger gut vertragen). Ist nach Overton besonders in Cholesterin, Lezithin usw. löslich, färbt jedoch nicht in allen Fällen das Protoplasma, das in letzter Linie eine Lipoidemulsion von Proteinen ist. Färbt postmortal besonders in alkalischen Medien; Zusatz von organischen Säuren verhindert die Färbung. Dasselbe gilt von Azur I.

V. Das von Ehrlich, Ascoli und Levaditi (Journal de Physiologie et de Pathologie générale No. 3, 1901) eingeführte Oxazin Brillantkresylblau. Es färbt manche Granulationen metachromatisch (violett und blau). In manchen Fällen nimmt in der absterbenden Zelle das Karyosom sehr deutlich den Farbstoff an, weshalb es besonders bei Trypanosomenuntersuchungen anwendbar ist.

VI. Rasch färbt das Nilblausulfat und Nilblau-chlorhydrat. Kristallisiert leicht aus.

VII. Für vitale Kernfärbungen empfiehlt schließlich Przesmycki Auramin (1:2000).

VIII. Kongorot (Säurennachweis in Vakuolen).

IX. Dimethylamidoazobenzol (einige Tropfen der alkalischen Lösung zu Wasser; hellgelb; Plasma gelb, manche Nahrungsvakuolen fuchsinrot).

X. Methylorange (Säure rot, Alkali gelb).

XI. Tropäolin OO (gelbe Lösung durch Säuren gelbrotrot, Alkali gelb).

Von anderen Vitalfarbstoffen sei hier noch Dahlia (Certes), verdünnte wässrige Hämatoxylinlösung, Bleu de quinoléine und Cyanin genannt. Certes löst die Farbstoffe (Chinolinblau 1:500000) in Infusorienwasser und wendet sie ganz schwach an. Doppelfärbungen mit Neutralrot und Methylenblau führte zuerst Pausinger, dann Ružička (Zeit. f. wiss. Mikroskopie XXII. Bd. 1905) aus; letzterer zeigte, daß Methylenblau dabei chemisch postmortal färbt, während seine evtl. Färbung der lebenden Zelle auf physikalischer Grundlage beruht, dagegen färbt Neutralrot vital im chemischen Sinne.

Bezüglich der Vitalfärbung sei schließlich noch eine zusammenfassende Bemerkung aus der Arbeit von Fischel (Anatom. Hefte 1901) zitiert: „Das lebende Gewebe nimmt nur basische Farbstoffe auf, saure dagegen nicht, und zwar solche basische Farbstoffe, welche entweder den einfachen Ammoniakrest NH_2 enthalten oder einen solchen, in welchem der Wasserstoff durch ein der fetten Reihe angehöriges Alkoholradikal (Methyl, CH_3 , oder Äthyl, C_2H_5) vertreten ist.“

Fixieren und Färben.

Zur Beobachtung vieler feinerer Strukturen und vor allem auch zum genaueren Studium des Kernes und der Kernteilungsvorgänge müssen die Protozoen abgetötet, fixiert und gefärbt werden.

Die in der Bakteriologie übliche Methode der Anfertigung von Antrocknungsausstrichen, ist nur bei wenigen parasitischen Protozoen (Malariaerreger, Trypanosomen, Spirochäten) und auch dort fast nur zu diagnostischen Zwecken zu verwenden (s. S. 46). Zum Studium des feineren Baues und der Teilung von Protozoen sind Trockenpräpa-

rate unbrauchbar, da beim Antrocknen die Strukturen verzerrt und verändert werden, in um so höheren Maße, je größer und wasserreicher die Protozoen sind. Geeignet sind ausschließlich feucht fixierte und feucht weiterbehandelte Präparate. Angefertigt werden vor allem Ausstrich-, Abklatsch- und Schnittpräparate.

Organ- oder Gewebstückchen werden unmittelbar auf dem Objektträger oder Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette ausgestrichen. Von Darm- oder Körperhöhleninhalt streicht man mit einer (vorher ausgeglühten) Platinöse entnommene Proben, evtl. unter Zusatz von etwas physiologischer Kochsalzlösung aus. In gleicher Weise kann man auch Präparate von Agar- oder Gelatinekulturen anfertigen; doch empfiehlt sich bei Kulturen in der Regel die Herstellung von Abklatschpräparaten: Man legt ein Deckgläschen auf die zu untersuchende Stelle der Agarplatte, drückt es leicht an, läßt es kurze Zeit liegen, um es dann rasch abzuheben und in die Fixierungsflüssigkeit zu bringen.— Blutausstriche (und entsprechend auch Ausstriche anderer eiweißhaltiger Flüssigkeiten) werden in der Weise hergestellt, daß man einen Tropfen des Blutes auf einen Objektträger oder ein Deckgläschen bringt, ihn dann sich längs der Kante eines im schiefen Winkel aufgesetzten geschliffenen Objektträgers (evtl. auch eines zweiten Deckgläschens) ausbreiten läßt und dann mit diesem geschliffenen Objektträger rasch über das ganze Deckgläschen bzw. den ganzen ersten Objektträger auszieht (nicht vor sich herschiebt!).

Ausstriche und Abklatschpräparate müssen so rasch hergestellt werden, daß sie nicht noch vor Übertragung in die Fixierungsflüssigkeit anzutrocknen beginnen.

Für die Anfertigung von Schnitten gelten die Vorschriften der allgemeinen histologischen Technik, also nach dem Fixieren und Auswaschen durchführen durch die Alkoholstufen von steigender Konzentration in

absoluten Alkohol und dann durch Xylol oder Chloroform, Xylol (bzw. Chloroform) + Paraffin in Paraffin. (Näheres ist in den Lehrbüchern der mikroskopischen Technik von Lee und Mayer oder Böhm und Oppel nachzulesen.)

Im folgenden seien zunächst einige der wichtigsten Fixierungs- und Färbeverfahren angegeben, die von jedem Protozoenuntersucher beherrscht werden sollten.

A. Fixierung mit Sublimatalkohol

(nach Schaudinn).

Fixierungsflüssigkeit: Gemisch von $\frac{2}{3}$ konzentrierter wäßriger Sublimatlösung + $\frac{1}{3}$ 96 % igem Alkohol. (Es kommt auf das Mischungsverhältnis nicht genau an; auch Mischungen im Verhältnis 1 : 1 sind brauchbar.) Die noch feuchten Ausstriche oder Abklatschpräparate läßt man zunächst mit der Schicht nach unten in die Fixierungsflüssigkeit fallen, taucht sie dann (mit einer Hornpinzette) unter, dreht sie um und beläßt sie $\frac{1}{2}$ bis 10 Minuten in der Lösung. Gewebs- oder Organstückchen für Schnittpräparate bringt man für $\frac{1}{2}$ —2 Stunden (je nach der Größe und Konsistenz) in den Sublimatalkohol. Nach der Fixierung Auswaschen in 60 % igem Alkohol, mit Zusatz von Jodtinktur und Jodkalium (z. B. Lugolsche Lösung), so daß der Alkohol leicht bräunlich gefärbt ist. Ausstriche und Abklatschpräparate werden 10—30 Minuten, Gewebstückchen 2—12 Stunden im Jodalkohol ausgewaschen, der bei Entfärbung gewechselt werden muß. Nach dem Auswaschen Übertragung in 70 % igen Alkohol, worin längere Aufbewahrung möglich ist, und aus dem dann die Überführung in die verschiedenen Farblösungen erfolgen kann.

Für sehr viele Objekte empfiehlt es sich, dem Sublimat-Alkohol-Gemisch 5% Eisessig zuzusetzen. Die Fixierung und Weiterbehandlung bleibt die gleiche.

B. Fixierung mit Pikrin-Essigsäure.

Fixierungsflüssigkeit: Konzentrierte wäßrige Pikrinsäure, 95 ccm + Eisessig 5 ccm.

Behandlung wie bei I.

Fixierungsdauer: Ausstriche und Abklatschpräparate 1–20 Minuten. Gewebstückchen 1–12 Stunden.

Auswaschen in 70 %igem Alkohol, bis die Gelbfärbung geschwunden ist (10–30 Minuten, Gewebstückchen mehrere Stunden). Überführen in frischen 70 %igen Alkohol, zur Aufbewahrung oder zur Übertragung in die Farblösungen.

C. Fixierung mit Chromosmiumessigsäure

(nach Flemming).

Fixierungsflüssigkeit: 1 %ige Chromsäure 15, 2 %ige Osmiumsäure 4, Eisessig 1 ccm.

Fixierungsdauer: 1–10 Minuten, Gewebs- und Organstückchen 1–24 Stunden.

Sorgfältig Auswaschen in mehrfach gewechseltem Wasser, je nach Fixierungsdauer 10 Minuten bis 1 Stunde (Organstückchen entsprechend länger). Überführen in 50 %igen Alkohol, dann nach einigen Minuten in 70 %igen Alkohol.

Bei den meisten Protozoen geben alle drei Fixierungsverfahren gute Resultate, und es empfiehlt sich, bei eingehender Untersuchung eines neuen Objektes sie nebeneinander anzuwenden. Bei schlecht am Objektträger oder Deckgläschen haftenden Protozoen ist besonders die Fixierung mit Pikrinessigsäure ratsam, für Untersuchungen von Geißeln, Fibrillen u. dgl. besonders die Flemmingsche Lösung. Weiterhin ist aber die Wahl der Fixierungsmethode vor allem auch von der geplanten Färbung abhängig (s. unten).

Als einfache, leicht zu handhabende und bei Protozoen vielseitig anwendbare Färbung ist 1. die mit

saurem Häkalaun nach Mayer anzuraten. Farblösung: Hämatoxylin 1 g, Natriumjodat 0,2 g, Alaun 50 g, Chloralhydrat 50 g, Zitronensäure 1 g, Aqu. dest. 1000. Am besten löst man zuerst das Hämatoxylin im Wasser und fügt dann die anderen Bestandteile hinzu.

Die Präparate werden aus dem 70 %igen Alkohol auf kurze Zeit in 50 %igen Alkohol, dann für 1—5 Minuten in die Farblösung gebracht (bei Färbung in Petrischalen od. dgl. immer mit der Ausstrichschicht nach oben). Nach der Färbung kurz auswaschen in Leitungswasser, bis sich die Präparate gebläut haben, überführen in 50 %igen, dann 70 %igen, 93 %igen, absoluten Alkohol, schließlich in Xylol. In jeder Zwischenstufe (deren Zahl bei empfindlichen Objekten noch durch Einschaltung dazwischen liegender Alkoholkonzentrationen sowie von Mischungen von absolutem Alkohol und Xylol vermehrt werden kann) bleiben die Präparate kurze Zeit (1—5 Minuten). Aus dem Xylol nimmt man die Präparate schließlich heraus und bringt — bei Objektträgerausstrichen oder Schnitten — auf die Schicht einen Tropfen Kanadabalsam oder Zedernöl und legt ein Deckgläschen darauf. Deckgläschenpräparate werden umgekehrt mit Kanadabalsam oder Zedernöl auf einen sauberen Objektträger aufgekittet.

Mit Häkalaun erhält man, besonders nach Fixierung I und II, rasch schöne kontrastreiche Färbung, speziell der Kerne. Dem Anfänger ist diese Färbung im Hinblick auf ihre leichte Erlernung und Handhabung besonders zu empfehlen.

2. Eisenhämatoxylin nach Heidenhain. Die Präparate kommen aus 50 %igem Alkohol zunächst auf 1—24 Stunden in eine 2½ %ige Lösung von Eisenaun (schwefelsaures Eisenoxydammuniak), werden dann in destilliertem Wasser kurz abgespült und auf 3 bis

24 Stunden in eine 1 %ige wäßrige Hämatoxylinlösung, am besten in eine bereits längere Zeit (über 4 Wochen) abgestandene Lösung. Im allgemeinen ist eine recht lange Beizung (12—24 Stunden) und Färbung (24 Stunden) anzuraten. Die tiefschwarz gefärbten Präparate werden abermals in Wasser ausgewaschen und zur Differenzierung erneut in die Eisenalaunlösung gebracht. Von Zeit zu Zeit spült man sie in Wasser ab und kontrolliert unter dem Mikroskope, ob der gewünschte Grad der Färbung des untersuchten Objektes erreicht ist. Zur Erzielung feinsten Abstufungen der Differenzierung ist die Entfärbung im Eisenalaun dauernd unter dem Mikroskope zu verfolgen. Nach vollendeter Differenzierung werden die Präparate $\frac{1}{4}$ —1 Stunde in fließendem Leitungswasser ausgewaschen und schließlich wie nach Hämalaunfärbung durch die Alkoholstufen und Xylol in Kanadabalsam gebracht.

Die Eisenhämatoxylinfärbung ist nach allen genannten Fixierungen, speziell auch nach Fixierung in Chromosmiumessigsäure gut anwendbar. Sie gestattet bei einiger Übung, wie kaum eine andere, die Heraussdifferenzierung feinsten Strukturelemente. Bei einem genaueren Studium von Kernteilungsvorgängen bei Protozoen ist sie fast unentbehrlich.

3. Safranin-Lichtgrünfärbung. Die Präparate kommen aus 70 %igem bzw. 50 %igem Alkohol auf 1—24 Stunden (evtl. auch länger) in eine konzentrierte wäßrige Safraninlösung, am besten Safranin O von Gröbler-Leipzig. Für viele Protozoen ist es angeraten, die Färbung im Thermostaten bei 37° vorzunehmen. Aus der Farblösung für je 1—3 Minuten in 50 %igen, dann 70 %igen und 96 %igen Alkohol überführen; aus dem 96 %igen Alkohol für $\frac{1}{2}$ —3 Minuten in eine konzentrierte Lösung von Lichtgrün in absolutem Alkohol, schließlich in absoluten Alkohol

und durch Xylol in Kanadabalsam wie bei Färbung I und II.

Die Safranin-Lichtgrünfärbung gibt, besonders nach Chromosmiumessigsäurefixierung vorzügliche Bilder; anwendbar ist sie auch nach Fixierung mit Sublimatalkohol, für die meisten Protozoen dagegen nach Pikrinessigsäurefixierung nicht anzuraten. Auf gut gelungenen Präparaten erscheint das Plasma der Protozoen grün oder blaugrün, vom Kern das Karyosom leuchtend rot, Chromatinkörnchen im Außenkern rot bis rotviolett, der Außenkern sonst meist bläulichgrün gefärbt. Bei der Teilung färbt sich zum mindesten auf dem Stadium der Meta- und Anaphase die Äquatorialplatte bzw. die Tochterplatten rot, während die achromatische Spindel meist grünlich erscheint, doch verhalten sich in dieser Hinsicht nicht alle Protozoengruppen ganz gleich.

4. Färbung mit Azur-Eosin nach Giemsa (sog. „feuchte Giemsafärbung“). Kommt nur nach Sublimatalkoholfixierung (nicht nach Pikrinessigsäure und in der Regel auch nicht nach Chromosmiumessigsäure) zur Verwendung. Abweichend von dem sonst üblichen Verfahren (s. S. 15) kommen die Präparate nach der Fixierung auf 5 Minuten in verdünnte wässrige Jodjodkalilösung, dann Abspülen in Wasser, Überführung in 0,2 %ige wäßrige Natriumthiosulfatlösung auf 5 Minuten, dann abermals gut in Wasser abspülen. Hierauf färbt man $\frac{1}{2}$ –24 Stunden in einer Mischung von je 1–2 Tropfen der käuflichen (bei Grübler-Leipzig) „Giemsalösung“ von Azur-Eosin auf 1 ccm Wasser. Die Mischung ist stets frisch vor dem Gebrauche herzustellen, auch muß man darauf achten, daß der verwandte Meßzylinder und das destillierte Wasser säurefrei sind. Nach der Färbung werden die Präparate nicht durch Alkohol, sondern durch folgende Lösungen hindurchgeführt:

- a) Azeton 95 T. + Xylol 5 T.
- b) „ 70 „ + „ 30 „
- c) „ 30 „ + „ 70 „
- d) Xylol. pur.
- e) Zedernöl.

Bei genauer Befolgung der gegebenen Vorschrift erhält man auch mit dieser Methode schöne kontrastreiche Doppelfärbungen. Bei den Kernen färbt sich im Ruhestadium das Karyosom blau bis blauviolett, der Außenkern rötlich. Bei der Teilung werden die Äquatorialplatten rot, die achromatische Spindel blau oder blauviolett tingiert.

Diese Färbungsmethode eignet sich besonders für die Untersuchung von Blutprotozoen (Trypanosomen, Malariaerregern u. a.), doch gibt sie auch bei anderen Protozoengruppen gute Resultate. —

Die geschilderten Fixierungs- und Färbemethoden reichen auch zur genauen Untersuchung der Protozoen — der parasitischen sowohl wie der frei lebenden — völlig aus. Wer sie gut beherrscht, kann mit ihrer Hilfe alle bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse erforderlichen morphologischen Beobachtungen und Forschungen an Protozoen durchführen. Für rein diagnostische Zwecke, Nachweis von Trypanosomen, Plasmodien, Spirochäten ist noch das Verfahren der Färbung von Trockenausstrichen und „dicken Tropfen“ wichtig, die auf S. 48 geschildert werden. Die im einzelnen bei den verschiedenen Protistengruppen noch anzugebenden besonderen Verfahren bieten nichts prinzipiell anderes, nur spezielle Ergänzungen, auf die zur Not auch verzichtet werden könnte.

Die Untersuchungen an gefärbten Präparaten gelten bisher in erster Linie dem Kerne und seinen Veränderungen, und zwar vor allem dem am meisten beachteten Kernbestandteile, dem sog. Chromatin. Es ist daher

besonders zu betonen, daß das Wesen der histologisch-zytologischen Färbung derzeit noch ziemlich unbekannt ist, wir also in ihr kein sicheres Kriterium für den Nachweis und die Beurteilung der verschiedenen Kernsubstanzen besitzen. Wir sind daher, wenn wir einen solchen Nachweis führen wollen, in erster Linie darauf angewiesen, den entwicklungsgeschichtlich-morphologischen Weg zu beschreiten und können demgemäß als Chromatin bei Protozoen nur die Kernkomponente in jedem einzelnen Falle mit Sicherheit bezeichnen, aus der die Entstehung einer Äquatorialplatte, also von Chromosomen, verfolgt werden konnte. Nebenbei kann man sich zum Nachweis der Chromatine folgender Methoden bedienen:

Das Chromatin löst sich in konzentrierten Mineralsäuren, in verdünnten Alkalien, in Kaliumkarbonat und Natriumphosphat. In 10 %iger Kochsalzlösung wird es gallertig und löst sich manchmal auf. Für die Lösung der erwähnten Substanzen, sofern man nur frische Zellen zur Verfügung hat, eignet sich 1 %ige Kalilauge, Kaliumkarbonat (40—50 %) und rauchende Salzsäure. Gar nicht oder nur teilweise anverdaut werden die Chromatine durch Pepsinsalzsäure und Trypsin (teilweise). (Zur Darstellung des Periplasts der Trypanosomen zu empfehlen.)

Das Chromatin wird ferner nicht in Saponin und Sapotoxin gelöst, dagegen ziemlich verändert in taurocholsaurem Natrium (1:20 in physiologischer Kochsalzlösung in braunen Flaschen), das das Protoplasma der Protozoen, auch der Spirochäten, im Gegensatz zu den Bakterien und Pilzen, mit Ausnahme der Pneumokokken, löst.

Der als Reagens auf Chromatin empfohlenen Methylgrünessigsäure (starke wäßrige Lösung von Methylgrün mit einem Zusatz von 1 %iger Essigsäure) kommt eine solche allgemeine Bedeutung nicht zu, speziell auch

nicht bei den Protozoen, da die Färbung häufig sehr schwach ausfällt und nicht selten völlig versagt.

In den letzten Jahren ist von Unna (zusammenfassende Darstellung im Handb. d. biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 2, Heft 1, 1921, ferner Centrbl. f. Bakteriolog., Abt. I, Bd. 80, 1917) versucht worden, durch planmäßige Behandlung mit verschiedenen Eiweiß lösenden bzw. fällenden Agentien und nachfolgende Färbung einen Einblick in die chemische Zusammensetzung des Kernes und seiner einzelnen Teile zu gewinnen: Das überhaupt nicht, oder nur mit Alkohol, Aceton, evtl. auch Osmiumdämpfen fixierte Objekt wird zunächst zur Orientierung mit verschiedenen Farbstoffen (z. B. Haemalaun, polychromes Methylenblau, GiemsaLösung) gefärbt und alsdann in Parallelversuchen das Resultat der gleichen Färbung nach Vorbehandlung mit verschiedenen, verschiedene Gruppen von Eiweißkörpern lösenden bzw. fällenden, Agentien geprüft. Aus Unterschieden der Färberesultate nach verschiedener Vorbehandlung und Vergleich der Ergebnisse bei Anwendung verschiedener — saurer und basischer — Farbstoffe wird auf den chemischen Charakter der verschiedenen Kernkomponenten geschlossen — in der Annahme, daß Fortfall einer sonst erzielbaren Tinktion nach Vorbehandlung mit bestimmte Eiweißgruppen lösenden Agentien eben auf eine Lösung solcher zuvor im Kerne vorhandener Eiweißkörper zurückgeführt werden müsse. Diese Grundannahme erscheint aber noch durchaus nicht bewiesen, wissen wir doch bei unserer heutigen Unkenntnis des Wesens und der genaueren Bedingungen der cytologischen Färbung nicht, ob nicht das Ausbleiben oder die Veränderung eine Färbung nach der erwähnten Vorbehandlung nicht auch statt auf einer erfolgten Lösung auf sonstigen chemischen und physikalischen Verän-

derungen beruhte! Es müßte also zunächst zum mindesten der Nachweis der nach Unna's Annahme gelösten Eiweißkörper im jeweiligen Lösungsmittel erbracht werden, ein Nachweis, der bei „chromolytischen“ Protistenuntersuchungen bisher nicht geführt worden ist. Vorerst kann es sich bei der „Chromolyse“ somit nur um erste Versuche handeln. — Wieweit sich in Zukunft auf solchem Wege ein Einblick in den Aufbau der Protistenkerne wird erzielen lassen, bleibt abzuwarten — gegenwärtig aber sind wir bei der Charakterisierung und Analyse der Kernbestandteile eben immer noch vor allem auf die morphologisch-entwicklungsgeschichtliche Untersuchung angewiesen.

I. Rhizopoda.

I. Amöbina.

Materialbeschaffung: Am leichtesten in größeren Mengen zu erhalten sind die zur Einführung in die Technik der Protozoenuntersuchung besonders geeigneten kleinen Amöben der „Limax“-Gruppe (Vahlkampfia-Arten), die im enzystierten Zustande weiteste Verbreitung haben.

Man bedecke den Boden eines größeren Gefäßes mit Heu oder Stroh, mit Gartenerde, Pferdedünger oder Stalljauche und fülle das Gefäß mit abgestandenem Leitungswasser auf. Meist schon nach 24 Stunden oder wenigen Tagen finden sich bei jedem dieser Aufgüsse in der sich an der Oberfläche der Flüssigkeit bildenden Kahlhaut Amöben in wechselnder Menge (besonders reichlich bei Pferdemist und Gartenerdeaufgüssen). Man kann sie direkt untersuchen oder zur Anlage von Kulturen verwenden.

Die Zahl der zur Züchtung geeigneten Kulturböden ist ziemlich groß, und man kann sagen, daß bis auf wenige Ausnahmen fast alle sonst zur Verwendung gelangenden Substrate tauglich sind, soweit sie ein neutrales bis schwach alkalisches Medium darstellen.

Am bequemsten sind feste Nährböden, vor allem $\frac{1}{2}$ –2 % iger Agar mit verschiedenen Zusätzen. Viel gebraucht und sehr zu empfehlen ist z. B. folgende Zusammensetzung:

Agaragar	20
Rindfleischbouillon	100
Aqu. dest.	900

Dazu fügt man etwas Sodalösung, bis neutrale oder schwach alkalische Reaktion erzielt ist. — Ebenso gut und noch einfacher herzustellen ist ein Nährboden, bestehend aus: Agar 15 g, Liebigs Fleischextrakt 0,5 g, Aqu. dest. 1000; muß gleichfalls durch Sodalösung neutralisiert werden. Von weiteren brauchbaren Zusammensetzungen seien noch genannt: 1. Heuaufkochung + Agar. (30–40 g Heu werden in 1 l Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde aufgekocht, sodann filtriert und dem Filtrat 1–1 $\frac{1}{2}$ % Agar zugesetzt, dieses durch Kochen aufgelöst. Dann alkalisiert man durch kohlen-saures Natrium und gießt ohne Filtration in Petrischalen aus. Es bildet sich ein Niederschlag, den man jedoch leicht zum Absinken bringen kann.) 2. Nährstoff Heyden 1–2,0, Agar 1,5 und Leitungswasser 100,0. 3. Nutrose 1–2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 4. Somatose 1–2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 5. Pepton Witte 1–2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 6. Dieselben Nährböden mit Strohdekot, welcher bis zur Weißweinfarbe verdünnt war, an Stelle des Leitungswassers. 7. Fucus crispus 5,0 und Leitungswasser 100,0. 8. Beyrinck kultivierte die Amoeba nitrophilia auf ge-

reinigtem Agar, dem 0,2 % $\text{NH}_4\text{NaHPO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ und 0,5 % Chlorkalium zugesetzt wurden. Reaktion neutral oder schwach alkalisch.

Die Nährböden müssen einen hohen Wassergehalt besitzen und werden am besten in Petrischalen ausgegossen. Der Agar kann auch in etwas anderer Konsistenz, $\frac{1}{2}$ — $2\frac{1}{2}$ % ig, gewählt werden.

Bei den Kulturen von Amöben handelt es sich im allgemeinen nicht um Reinkulturen im bakteriologischen Sinne. Denn da die Amöben auf die Aufnahme geformter Nahrungspartikel, in erster Linie von Bakterien angewiesen sind, so muß man sie immer in Gemeinschaft mit Bakterien züchten. Auf den meisten der angegebenen Nährböden, besonders natürlich auf dem Bouillonagar vermehren sich die aus den Aufgüssen (S. 23) oder von anderen Plattenkulturen zusammen mit den Amöben übertragenen Bakterien gewöhnlich so rasch und üppig, daß die Amöbenkulturen ohne weiteres gedeihen können. In manchen Fällen ist es aber erforderlich, die Agarplatten vorher mit einer geeigneten Bakterienart, z. B. *Bact. coli* oder *Bact. fluorescens*, zu beimpfen. Doch auch bei Verwendung von Bouillonagar leistet eine solche Vorbeimpfung gute Dienste, da sie eine reichlichere und gleichmäßigere Vermehrung der Amöben gewährleistet und Fehlschläge, wie sie bei gelegentlicher Entwicklung als Futter ungeeigneter Bakterien sonst vorkommen können, nur sehr selten zuläßt. Mouton beimpft von einer Bakterienreinkultur die Platte in radiären, in der Mitte nicht zusammenlaufenden Streifen und bringt das Amöbenausgangsmaterial in den etwa 1 cm Durchmesser besitzenden bakterienfreien Mittelraum. Die Amöben wandern und vermehren sich dann entlang den radiären Streifen und lassen mitübertragene Bakterien oder sonstige Verunreinigungen meist weit zurück. Durch Abimpfen von solchen vom Zentrum der Platte

entfernten Stellen auf frischen Nährboden erhält man am einfachsten aus der primären, verschiedene Bakterienarten, vielleicht auch verschiedene Amöben enthaltenden Rohkultur eine Zucht auf bakterieller Reinkultur; aus dieser schließlich durch Übertragung einer einzelnen Amöbenzyste (Kontrolle unter dem Mikroskop!) eine sog. „zweigliedrige Reinkultur“ (Öhler), d. h. die Zucht eines einzigen Amöbenstammes auf einer Reinkultur eines Bakteriums. Die Gewinnung solcher reiner Zuchten aus Ausgangsrohkulturen wird durch Verwendung eines mit einer Bakterienreinkultur vorbeimpften Wasséragar Nährboden (Agar 1—2 g, Leitungswasser 100) erleichtert, da hierauf kein üppiges Bakterienwachstum erfolgt. — Auch auf anderem Wege kann man derartige Kulturen erhalten: Man behandelt Amöbenzystenmaterial ca. 72 Stunden mit 20 % iger Lösung wasserfreien Sodas. Unter diesen Bedingungen sterben die Begleitbakterien ab. Die Amöbenzysten werden dagegen häufig wenig geschädigt, so daß aus ihnen nach Übertragung auf eine mit einer Bakterienreinkultur vorbeimpfte Agarplatte gute Amöbenzuchten hervorgehen. Wirkliche Reinkulturen (im bakteriologischen Sinne) von Amöben sind von Tsujitani (Zentralbl. f. Bakt., Bd. 24, 1898) und Oehler durch wiederholte Passagen auf mit abgetöteten Bakterien bestrichenen Wasseragarplatten erzielt worden.

Die Kultur auf festen Nährböden eignet sich bisher nur für kleinere, meist frei lebende Amöben (Gattungen Vahlkampfia und Hartmannella). Vielfach wurden statt der echten Amöben nur Myxamöben gezüchtet (nicht ausschlaggebende Kriterien dieser: leichte Zystenbildung, häufige Flagellatenzustände, Plasmodienbildung, Aufwärtskriechen der Amöben an dem Substrat). Eine entsprechende Zucht der großen Süßwasseramöben ist dagegen bisher nicht möglich gewesen; wohl

aber gelingt es häufig, diese größeren Formen in Teichwasser mit Zusatz von Hühnereiweiß (weniger gut mit Bouillonzusatz) zu reichlicher Vermehrung zu bringen.

Man untersucht Amöben zunächst frisch im hängenden Tropfen oder Deckglaspräparat, das mit Wachsfüßchen versehen und gegen das Verdunsten der Untersuchungsflüssigkeit mit einem Wachs- oder Vaselineband umrandet worden ist. Den Wachsrand stellt man sich am besten in der Weise her, daß man mit einem kurz vorher angebrannten, mit einem kurzen Docht versehenen Wachsstock rasch den Rand des Deckglaspräparates entlang fährt. Die amöboiden Bewegungen kann man mechanisch durch einen Zusatz von Kirschgummilösung verlangsamen.

Von Kulturamöben stellt man hauptsächlich Abklatschpräparate (vgl. S. 14) her. Bei manchen Arten haften aber die Zysten dabei schlecht am Deckgläschen. In solchen Fällen müssen Ausstrichpräparate angefertigt werden. Außerdem empfiehlt es sich dann — wie bei schlecht haftendem Material ganz allgemein! — auf 50—60° erhitzte Fixierungsflüssigkeiten anzuwenden. v. Wasielewski und seine Mitarbeiter schneiden von Stellen der Kulturplatte, die einen zarten bakterienarmen Amöbenrasen aufweisen, kleine rechteckige Agarstückchen heraus, bringen sie in einen Hansenschen Schalenobjektträger und bedecken sie vorsichtig, ohne anzudrücken, mit einem sauberen Deckglas. Wenn sich dann nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde die meisten Amöben an die Glasfläche angelegt haben, wird die Fixierungsflüssigkeit in den Ring des Schalenobjektträgers so weit getropft, daß sie das Deckglas nicht berührt, sondern durch den Agar hindurch bis zur Amöbenschicht diffundiert (v. Wasielewski und Kühn, Zool. Jahrb., Bd. 38, 1914).

Will man Teilungsstadien untersuchen, so ist das Material vom Rande des Amöbenrasens zu entnehmen.

Zur Fixierung von Kulturamöben ist besonders Sublimatalkohol (S. 15) und Flemmings Chromosmiumessigsäure (S. 16) zu empfehlen, ferner auch Pikrinessigsäure. Färbung: Nach allen drei Fixierungen — Eisenhämatoxylin (S. 17); nach Sublimat und Pikrinessigsäurefixierung — Hämalalaun, auch Boraxkarmin (färben $\frac{1}{2}$ —6 Stunden, danach differenzieren in 70 % igem Alkohol mit etwas Salzsäurezusatz) oder Alaunkarmin ($\frac{1}{2}$ —24 Stunden färben); nach Chromosmiumessigsäurefixierung gibt Safranin-Lichtgrün (Jollos), nach Sublimatalkohol die feuchte Giemsa-färbung (v. Wasielewski und Kühn) gerade bei Kulturamöben sehr schöne Bilder; beide Färbungen sind übrigens nach beiden Fixierungen anwendbar.

Schwieriger ist die Herstellung von Dauerpräparaten von den größeren freilebenden Amöben, die sich nicht selten in Teich-, Fluß-, Moorwässern usw. finden. In den Fanggläsern halten sie sich teils am Boden, teils an der Flüssigkeitsoberfläche auf, und dementsprechend ist eine Anzahl von Deckgläsern auf den Boden des Gefäßes oder (vorsichtig) auf die Wasseroberfläche zu legen, evtl. nach Anreicherung (s. S. 27). Wenn sich, nach 12—24 Stunden, Amöben in größerer Zahl an den Deckgläsern festgesetzt haben, so nimmt man diese heraus und fixiert in gleicher Weise wie Abklatschpräparate. Es empfiehlt sich, die Fixierungsflüssigkeiten hierbei auf 50—70° zu erhitzen. Die Präparate bleiben aber immer nur ganz kurze Zeit in der heißen Lösung und sind alsdann in entsprechend kalte Fixierflüssigkeit zu übertragen.

Fixierung: Außer den auf S. 15/16 genannten Lösungen sind mit Erfolg anzuwenden:

1. Hermanns Platinosmiumessigsäuregemisch:

1 % ige Platinchloridlösung . .	15
2 % ige Osmiumsäurelösung . .	4
Eisessig	1

Behandlung wie bei Flemmingscher Lösung.

2. 1 % ige Osmiumsäure (von Schaudinn, z. B. für *Trichosphaerium* empfohlen).

3. Zenkers Gemisch (Aqu. dest. 100,0, Sublimat 5,0, Natr. sulf. 1,0, Kal. bichrom. 5,0, Eisessig 5,0).

Färbung: Nach allen Osmiumsäure enthaltenden Fixierlösungen Safranin-Lichtgrün, Eisenhämatoxylin, ferner Gentianaviolett, evtl. auch Giemsa's Azur-Eosin-gemisch. Nach Pikrinessigsäure: Häkalaun, Alaunkarmin, Boraxkarmin. Nach Sublimatalkohol oder Zenkerschem Gemisch können alle genannten Färbungen angewandt werden.

Vereinzelte, sich nicht an den Deckgläschen festsetzende oder nicht haften bleibende größere Amöben fixiert und färbt man (bei ständiger Kontrolle unter dem Mikroskop) unter dem Deckglas, indem man an der einen Seite des Deckglases die Fixierungsflüssigkeit vorsichtig zusetzt und gleichzeitig an der anderen mit Filtrierpapier absaugt. Für diese Fixierung eignet sich besonders die Pikrinessigsäure, als Färbung dann Häkalaun oder Delafield'sches Hämatoxylin (die von Grübler-Leipzig zu beziehende Lösung ist etwas zu verdünnen), auch Alaunkarmin, Boraxkarmin und Pikrokarmin.

Zimmermann bediente sich einer Lösung von

0,5 g Chromsäure,
0,25 g Sublimat,
100 g Wasser,

von dieser Stammlösung nahm er 5 ccm, setzte 2 bis 3 Tropfen 5 % iger Essigsäure oder 2 Tropfen 10 % iger

Platinchloridlösung hinzu und ließ dann etwas davon unter das Deckglas hinzutreten.

Braß (Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. 1. Bd., 1884, S. 39) läßt unter das Deckglas eine Lösung von:

- 1 Teil Chromsäure,
- 1 „ Essigsäure (konz.),
- 1 „ Platinchlorid

und 400—1000 Teile Wasser zutreten.

Sind Amöben in großer Menge vorhanden, so konserviert man sie direkt mit Sublimatalkohol oder mit dem Flemmingschen oder Zenkerschen Gemisch in Zentrifugierröhrchen, zentrifugiert sie ab, wäscht im destillierten Wasser, nach Sublimatfixierung in Jod-Jodkalium-Alkohol und 50 % Alkohol aus, färbt mit Alaunkarmin, Boraxkarmin usw. vor und bringt die Objekte nach jedesmaligem Abzentrifugieren in dem Röhrchen durch die Alkoholstufen bis ins Chloroform und Chloroformparaffin, überträgt sie mit einer sauberen Pipette in eine kleine Mulde von hartem Paraffin, das in einem peinlichst mit salzsaurem Alkohol gereinigten Uhrschildchen zum Erstarren gebracht wurde. Dann bringt man das Ganze in den Thermostaten, läßt das Chloroform abdampfen und zerlegt nach dem raschen Erstarren des Paraffins die Amöben in dünne Schnitte.

Bei größeren Formen ist das Verfahren in der Weise sehr zu erleichtern und zu vereinfachen, daß man die nach Fixierung durch Zentrifugieren im Bodensatz des Zentrifugierröhrchens konzentrierten Amöben mit einer Pipette in ein kleines am unteren Ende mit engstmäschiger Gaze oder Seide zugebundenes Glasröhrchen von $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ cm Durchmesser überträgt. Das Auswaschen, Färben und Durchführen ins Paraffin erfolgt dann mit diesem Gazeröhrchen ohne weiteres Zentrifugieren.

Parasitische Amöben (Entamöben).

Materialbeschaffung: Am leichtesten erhältlich ist die im Blind- und Dickdarm der Maus sehr häufige, der menschlichen *Entamoeba coli* sehr nahestehende *E. muris*; ferner die vereinzelt bei den meisten Menschen, in größerer Anzahl bei mangelhafter Mund- und Zahnpflege, im Zahnbelag vorkommende *Entamoeba buccalis*. Praktisch von Wichtigkeit ist die Feststellung und Untersuchung der Dysenterieamöben, *Entamoeba histolytica* und ihre Unterscheidung von harmlosen Amöben, speziell der *E. coli*.

Dysenterieamöben

untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man mit einer Pinzette etwas von dem blutigen Schleim unter das Deckgläschen bringt. Es empfiehlt sich nicht mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen. Man muß ferner physikalische (Druck) und chemische Schädigungen vermeiden. (So ist vor allem darauf zu achten, daß der auf Amöben zu untersuchende Stuhl nicht in einem auch nur Spuren von Sublimat oder Lysol enthaltenden Gefäß aufgefangen wird!) In manchen Fällen ist die Anwendung eines heizbaren Objektisches von Nutzen. Für vitale Färbungen ist Methylenblau (1 : 20000 usw.), sowie besonders Neutralrot anzuraten.

Kuenen und Swellengrebel setzen etwas verdünnte Eosinlösung zum Präparat. Die lebenden Entamöben heben sich dann vom Untergrunde gut ab. Der Nachweis von Zysten der Dysenterieamöbe wird durch Zusatz von verdünnter Lugolscher Lösung erleichtert.

Für Dauerpräparate werden möglichst dünne Deckglasausstriche von Schleimflocken rasch angefertigt und in heißem (50—70°) Sublimatalkohol + 5 % Eisessig fixiert. Nach kurzem Aufenthalt in der heißen

Lösung bringt man die Präparate auf 1–10 Minuten in das gleiche kalte Gemisch. Weiterbehandlung wie nach jeder Sublimatfixierung (s. S. 15). Zum Fixieren der Entamoeben ist ferner auch die Flemmingsche und die Hermannsche Lösung sehr zu empfehlen.

Färbung am besten mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (S. 17) evtl. Nachfärbung mit Eosin.

Nöller (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 25) gibt folgende, die Eisenhämatoxylinmethode auch dem Ungeübten leicht ermöglichende Heidenhain-Zeitfärbung an:

Die Ausstriche kommen aus 70 %igem Alkohol in 4 %ige frisch bereitete Eisenalaunlösung für 1 Stunde im 37°-Brutschrank. Dann Auswässern: 2 Minuten in fließendem Leitungswasser, Färben in der Heidenhain-Hämatoxylinlösung (S. 18) 1 Stunde bei 37°. Abermals auswässern für 1–2 Minuten, dann übergießen mit frischer 2 %iger Eisenalaunlösung zum Differenzieren für die Dauer von 3½–4 Minuten, gründlich in Leitungswasser wässern und durch die Alkoholstufen und Xylol in Kanadabalsam bringen.

Dobell (The amoebae living in man, London 1919) färbt mit Manns Methylblau eosin (Methylblau in 1 %iger Lösung 45, desgl. Eosin 35, Wasser 100) und differenziert alsdann mit einer schwachen Lösung von Orange G in 70 %igem Alkohol.

Für Schnitte von Darmgeschwüren fixiere man entweder mit dem erwähnten Sublimatgemisch, mit Chromosmiumessigsäure (Flemmings Lösung) oder mit Zenkerscher Flüssigkeit 1 bis mehrere Stunden und färbe mit Hämalun (Eosinnachfärbung), Eisenhämatoxylin, Safranin oder Anilinwassermethylviolett. Nach Sublimatalkoholhärtung färbe man auch mit Toluidinblau wässrig mit einer Differenzierung in Orange G (zu beziehen nur von Grübler, konzentrierte wässrige Lösung). Die fertigen Zysten der Ent-

amœba histolytica lassen sich nicht schneiden und springen vor dem Messer leicht aus (Schaudinn).

Zur schnellen Diagnose von spärlich vorhandenen Dysenterieamöben geeignet ist die Methode von Mathis und Mercier: Dünn auf einem Objektträger ausgebreitete Schleimflocken werden sogleich über 1 %ige Osmiumsäure $\frac{1}{2}$ Minute unter Luftabschluß geräuchert. Alsdann fügt man einen Tropfen einer 2 Wochen alten, 0,5 %igen wässerigen Hämatoxylinlösung hinzu, bedeckt nach einigen Sekunden mit einem Deckglas und kann sogleich mikroskopisch untersuchen.

Zum gleichen Zwecke bringt Riegel feuchte Ausstriche auf 40 Sekunden bis 1 Minute in einen Chloroformauszug von Manson-Lösung, der folgendermaßen erhalten wird: 1 ccm einer frisch hergestellten Lösung (von 5 g Borax und 2 g Methylenblau in 100 ccm heißen destillierten Wassers) werden $\frac{1}{2}$ Minute mit 5 ccm Chloroform geschüttelt, dann mit Chloroform auf 10 ccm aufgefüllt. Man läßt absetzen, hebt das rötliche Chloroform ab und filtriert. Nach der Färbung kommen die Präparate direkt in Paraffinum liquidum und werden gleich untersucht. — Die Amöben werden zugleich fixiert und gefärbt; lebend gewesene erscheinen violett, schon vorher abgestorbene grüngrau.

Differentialdiagnose von *E. histolytica* (Dysenterieamöbe) und *E. coli* (harmlos).

Bei Untersuchung im Leben sind die vegetativen Dysenterieamöben des akuten Krankheitsstadiums vor allem an der auch im unbeweglichen (aber lebenden!) Zustande meist recht deutlichen Scheidung von Ento- und Ektoplasma und dem stark lichtbrechenden Ektoplasma überhaupt leicht kenntlich. Bei *E. coli* tritt eine solche Scheidung wegen des weniger lichtbrechenden Ektoplasma dieser Art nur bei der Bewegung und

auch dann weniger scharf hervor. Das Entoplasma der Dysenterieamöben enthält ferner sehr häufig gefressene rote Blutkörperchen, *E. coli* dagegen so gut wie nie. Auf gefärbten Präparaten (nach feuchter Fixierung und Weiterbehandlung!) erscheint ferner bei *E. coli* das Karyosom des Kernes bei sehr vielen Individuen spindel- oder hantelförmig gestreckt, der Aufbau des Kernes aus Karyosom, einer sich daran anschließenden strukturlosen hellen Zone und Außenkern weniger klar als bei *E. histolytica*. — Leicht zu unterscheiden sind vor allem die kleineren (6–15 μ) von einer einfachen Zystenhülle umgebenen 4kernigen Zysten der Dysenterieamöbe von den größeren (15–30 μ) von einer derberen doppelt konturierten Membran eingeschlossenen 8- (und mehr-) kernigen Zysten der harmlosen *E. coli*.

Schwieriger ist die Diagnose der bei chronischen oder in Heilung übergehenden Infektionen vorherrschenden kleinen sog. Minutaformen der Dysenterieamöbe. Sie sind, ebenso wie die aus ihnen hervorgehenden Zysten, vor allem an reichlichen, sich mit Eisenhämatoxylin stark färbenden Chromidialklumpen (Plaques sidérophiles) kenntlich. (Näheres vgl. die neueste Darstellung dieses Gebietes durch Hartmann und Bělař.)

Literatur.

1. Parasitische Amöben.

Hartmann, M. und K. Bělař, Die parasitischen Amöben des Menschen und der Säugetiere in v. Prowazeks Handb. d. pathogenen Protozoen, Bd. III. Leipzig, J. A. Barth, 1921.

2. Amöbenkultur.

Frosch, Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 21, 1897.

Mouton, Recherches sur la digestion chez les amibes, Ann. Inst. Pasteur, t. 16, 1902.

Oehler, Amöbenzucht auf reinem Boden, Arch. f. Protistenk., Bd. 37, 1916.

3. Bau und Vermehrung von Amöben.

Gläser, Unters. über d. Teilung einiger Amöben, Arch. f. Protistenk., Bd. 25, 1912.

Jollos, Unters. zur Morphologie d. Amöbenteilung, ibid. Bd. 37, 1917.

v. Wasielewski und Kühn, Unters. über Bau u. Teilung d. Amöbenkernes, Zool. Jahrb., Bd. 38, 1914.

2. Thekamoebina.

Beschalte Amöben finden sich in wechselnder Anzahl in Süßwasseransammlungen aller Art, teils an der Oberfläche des Wassers und an schwimmenden Wasserpflanzen u. dgl., teils auch am Boden. Größere Formen (*Arcella*, *Diffugia*, *Centropyxis* u. a.) sind schon mit der Lupe, bei einiger Übung auch mit bloßem Auge, zu erkennen. Man kann sie in den Fanggefäßen in gleicher Weise wie die großen unbeschalten Süßwasseramöben anreichern (vgl. S. 27). Von manchen Arten (*Arcella*) erhält man bei isolierter Zucht in filtriertem Teichwasser, oder noch besser in 0,01% Nährlösung nach Benecke (s. S. 41), und Hinzufügung von Abschwemmungen einer Kultur von grünen Flagellaten (*Chlorogonium* s. S. 41) schöne Kulturen.

Verschiedene *Chlamydomorphys*arten und verwandte Formen erhält man in gleicher Weise wie die Amöben der „*Limaxgruppe*“ aus Pferdedung-, Gartenerde- usw. Aufgüssen (s. S. 23). Sie können dann genau wie die kleinen Amöben auf festen Nährböden kultiviert werden. Auch Präparate werden in gleicher Weise angefertigt, fixiert und gefärbt.

Größere Formen fixiert man am besten im Röhrchen mit Gazeverschluß (S. 30), kleinere nach der Zentrifugiermethode (S. 30). Durchführung durch die Alkoholstufen und Xylol in Paraffin und Anfertigung von Schnitten. Oder Färbung in toto im Röhrchen, Durchführung durch die Alkoholstufen in Xylol oder Nelkenöl. Aus dem Xylol (oder Nelkenöl) bringt man die durch Zentrifugieren oder im Gazeröhrchen in wenig Flüssigkeit konzentrierten Thekamöben mit einer Pipette in einen Tropfen Kanadabalsam auf dem Objektträger und legt ein Deckgläschen darüber. Manche Arten (z. B. *Arcella*) setzen sich auch an in die Kulturgläser gebrachte Deckgläschen (s. S. 28) genügend fest oder lassen sich mit dem auf S. 38 be-

schriebenen Verfahren zwischen zwei Deckgläschen gut fixieren und anheften.

Fixierung: Pikrinessigsäure, Sublimatalkohol + Eisessig, Flemmingsche Lösung, ferner Bouins Gemisch (Pikrinsäure 1 g, Eisessig 15 ccm, Formalin [40 % ige wäßrige Formaldehydlösung], 60 ccm, 80 % iger Alkohol 150 ccm).

Färbung: Totalpräparate mit Delafields Hämatoxylin (die bei Grübler-Leipzig käufliche Lösung wird sehr stark verdünnt, 1—24 Stunden gefärbt, evtl. Differenzierung mit 60 % igem Alkohol + etwas verdünnte Salzsäure), Hämalaun, Boraxkarmin, Alaunkarmin; Schnitte mit Eisenhämatoxylin oder Safraninlichtgrün.

Literatur.

Bělař, K., Untersuchungen über Thecamöben der Chlamydophrys-Gruppe. Arch. f. Protistenk., Bd. 42, 1921.

3. Foraminifera.

Man fixiert mit Sublimatalkohol, Pikrinessigsäure oder mit Perényscher Flüssigkeit (4 Teile 10 % ige Salpetersäure, 3 Teile 90 % iger Alkohol und 3 Teile $\frac{1}{2}$ % ige Chromsäurelösung) und färbt mit Delafields Hämatoxylin, mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Hämalaun, Alaunkarmin oder Safranin. Die Schalen werden durch Kalilauge oder Eau de Javelle (Kaliumhypochlorid) aufgelöst. Winter konservierte Peneroplis kurze Zeit nach dem Zerquetschen mit Osmiumdämpfen (Gamogonie). Zum Entkalken setzte er zu dem im 60 % igen Alkohol liegenden fixierten Material soviel Salzsäuretropfen, bis kleine Blasen auf den Kalkschalen sichtbar wurden (8—20 Minuten). Er färbte mit Boraxkarmin oder Alaunkarmin (15 Minuten) vor und mit Methylenblau nach. Schnitte werden 10 Minuten vorgefärbt mit einer Mischung von wässriger Pikrinsäure und wässrigem Säurefuchsin zu gleichen

Teilen bis zu granatroter Färbung. Nachfärbung Heidenhains Eisenhämatoxylin. Schaudinn (Zeitschr. f. wiss. Zoolog., 59. Bd., 1895, S. 193) fixiert *Calcituba* mit 1 %iger Osmiumsäure oder mit einer Mischung von 1 Teil wässrigem Sublimat und 2 Teilen absolutem Alkohol.

4. Heliozoa.

Materialbeschaffung: Weit verbreitet in stehenden Gewässern, wenn auch meist nur in einzelnen Exemplaren sind *Actinophrys sol* und das große *Actinosphaerium Eichhorni*. Das letztere ist ohne weiteres, *Actinophrys sol* bei einiger Übung leicht mit bloßem Auge zu erkennen, herauszufischen und zu züchten. *Actinosphaerium* läßt sich bei Fütterung mit Stentoren oder Paramaecien züchten (R. Hertwig), *Actinophrys* in filtriertem Teichwasser oder 0,05 %iger Knopscher Nährlösung (s. S. 40), wobei als Nahrung Abschwemmungen einer Reinkultur von *Chlorogonium* oder *Gonium* (s. S. 41) tropfenweise hinzugefügt werden (Bělař). *Actinophrys* vermehrt sich in derartigen Zuchten (sowohl in kleinen Kulturschälchen wie auch in tief ausgeschliffenen Objektträgern) sehr üppig, so daß man leicht alle Teilungsstadien beobachten kann. Überträgt man nicht alle 5—6 Tage einige Individuen in Schälchen mit frischer Lösung, sondern läßt es zu einer Massenanhäufung von Heliozoen kommen, so treten bald Plasmogamien sowie pädogame Befruchtungsvorgänge mit anschließender Enzystierung auf. Die Zysten haften ziemlich fest am Boden des Schälchens. Man bringt die Heliozoen wieder zum Anschlüpfen, indem man die Schälchen zur Entfernung der Stoffwechselprodukte und Bakterienansammlungen mehrmals mit Wasser ausspült, dann mit 0,01 % ige Knop'sche Nährlösung auffüllt und in ca. 21° bringt.

Nach genauerer Beobachtung im Leben sind gefärbte Totalpräparate und Schnitte anzufertigen. Zum Schneiden fixiert man die Heliozoen im Zentrifugenglas und bringt das durch Zentrifugieren konzentrierte Material in ein kleines Röhrchen mit Gazeverschluß (S. 30), indem dann die Weiterführung durch die Alkoholstufen und Xylol in Paraffin erfolgt. (Auch die Fixierung kann direkt im Gazeröhrchen erfolgen.)

Um Totalpräparate zu erhalten, bedeckt man den Boden des Kulturschälchens mit sorgfältig gewaschenen Deckgläschen, auf denen sich die Heliozoen dann festsetzen und bei vorsichtiger Fixierung — vor allem mit Pikrinessigsäure — zum großen Teil haften bleiben.

Bělař zentrifugiert vorsichtig das lebende Material, nimmt dann den die Heliozoen enthaltenden Bodensatz mit einer Pipette auf und bringt einen Tropfen davon auf ein großes, mit einem Wassertropfen auf einem Objektträger befestigtes Deckglas (Größe z. B. 22×32 mm) und deckt alsdann ein kleineres (Größe 18×18 mm) Deckglas darüber. Der das Material enthaltende Tropfen ist so abzumessen, daß er sich gerade unter dem kleineren Deckglas ausbreiten kann. Man bringt den Objektträger unters Mikroskop und saugt mit einem Streifen Fließpapier soviel von der Flüssigkeit ab, bis eine leichte Quetschung der Heliozoen zu beobachten ist. Dann fügt man an der einen Seite die Fixierungsflüssigkeit hinzu, aber immer nur soviel, wie an der anderen Seite durch den Fließpapierstreifen weiter abgesaugt wird, damit sich das kleine Deckglas nicht vom großen abhebt. Nach völliger Durchströmung der Fixierungsflüssigkeit nimmt man beide Deckgläschen zusammen vom Objektträger ab und legt sie, das kleinere nach unten, in eine mit der Fixierungsflüssigkeit angefüllte Schale. Lösen sich die beiden Deckgläschen dabei nicht von selbst voneinander, so erreicht man die Trennung durch vorsichtiges

Klopfen auf das obere Deckgläschen. Die Weiterbehandlung nach der Fixierung erfolgt dann ganz wie bei Ausstrichpräparaten.

Dies Verfahren bringt besonders bei Pikrinessigsäurefixierung einen sehr großen Prozentsatz der Heliozoen zum Haften. Es ist auch bei Sublimatalkoholfixierung, nicht dagegen bei Gebrauch von Flemmingscher oder Hermannscher Lösung anwendbar (und eignet sich nicht nur für Heliozoen, sondern auch für Infusorien und viele andere frei lebenden Protozoen).

Zur Fixierung von Heliozoen im Zentrifugen- oder Gazeröhrchen ist außer den eben genannten Lösungen auch das Bouinsche Gemisch (s. S. 36) zu empfehlen, zur Färbung von Totalpräparaten: Hämalaun, Alaunkarmin, Pikrokarmin; für Schnittfärbung: Eisenhämatoxylin.

Literatur.

- Bělař, K., Untersuchungen über den Formwechsel von Actinophrys sol. Biolog. Zentralbl., Bd. 41, 1921.
Hertwig, R., Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium Eichhorni. Abhandl. d. k. bayer. Akad., II. A., Bd. 19, 1898.

5. Radiolaria.

Lo Bianco konserviert Thalassicolla eine Stunde lang mit $\frac{1}{2}$ %iger Chromsäure, Acanthometra und Aulacantha mit 50 %igem Alkohol oder mit konzentriertem Sublimat oder durch Zusatz von Osmiumsäure zu dem Seewasser. Gefärbt wird mit Hämatoxylin, Pikrokarmin oder Alaunkarmin.

Karawaiew fixiert Aulacantha 24 Stunden in einem Gemisch von gleichen Teilen von Eisessig und starker Flemmingscher Flüssigkeit (s. S. 16) und härtet mindestens 24 Stunden in dem letzteren Gemisch nach.

Borgert (Zool. Jahrbuch, 14. Bd., 1900, S. 207) empfiehlt Sublimatlösung mit Essigsäure (10:2 oder 3) oder Pikrinosmiumplatinchlorid. (200 ccm gesättigte Pikrinsäurelösung + 1 g Platinchlorid in 10 ccm Wasser

+ 2 ccm Eisessig + 25 ccm 2 %ige Osmiumsäure.) Weniger zu empfehlen. Färbung mit Kleinenbergs Hämatoxylin, Mayers Parakarmin (Grübler), Heidenhains Eisenhämatoxylin.

Sphärozoen werden nach Brandt (Fauna und Flora des Golf von Neapel 1885) mit $\frac{1}{2}$ –1 %iger Chromsäure ($\frac{1}{2}$ –1 Stunde) oder mit Jodalkohol (70 %igem Alkohol, gleiche Menge Seewasser + etwas Jodtinktur $\frac{1}{2}$ Stunde, Auswaschen im Süßwasser, Alkoholreihe) oder mit 5–15 %iger Seewassersublimatlösung fixiert.

Huth fixiert Thalassikolla mit Flemmingscher Lösung, Sublimatalkohol + Eisessig oder Bouins Gemisch. Zum Einbetten in Paraffin müssen die Thalassikollen nicht durch Xylol, sondern durch Chloroform hindurchgeführt werden.

II. Flagellata.

I. Frei lebende Flagellaten.

Materialbeschaffung: In der Kahlhaut von Heu-, Erd- oder Stalljaucheaufgüssen (vgl. S. 23) finden sich meist auch verschiedene Flagellaten (Polytoma, Prowazekia u. a.), in Wasserproben von stehenden Gewässern aller Art sind die verschiedensten Formen — gefärbte wie farblose — sehr häufig, wenn auch meist nur in geringer Zahl anzutreffen. Manche Arten, besonders chlorophyllbesitzende, lassen sich auch relativ leicht kultivieren. Als Nährlösungen eignen sich vor allem die von Knop und Benecke angegebenen Medien. Die Knopsche Lösung besteht aus:

Ca(NO ₃) ₂	2 g	} Diese 0,1 %ige Lösung ist meist auf 0,05 oder noch mehr zu verdünnen.
KNO ₃	0,5 g	
H ₂ KPO ₄	0,5 g	
MgSO ₄	0,5 g	
Aqu. dest.	3500,0 ccm	
dazu 1 Tropfen Eisenchlorid		

Die Benecke-Lösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

NH_4NO_3		0,3 g,
CaCl_2		0,15 g,
K_2HPO_4		0,15 g,
MgSO_4		0,15 g,
Aqu. dest.		1500 ccm,
dazu Fe_2Cl_6 1 Tropfen der offizinellen Lösung.		

In beiden Lösungen lassen sich grüne Flagellaten (Gonium, Chlamydomonas, Chlorogonium, Eudorina, auch Euglenen u. a.) am Lichte gut züchten. Bei spärlichem Ausgangsmaterial läßt man die positiv phototaktischen grünen Flagellaten sich zuerst an dem dem Lichte zugekehrten Gefäßrande ansammeln und überträgt sie dann leicht mit einer Pipette in das Kulturmedium. Für *Euglena gracilis* sind nach Zumbstein folgende Lösungen noch geeigneter:

Pepton		0,5 g,
Traubenzucker		0,5 g,
Zitronensäure		0,2 g,
$\text{MgSO}_4(+7\text{H}_2\text{O})$		0,02 g,
KH_2PO_4		0,05 g,
Aqu. dest.		100,00 ccm

oder:

Pepton		1,00 g,
Traubenzucker		0,4 g,
Zitronensäure		0,4 g,
MgSO_4		0,02 g,
KH_2PO_4		0,05 g,
NH_4NO_3		0,05 g,
Aqu. dest.		98,00 ccm.

Bei allen Kulturlösungen ist besonders auf die einwandfreie Beschaffenheit des destillierten Wassers zu achten. (Am besten stellt man es sich selbst im Femel-Glasdestillierkolben von Lautenschläger-Berlin her.)

Viele frei lebende Flagellaten lassen sich auch auf festen Nährböden kultivieren. Für Chlamydomonaden und Volvocineen eignet sich 0,5—1 % iger Agar mit Knopscher oder Benecke-Lösung. Gute Züchtungsergebnisse erzielt man auch mit dem von Wettstein (Österr. Bot. Zeitschr. 1921) angegebenen „Torfagar“: Lösung A.

$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$		0,2 g,
MgSO_4		0,05 g,
CaCl_2		0,05 g,
CaSO_4		0,05 g,
K_2HPO_4		0,05 g,
Aqu. dest.		1000,00 ccm
dazu 1 Tropfen Fe_2Cl_6		

Lösung B: 250 g Torf werden mit 1 l Wasser einige Stunden gekocht, dann filtriert. Filtrat muß hellkaffeebraun sein (ist je nach Beschaffenheit des Torfes evtl. entsprechend zu verdünnen). Lösung A und B werden zu gleichen Teilen gemischt, zu je 1000 ccm der Mischung 5—10 g Agar gegeben.

Auf diesem Torfagar kann man außer Chlamydomonaden und Volvocineen auch Cryptomonas, Uroglena, Synura, Mallomonas, Euglena u. a. gut kultivieren. Prowazekia und einige andere Arten lassen sich auf den für Amöben angegebenen Nährböden züchten. Eine Dinoflagellatenart, Glenodinium Cohnii, läßt sich auf Fucosextrakt mit 2 % igem Agar oder 10 % iger Gelatine kultivieren.

Präparate werden von Agarkulturen in gleicher Weise wie bei Amöben (S. 27) angefertigt¹⁾. Material aus flüssigen Medien behandelt man entweder nach der Zentrifugiermethode, oder man fixiert und färbt unter dem Deckglas. Auch das S. 38 angegebene Verfahren gibt häufig gute Resultate. Manche Flagellaten setzen

¹⁾ Zur Untersuchung der Kernteilungsvorgänge bei gefärbten Flagellaten fixiere man nachts.

sich auch an auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegte Deckgläschen fest und bleiben beim Fixieren daran haften. In einer Kahmhaut angesammelte Flagellaten lassen sich häufig mit dieser austreichen. In den beiden letzten Fällen empfiehlt sich Fixierung mit Pikrinessigsäure oder heißem Sublimatalkohol evtl. auch in einer konzentrierten Lösung von Sublimat in absolutem Alkohol.

Sonst ist zum Fixieren auch Flemmingsche und Hermannsche Lösung, sowie das Bouinsche Gemisch anzuraten, zur Färbung Eisenhämatoxylin, Hämalaun Safranin-Lichtgrün (besonders für Chlamydomonaden und Volvocineen geeignet), für manche Formen auch die Giemsaefärbung. Zum Studium der äußeren Struktur bediene man sich auch des auf S. 73 angegebenen neuen Verfahrens von Breßlau.

Zur raschen Orientierung über die Art des Geißelapparates genügt Zusatz von etwas Jodjodkalium zu den lebend untersuchten Flagellaten. Zur Darstellung der Geißeln sei auch auf die Methode von Löffler hingewiesen:

Als Beize wendet man ein Gemisch von 10 ccm 20 % iger Tanninlösung + 5 ccm kalt gesättigter, wäßriger Lösung von Ferrosulfat oder Ferr. sulfur. oxydul. ammon. + 1 ccm wäßrige oder alkoholische Lösung von Fuchsin oder Methylviolett oder Wollschwarz an. Beize fertig bei Grübler zu haben.

Das Deckglas mit dem Flagellatenausstrich klemmt man in eine mit rechtwinkligen Backen versehene Cornetsche Pinzette, begießt es mit einem Tropfen der erwähnten Beizemischung und erwärmt eine Minute lang, bis leichte Dämpfe aufsteigen, wäscht in Wasser gut ab, wiederholt evtl. die Prozedur 2—3mal und färbt in derselben Weise mit einer alkoholischen Fuchsinlösung in Anilinwasser (jedesmal frisch bereiten), der bis zu einer leichten Trübung eine $\frac{1}{10}$ % ige

Lösung von Ätznatron zugesetzt worden ist. Die Schwebefällung muß beim Erwärmen über der Spirituslampe verschwinden. Abwaschen, leicht trocknen mit Filterpapier, Zedernöl.

Zum Studium der Geißelbewegung eignet sich vor allem die Beobachtung mit dem Dunkelfeldapparat (S. 6/7).

2. Parasitische Flagellaten.

1. Darmflagellaten (*Trichomonas*, *Lamblia* u. a.) untersucht man auf Ausstrichpräparaten von Darminhalt und Darmwand sowie auf Schnitten.

Fixierung der Ausstriche mit Sublimatalkohol, Sublimatalkohol + Eisessig oder Flemmingscher Lösung, der Darmstückchen (zur Schnitteinfertigung) auch mit Bouinschem Gemisch. Färbung mit Eisenhämatoxylin, daneben auch mit Hämalan und GiemsaLösung.

Auch die Heidenhain-Zeitfärbung nach Nöller (S. 32) ist anwendbar, nur muß zum Schluß nur $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Minuten (statt $3\frac{1}{2}$ —4 Minuten bei Darmamöben) mit 2 % igem Eisenaun differenziert werden.

Zum Nachweis von Glykogen (z. B. bei *Bodo lacertae*) bedient man sich nach Vorfärbung mit Delafields Hämatoxylin der Bestschen Karminfärbung (Karmin 1,0 g, Ammon. chlorat 2,0, Lith. carbon. 0,5 werden mit 50 ccm Aqu. dest. einmal aufgekocht, nach Erkalten wird 20,0 Ligu. amm. caust zugesetzt, im Dunkeln aufbewahrt. Vom dritten Tage an ist die Lösung brauchbar. Unmittelbar vor Verwendung mischt man 2 Teile von ihr mit 3 Teilen Ligu. ammon. caust. und 6 Teilen Methylalkohol. Färbungsdauer 1 Stunde (die Mischung nicht filtrieren!). Alsdann Entfärbung 10—20 Minuten in Alkohol absol. 4 + Methylalkohol 2 + Aqu. dest. 5 Teile, abspülen in 80 % igem Alkohol und überführen durch 100 % igen Alkohol in Xylol und Kanadabalsam.) — Bei gelungener Färbung erscheint das Glykogen rot, die Kerne blau.

Materialbeschaffung: Im Darm der Eidechse findet man in der Regel drei verschiedene Flagellaten: Bodo, Trichomonas, Trichomastix, in größeren Mengen; im Blinddarm der Maus (besonders an der Darmwand) Trichomonas muris, im Dünndarm Lamblia muris.

2. Blutflagellaten (Trypanosomen und verwandte Formen). Zur Lebenduntersuchung von Trypanosomen bringt man einen Tropfen infizierten Blutes auf einen Objektträger, legt sogleich ein Deckgläschen darauf und umrandet es zum Luftabschluß mit Vaseline, Wachs oder Paraffin. Je nach der Art (am längsten *T. lewisi*, kurze Zeit *Dourinetr.*) bleiben die Trypanosomen hierin verschieden lange Zeit am Leben. Nach Plimmer kann die undulierende Membran der Parasiten gut durch Zusatz von Zitronensäurenatron zu dem Blut, das in einem kleinen Tropfen einer 1 %igen Gelatinelösung etwas eingedickt wurde, verdeutlicht werden. Mit Neutralrot färben sich unterhalb des vegetativen Kernes verschiedene Granulationen. Mit Brillantkresylblau wird das Karyosom in dem bläschenförmigen Kern beim Absterben verdeutlicht. Mit Jod färben sich nur manchmal einzelne Granula. Durch Pepsinverdauung stellt man den Periplast dar. Durch taurocholsaures Natrium (1 : 20, phys. Kochsalzlösung, braune Flasche im Eisschrank aufbewahren) werden die Trypanosomen bis auf einen Periplast- und Kernschatten aufgelöst, durch Saponin oder Sapotoxin (Neufeld) wird in erster Linie das Protoplasma in Lösung übergeführt.

Ausstrichpräparate werden nach der auf S. 14 beschriebenen Methode angefertigt. Fixierung der noch feuchten Ausstriche mit Sublimatalkohol (S. 15), Flemmingscher Lösung (S. 16) oder 2 % iger Osmiumsäure; Färbung nach Sublimat — Alkoholfixierung: nach Giemsas Methode (S. 19, stets feucht weiterbehandeln!), nach Osmiumfixierungen: Eisenhämä-

toxylin (S. 17), evtl. auch Safranin-Lichtgrün (letzteres besonders für Präparate von Trypanosomenkulturen geeignet).

Neben der Eisenhämatoxylinfärbung nach Heidenhain wird auch deren Modifikation nach Breinl-Rosenbusch angewandt: Beizen in 3½ % igem Eisenalaun 1 Stunde, Färben 5 Minuten in einer 1 % igen alkoholischen Hämatoxylinlösung, zu der unmittelbar vor Gebrauch konzentrierte wässrige Lösung von Lithiumkarbonat tropfenweise hinzugegeben wird, bis etwa Rotweinfarbe erzielt ist. Differenzierung und Weiterbehandlung wie bei der alten Heidenhainfärbung.

Diese feuchten Fixierungs- und Färbeverfahren sind jedoch bei den Blutprotozoen nur für genauere cytologische Untersuchungen erforderlich, für diagnostische Zwecke dagegen, und ebenso für die allgemeine Orientierung, bedient man sich hier der wesentlich leichter und rascher herstellbaren Trocken- ausstrichpräparate: Die wiederum entsprechend der auf S. 14 gegebenen Anweisung möglichst dünn auf Objektträgern oder Deckgläschen ausgezogenen Blutausstriche werden lufttrocken gemacht (zur Vermeidung von Verunreinigung durch Staub und Insekten, evtl. in einem geschlossenen Gefäß), 10—20 Minuten in absolutem Alkohol oder Alkoholäther fixiert, wiederum getrocknet und dann meist mit Giemsas Gemisch gefärbt.

Die fertige Lösung von Giemsas Eosinazur bezieht man von Grübler (Leipzig). Aus einer braunen Tropfflasche läßt man je einen Tropfen des Gemisches zu 1 ccm Wasser (dest.) in einem jedesmal gut gereinigten, vor allem säurefreien Meßzylinder zufließen. Nach leichtem Umschütteln des Gemisches färbt man sodann möglichst bald die Präparate. Nach etwa ½ Stunde und mehr wäscht man im destillierten

Wasser aus, trocknet sorgfältig und schließt Deckgläser in säurefreiem Kanadabalsam oder in eingedicktem Zedernöl ein, während Objektträgersausstriche am besten direkt, ohne Deckglas, untersucht werden. Man bringt auch zur Untersuchung mit dem Immersionsobjektiv einen Tropfen Zedernöl unmittelbar auf die gefärbte Ausstrichschicht.

Laveran behandelt die Präparate nach dem Abspülen eine Minute lang mit 5 % iger wässriger Tanninlösung und spült in Wasser ab.

Zuweilen empfiehlt es sich, 1–10 Tropfen einer 1 % igen Kaliumkarbonatlösung je 10 ccm Wasser vor der Herstellung der Färbemischung hinzuzusetzen.

Für die Darstellung der undulierenden Membran ist statt der Alkoholfixierung lufttrockener Ausstriche die Fixierung noch feuchter Präparate mit Osmiumdämpfen (10 Sekunden) anzuraten, ebenso für die Untersuchung der Flagellaten aus dem Insektendarm. Statt des Methylenazurs, das in Giemsa's Farbstoff vorkommt, benutzte Ehrlich Dimethylthionin von der Firma Cassella in Frankfurt a. M.

Für Schnellfärbungen hat Giemsa folgende Modifikation seiner Methode angegeben: Die käufliche Giemsalösung wird mit dem gleichen Volumen Azeton oder (besonders in den Tropen) Methylalkohol reinster Qualität verdünnt und diese — nur einige Tage gut haltbare — Mischung auf lufttrockene Objektträgersausstriche getropft (die mit der Schichtseite nach oben in trockenen Petrischalen liegen), bis die Ausstrichschicht vollständig von der Farblösung bedeckt ist. Man schließt dann die Petrischale, läßt die Farblösung $\frac{1}{2}$ –1 Minute einwirken und gießt dann in die Schale soviel destilliertes, nötigenfalls zuvor schwach alkalisches Wasser hinzu, bis der ganze Objektträger von Flüssigkeit bedeckt ist, die man durch Hin- und Her-

schwänken gut durchmischt. Nach weiteren 5 Minuten ist die Färbung beendet. Abspülen mit Wasser und trocknen. — Neben der Giemsa-Färbung sind auch andere Modifikationen der Romanowskifärbung, wie sie im Kapitel Malaria, S. 54, angegeben werden, für die Herstellung von Trypanosomen-Trockenausstrichpräparaten verwendbar.

Zur Feststellung nur vereinzelt vorhandener Trypanosomen bedient man sich am besten der Methode des „dicken Tropfens“ nach Roß: 3–4 Blutstropfen werden auf einen gut gereinigten Objektträger gebracht, leicht angestrichen (etwa auf eine Kreisfläche von $1\frac{1}{2}$ –2 cm Durchmesser ausgebreitet), an der Luft getrocknet, einige Minuten in gewöhnliches Wasser oder besser in eine Mischung von 2 % igem Formalin und $\frac{1}{2}$ –1 % iger Essigsäure $\bar{a}\bar{a}$ gebracht; Hämoglobin auf diese Weise entfernt. Nachfixierung mit Alkohol, Färbung nach Giemsa.

Bei der Schlafkrankheit des Menschen untersuche man vor allem Lymphdrüsenpunktat, am besten aus den meist geschwellenen Halslymphdrüsen. (Man faßt nach den Angaben von Greig und Gray eine Drüse fest zwischen zwei Finger der linken Hand und sticht dann die Kanüle einer Pravaz-Spritze senkrecht durch die Haut mitten in die Drüse hinein und läßt dann unter ständigem Hin- und Herbewegen der Nadelspitze in der Drüse den vorher niedergestoßenen Stempel der Spritze durch einen Gehilfen aufziehen und untersucht dann den in die Kanüle gelangten weißlichen Tropfen.) Ferner stellt man die Trypanosomen in der Zerebrospinalflüssigkeit durch Zentrifugieren von etwa 5–10 ccm Punktionsflüssigkeit im Bodensatz neben den mononuklearen Leukozyten fest, nachdem die roten Blutkörperchen durch Essigsäure vorher zerstört worden sind.

Geringe Mengen von Trypanosomen im Blut weist:

man auch durch Überimpfung von größeren Blutmassen an empfängliche Tiere nach. (Führt nicht immer zum Ziel.)

Die Versuchstiere werden mittels einer sterilen Injektionsspritze (Rekordspr.) entweder subkutan oder intraperitoneal mit dem Trypanosommateriale infiziert. Beim Vorhandensein von geringen Blutmengen ist besonders der letztere Infektionsmodus anzuraten. Die Gerinnung des Blutes wird durch Hirudin, Natr. citricum (geringe Mengen 5 % iger Lös.) oder in manchen Fällen bloß durch physiologische Kochsalzlösung (Glasperlen schütteln) hintangehalten.

Kultivierung der Trypanosomen.

Die Trypanosomen sind zuerst von Mc. Neal und Novy im Kondenswasser einer Mischung von Agar und Blut (Kaninchenblut) gezüchtet worden.

Ursprünglich setzten die beiden Autoren für die Kultur von *Trypanosoma Lewisi* 1 Teil defibrinierten Blutes zu 5 Teilen Agar zu. Später empfahlen sie eine Mischung von 2 Teilen Blut zu 1 Teil Agar als die beste. Nach Nocht und Mayer genügen gleiche Teile Agar und Blut; das Kaninchenblut wird den bei 50° verflüssigten Agarröhrchen zugesetzt und dieselben dann schräg gelegt. Nach dem Erstarren werden sie mit Gummikappen versehen und zum Auspressen des Kondenswassers auf 24 Stunden in einen Thermostaten von 37° gebracht. Mathis erhitzte den Nährboden auf 75—100°, ohne nachteilige Folgen bei der Züchtung zu bemerken. Das Impfblut wird mit der Lührschen Spritze aus dem Herzen genommen und mit etwas Kochsalzlösung gemischt. Die erste Impfung geschieht mit einer sterilen Pipette, die weiteren Impfungen mit Ösen (3). Nach 3—5 Tagen treten im Kondenswasser die ersten Agglomerationssterne von

Trypanosomen auf. Mc. Neal und Novy hielten eine Kultur 306 Tage (bei Zimmertemperatur).

Bei 37° vermehren sich die Kulturen lebhafter, sterben aber später infolge der Zersetzung des Hämoglobins ab. Die Kultivierung von Tryp. Brucei ist wesentlich schwieriger. Leicht ist die Kultur von Tryp. Lewisi, Froschtrypanosomen, Fischtrypanosomen, Vogeltrypanosomen, Tryp. Theileri und Tryp. Cruzi (Chagas.). Mc. Neal und Novy (Journ. of Inf. Diseases 1904, vol. 1) empfehlen:

Extrakt von 125 g Rindfleisch in 1000 g Wasser:

Agar	20 g,
Pepton	20 g,
Kochsalz	5 g,
Normal (5,3 %) Na_2CO_3 .	10 ccm.

Man mischt je ein Volumen dieses Nährmediums bei 55–60° mit der doppelten Menge defibrinierten Kaninchenblutes. Das Optimum für die Kulturen ist 25°.

Noch bessere Resultate erzielt man mit der Kultur von Trypanosomen auf Agarplatten nach dem Verfahren von Nöller: Verflüssigter Bouillonagar (1 % Agar, 1 % Dextrose, 100 schwach alkalische Pferdefleischbouillon) wird mit der gleichen Menge Pferdeblut gemischt und sogleich in Petrischalen zu hohen Platten ausgegossen. Die Schalen werden umgedreht aufgestellt; alsdann gießt man in den Deckel etwas Sublimatlösung, so daß dieser von einer 1–2 mm dicken Schicht bedeckt ist, die gleichzeitig zur Steril- und zur Feuchterhaltung dient. Die einzelnen Trypanosomenarten haben, auf diesen Nährboden verimpft, ganz charakteristische Koloniewuchsformen.

Bei der Übertragung der Trypanosomen spielen die Tsetsefliegen eine große Rolle, und es seien hier einige

bis jetzt bekannte, methodologische Andeutungen über die Untersuchung dieser Fliegen gestattet.

Die Glossinen kommen meist im lichten Baum- oder Buschbestand vor und folgen den Flußläufen sowie sumpfigen Ufern der Seengebiete, obzwar sie Sander und Lommel auch entfernt von Flüssen angetroffen haben. Das Verbreitungsgebiet der Fliegen ändert sich etwas in der Regenzeit. Sie sind an besondere Örtlichkeiten, die sog. Fliegengürtel (Flybelts), gebunden und sind schattenliebend. Zupitza (Beihefte z. Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1908) fand die Puppen auch im Humus, Moos, Astgabeln der Bäume, Blattscheiden der Palmen usw.

Nach Stuhlmann (Anat. und Physiologie der Tsetsefliege, Pflanze Nr. 24, 1905) muß man die Fliegen in der Gefangenschaft jeden 4.—5. Tag füttern, indem man das mit Gaze zugebundene Glas einfach einem Tier (Maultier, Rind usw.) auf die Haut setzt. Die Fliegen untersucht man möglichst frisch in 0,75 % iger Kochsalzlösung oder im Blutserum (Ausstrichmethode). Den Fliegen werden zunächst die Flügel und Beine abgeschnitten, der letzte „Leibesring“ entfernt und von hier aus der Darm herauspräpariert. Durchschnitt des Leibes. Darmsaft. Für anatomische Zwecke tötet man sie im heißen Wasser oder heißen, schwachen Alkohol ab (Stuhlmann). Für Schnittserien empfiehlt sich eine Konservierung in der mehrfach erwähnten Sublimatalkohollessigsäuremischung. Auswaschen in Jodjodkaliumalkohol, Alkoholreihe, Xylol, Paraffineinbettung. Färbung: Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung (der zweiten Differenzierungsbeize gleich zuzusetzen) oder Romanowskyfärbung oder Hämalan.

Zum genauen experimentellen Studium der Übertragung des Rattentrypanosoma durch Flöhe bedient man sich der „Flohzirkusmethode“ nach Nöller,

Fesselung der einzelnen Flöhe mit feinem Silberdraht (Arch. f. Protistenk. Bd. 25, 1912).

Die Leishmanien (Kala-azar-, Orientbeule-Erreger)

werden im wesentlichen in gleicher Weise untersucht wie die Trypanosomen, d. h. zur Diagnose und Orientierung auf Trockenausstrichen nach Fixierung in absolutem Alkohol oder Osmiumdämpfen (S. 82) mit Giemsa-Romanowskyfärbung, zur genaueren morphologischen Bearbeitung auf feucht-fixierten (Sublimatalkohol oder Flemmingsche Lösung) und feucht weiter behandelten Ausstrichpräparaten oder auch auf Schnitten der infizierten Organe. Färbung: feuchte Giemsaefärbung (S. 19) oder Eisenhämatoxylin, evtl. mit Eosinnachfärbung; für Schnitte auch Saffranin.

Die Kala-azar-Erreger finden sich nur selten im peripheren Blut, dagegen in großen Mengen in Milz, Knochenmark und Leber. Bei Milzpunktion empfiehlt Rogers, innerlich zur Beförderung der Blutgerinnung Kalziumchlorid zu verabreichen, höchstens 1 ccm Blut aus der Milz zu entnehmen (Kompressionsverband).

Die Leishmanien lassen sich leicht kultivieren. Rogers setzte zu diesem Zwecke zum Milzpunktat eine geringe Menge von 5 % igem Natrium citricum und kultivierte bei 22°. Jetzt wird vor allem der von Nicolle modifizierte Nährboden von Novy und Mac Neal (S. 50) verwandt (sog. N-N-N-Agar): Agar 14,0 g + Seesalz 6,0 g + 900,0 ccm Wasser, dem $\frac{1}{3}$ defibriertes Kaninchenblut zugesetzt wird. Keine Neutralisierung oder Alkalisierung; schräg erstarren; dann 2—3 Stunden in 37°; um Verdunstung zu verhüten, oben mit Paraffin oder gut anliegender Gummikappe verschließen; im Dunkeln bei Zimmertemperatur züchten.

III. Sporozoa.

I. Haemosporidia.

Malaria.

Für diagnostische Zwecke dienen ebenso wie bei den Trypanosomen, vor allem Bluttrockenausstriche.

Man sticht mit einer ausgeglühten Nadel, Lanzette, neuen Feder oder mit einem Blutschnepper (bequem bei der Untersuchung der Kinder) in das Ohrläppchen oder die Fingerbeere, die vorher mit Alkoholäther gut gereinigt wurde, ein, läßt den ersten Blutstropfen abfließen und fängt den zweiten mit der Kante eines Deckgläschens, mit einem dünnen Glasstab oder direkt auf einem gut gereinigten Objektträger auf und zieht ihn, wie S. 14 angegeben, dünn aus, läßt die Präparate lufttrocken werden, fixiert dann 10–15 Minuten in absolutem Alkohol oder einer Mischung von Alkohol (96 %ig) und Äther zu gleichen Teilen, läßt dann wieder trocknen und färbt nach einer der folgenden Methoden. (Die fertigen Präparate sind möglichst trocken über Chlorkalzium aufzubewahren. Es ist darauf zu achten, daß sie besonders beim Transport nicht der Körperwärme und dem Schweiß ausgesetzt werden.)

I. Für rasche Diagnosenstellung ist die einfache Färbung mit Mansons Methylenblaulösung zu empfehlen:

Stammlösung: 100 ccm Wasser (kochend),
Borax 5,0,
Methylenblau med. pur. Höchst 2,0.

Die Lösung wird so stark verdünnt, daß das Licht durchscheint. Man färbt bei frischen Präparaten etwa 10–15 Sekunden, bis das Präparat mattgrün ist.

Alte Präparate werden mit 1 %iger Methylenblaulösung (+ 0,2 % Soda) gefärbt, doch fällt bei sehr

alten, aus den Tropen stammenden Präparaten die Färbung oft schlecht aus.

II. Meistens werden die Malariapräparate mit einer der Modifikationen der Methode von Romanowsky gefärbt, und zwar bedient man sich jetzt im allgemeinen der fertigen käuflichen (Grübler) Giemsa-Lösung (1 Tropfen auf 1 ccm Aqu. dest. Färbung bis gegen 1 Stunde, abspülen mit scharfem Wasserstrahl, trocknen, Zedernöl). Falls aber kein gutes destilliertes Wasser zur Verfügung steht und der Farbstoff ausgefällt wird, wende man die alte Schaudinn-Hoffmannsche Methode für Spirochätenfärbung an (vgl. S. 82).

Gute Resultate erhält man auch mit der Modifikation von Schilling. Gebraucht werden dazu

Lösung A:

Methylenblau medicin. Höchst	0,4 g,
Borax	0,5 g,
Aqu. dest.	1000,0 ccm.

Lösung B:

Eosin BA Extra Höchst.	0,2 g,
Aqu. dest.	1000,0 ccm.

Beide Lösungen werden zu gleichen Teilen gemischt, am besten unmittelbar auf der Blutschicht, wofür von Schilling ein kleiner Apparat (käuflich bei Lautenschläger-Berlin) konstruiert ist. Färbedauer 10 bis 15 Minuten.

Bei schwacher Infektion bediene man sich zur Diagnosestellung der Methode des „dicken Tropfens“ S. 48. — Höfer (Zentralbl. f. Bakt. I Bd. 83, 1919) gibt folgende Methode zum Nachweis spärlich vorhandener Blutparasiten an: Das zu untersuchende Blut wird (ca. 10 ccm) steril in 2%igem Natr. citr. aufgefangen, zentrifugiert und wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Als-

dann setze man zum Zentrifugat bei 37° ein spezifisches hämolytisches Serum hinzu und bringe das Blut dadurch zur Lösung. Man muß dabei mehrmals zentrifugieren, die überstehende Flüssigkeit abpipettieren und das hämolytische System erneuern. Nach vollständiger Hämolyse zentrifugiere man nochmals, wasche den Bodensatz mehrmals mit Kochsalzlösung aus und untersuche ihn dann. Er enthält neben einigen Leukozyten im wesentlichen nur die Parasiten. Für eingehendere cytologische Untersuchungen muß man aber auch bei den Hämosporidien Methoden der nassen Konservierung und Weiterbehandlung anwenden.

Schaudin (Studien über krankheitserregende Protozoen II *Plasmodium vivax*, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 19, Heft 2, 1902) empfiehlt die Fixierung mit Hermannscher Flüssigkeit (s. S. 28/29).

Einige Tropfen Blut läßt man direkt in ein Zentrifugiergläschen mit der erwähnten Fixierungsflüssigkeit hineinfallen, wäscht unter Zentrifugieren mit Aqua dest. aus, Wasser, setzt einige Tropfen Grenachers Hämatoxylin zu und untersucht nach einiger Zeit entweder im Wasser, Glyzerin oder essigsauerm Kali (gut für achromatische Strukturen), oder man bringt das Blut durch die Alkoholreihe in Xylol und Zedernöl.

Am meisten anzuraten ist jetzt die Fixierung feuchter Ausstriche mit Sublimatalkohol und Färbung und Weiterbehandlung nach der feuchten Giemsa methode (S.19). Färbung mit verdünntem Delafields Hämatoxylin oder Heidenhains Eisenhämatoxylin (Beize 24 Stunden, ebensolange Färbung) fällt wegen des Hämoglobins selten gut aus, dagegen bei Hämosporidien der Kaltblütler zu empfehlen; Gewebstücke (Milz) werden in toto mit Sublimatalkohol oder mit Hermannscher Mischung fixiert, Auswaschen, Alkoholreihe, Chloroform, Chloroformparaffin, Paraffineinbettung. Für die Färbung der Schnitte ist zu empfehlen:

Hämalaun oder Eisenhämatoxylin mit Eosin oder Bordeauxrotnachfärbung (Bordeauxrot ist in Spuren der Differenzierungsbeize zuzusetzen).

Bei genaueren Malariauntersuchungen ist das Studium des lebenden Objektes nicht zu vergessen! Dazu ist allerdings gutes Licht und Übung in der Blendenbenutzung Voraussetzung. Nach Schaudinn kann man mit einiger Vorsicht denselben Parasiten 3 bis 4 Stunden unter dem Mikroskop ohne Entwicklungsstörungen beobachten.

Auf einen entfetteten Objektträger bringt man einen kleinen Blutropfen, legt darüber rasch ein Blutdeckgläschen, so daß überall an den Rändern etwas von dem Blut, das mit Fließpapier entfernt wird, austritt, und umrandet das Präparat mit Vaseline oder Wachs. F. Plehn entnimmt das Blut unter Vaselineabschluß aus der Fingerbeere und fängt es auf einem Deckglas mit einem Tropfen flüssigen Paraffins auf, so daß das Blut kaum mit der Luft in Berührung kommt. Schaudinn benutzte auch die feuchte Kammer nach F. E. Schulze. Sie wird mit grünen Algen beschickt und zugedeckt in den Thermostaten (über 37°) gestellt. Heizbarer Objektisch (nach Pfeiffer) ist zu empfehlen. Vitalfärbungen mit Methylenblau und Neutralrot bieten keine wesentlichen Vorteile.

Für die anderen Hämosporidien (Piroplasmen, Hämoпротеus u. a.) gelten die gleichen Untersuchungsregeln wie für die Malariaparasiten, d. h. für diagnostische Zwecke Trockenausstriche mit Giemsa-Romanowskyfärbung; für genauere Studien Fixierung mit Sublimatalkohol (evtl. + Eisessig s. S. 15), Hermannscher oder Flemmingscher Lösung und Färbung nach der feuchten Giemsa-methode (S. 19), mit Delafields Hämatoxylin (Kaltblütlerhämosporidien) oder Eisenhämatoxylin (nach Heidenhain oder

Breinl-Rosenbusch S. 46). Für die Babesien (Piroplasmen) sind nach Kossel auch basische Anilinfarbstoffe wie Methyl- und Gentianaviolett geeignet.

Malariaparasiten (und Babesien) können sich auch außerhalb des menschlichen bzw. tierischen Körpers bei Zusatz von etwas Dextrose zum Blut bei ca. 40° weiter entwickeln. Solche „Kulturen“ nach Bass erhält man bei steriler Blutentnahme und Auffüllung von je 10 ccm dieses Blutes in sterile Reagensgläser mit 0,1 ccm steriler 50 % iger Dextroselösung. Alsdann defibriert man mit einem Glasstab, gießt die Flüssigkeit ab und läßt absetzen. An der oberen Grenze der Blutkörperchenschicht kann man dann die Weiterentwicklung der Parasiten nachweisen; doch handelt es sich offenbar immer nur um die Vollendung bereits eingeleiteter Schizogonien.

Überträger der Malaria sind Anopheles. Für ihren Fang bedient man sich eines breiten Zylinderglases, das oben mit einem dicht schließenden, in der Mitte durchbohrten Korkpfropfen verschlossen ist. Durch die Öffnung wird ein niedriger Glas- oder besser Blechtrichter durchgesteckt, den man behutsam über die meist auf der Decke oder in einem schattigen Winkel sitzende Anophele stülpt und sie dann mit einem viereckigen Blechstück, das man rasch zwischen die Unterlage und den Trichterrand durchschiebt, in den Trichter hinein-jagt; meist fliegt die Mücke auf und kommt so von selbst in das Zylinderglas, evtl. kann man durch geeignetes Schütteln sie dahin treiben. Auch kann man die Mücke beim Fang in eine breite Glasröhre, die an dem einen Ende mit einem Gummischlauch und Ballon versehen ist, gleichsam hineinsaugen, indem man sich ihr mit dem freien Röhrenende vorsichtig nähert.

Für Transportzwecke sammelt man die Mücken in einem zweiten, größeren, trockenen Glasgefäß, das oben mit Gaze verschlossen ist. Auch kann man etwas Reisig hineinlegen.

Für Versuchszwecke ist ein viereckiger, mit Gaze überzogener Käfig zu empfehlen, in den man die Mücken hineinläßt. Er muß so groß sein, daß für Proteosoma- oder Halteridiumversuche ein anderer Käfig mit Sperlingen oder Käuzchen hineingesetzt werden kann. Auch muß man unter den Gazekäfig eine flache Schale mit Wasser setzen, damit die vollgesogenen Mückenweibchen Gelegenheit haben, die Eier abzulegen.

Schaudinn brachte in die Gazekäfige blühende Pflanzen und verschiedene fein geschnittene Früchte, die ab und zu durch eine Schale mit Himbeer- oder Kirschsafft ersetzt wurden. Er konnte Männchen und Weibchen bei dieser Fruchtnahrung über zwei Monate erhalten. Der Gazekäfig muß vorn einen gut schließbaren Ausschnitt zum Durchstecken des Armes eines Malariakranken für Versuchszwecke enthalten. In der Dämmerung saugen die Anophelenweibchen leicht. Tiere, die sich zur Überwinterung eingerichtet und bereits Fett „angesetzt“ haben, muß man vor dem Saugen hungern und bei einer Temperatur von 24 bis 30° C (in die sie nach und nach zu bringen sind) ihr Fett aufzehren lassen. Die vollgesogenen Weibchen werden dann bei verschiedenen Temperaturen in eigenen gazeüberzogenen Gläsern gehalten und zum Zwecke der Untersuchung zu verschiedenen Zeiten nach dem Saugakt getötet (Äther).

Bei Versuchen mit Proteosoma darf man die Culexmücken nicht an allzu stark infizierten Vögeln saugen lassen, da für die Mücken unter Umständen die Parasiten pathogen sind.

Bei der Präparation der Mücken, die man vorteil-

haft auf einer schwarzen Unterlage vornimmt, verfährt man folgendermaßen: Beine und Flügel der mit Äther getöteten möglichst frischen Mücke werden abgeschnitten und die Mücke wird in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dann sticht man zum Zwecke der Fixierung mit einer Präpariernadel den Thorax an, während mit einer anderen, etwas abgestumpften Präpariernadel der letzte Abdominalring abgequetscht und langsam abgezogen wird. Es kommen zuerst die weißen Eierstöcke, dann ein weißlicher Strang — der Darm — mit dem Gewirre von malpighischen Gefäßen zum Vorschein. Das Herausziehen der Eingeweide muß vorsichtig geschehen, damit der Darm nicht frühzeitig durchreißt. Später trennt man den Thorax durch und bekommt so die oben genannten Organteile samt dem Magen frei. Für die ersten Stadien der Zystenbildung muß man den blutgefüllten Magen herauspräparieren. Sobald dieses geschehen ist, legt man das Organpräparat in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und entfernt das überschüssige Blut durch vorsichtiges Quetschen und Auffallenlassen eines Deckgläschens auf den blutgefüllten, dunkeln Magen. Diese Prozedur muß man mehrmals wiederholen. Von dem ausgetretenen Blut können Ausstriche angefertigt werden.

Der Darm kann für Schnitte in Sublimatalkohol (s. S. 15) konserviert werden. Für Totalpräparate wird der Darm in der Leibeshöhlenflüssigkeit zerzupft und das mit diesen Teilen bestrichene Deckglaspräparat mit der Objektseite wagrecht auf die heiße Sublimatalkoholmischung fallen gelassen. Alles Weitere vgl. S. 15. Für die Durchfärbung der Zysten eignet sich stark verdünntes Grenachers Hämatoxylin (käuflich bei Grübler). Den Grad der Färbung kontrolliert man am besten unter dem Mikroskop. Abspülen im Brunnenwasser, Alkoholreihe, Xylol, Zedernöl.

Totalpräparate von Mücken werden in Alkohol fixiert, in Glyzerin aufgehell't und mit Asphaltlack umrandet.

Für die Präparation der Speicheldrüsen trennt man mit dem Froschschen Messerchen den Dorsalteil des Thorax ab, luxiert den Kopf dorsalwärts, bis der Halsteil von dem restlichen Thorax, der mit einer Präpariernadel zu fixieren ist, abgetrennt wird. Bei dieser Operation bleiben die Speicheldrüsen an dem Halsteil hängen. Die Speicheldrüsen werden dann völlig frei unter dem Mikroskop herauspräpariert. Bei dieser Prozedur ist es angezeigt, die überschüssige Kochsalzlösung durch Fließpapier zu entfernen. Die ganze Speicheldrüse besteht aus zwei langen Seitenschläuchen und einem mittleren kürzeren Teil, der Giftlappen genannt wurde. Bei der letzten Präparation bediene man sich verschieden geschärfter oder mit einem Häkchen versehener Präpariernadeln. Eine binokuläre Präparierlupe (s. S. 2) mit Stützplatten leistet dabei gute Dienste.

Schaudinn untersuchte die ersten Stadien der Sporogonie nur in der Körperflüssigkeit aus dem Abdomen von etwa 6—10 rasch vorher präparierten Anophelen (nicht Normalsalzwasser oder Eiweiß).

Für Schnitte müssen die in Sublimatalkohol konservierten, der Beine und Flügel beraubten Mücken an mehreren Stellen ihres Körpers Öffnungen zum Eintritt von Paraffin erhalten. Für Zelloidinschnitte legt Eysell die Mücken in einen Einschnitt von Sonnenblumenmark und entfernt mit einem in Alkohol befeuchteten Messer einzelne oberflächliche Teile des Kopfes, Thorax und Abdomens.

Für besondere Experimente muß man die Culiciden und Anophelen selbst aus den Eiern züchten. Man läßt zu diesem Zwecke die blutgesogenen Weibchen in den Gazekäfigen ihre Eier an die Oberfläche der obener-

wähnten Glasschale absetzen und sorgt für die Fütterung der ausgekrochenen Larven.

Nach Schaudinn sind die Anopheleslarven mehr Fleisch-, die Culexlarven mehr Pflanzenfresser. Anopheleslarven hält man in 10—15 cm breiten, 4—5 cm tiefen, mit Algen besetzten Glasschalen zu etwa zwanzig Stück, filtriert für diese aus einer mit etwas Jauchewasser versetzten Cladoceren- (Wasserflöhe-) Kultur einige Dutzend Wasserflöhe ab, zerkleinert sie und streut sie auf die Oberfläche der Glasschalen. Auch junge Culexbrut kann, in derselben Weise behandelt, als Futtermittel dienen. Damit das Wasser nicht faulig wird, muß man es jeden dritten Tag wechseln.

Die übrigen Hämosporidien und ihre Überträger werden in ähnlicher Weise untersucht. — Jedesmal muß man die Biologie des betreffenden Zwischenwirts genau studieren und diesen womöglich aus dem Ei züchten, da Doppel- und Mehrfachinfektionen der übertragenden Zwischenwerte vorkommen können, die dann das ohnehin verwickelte biologische Bild erheblich trüben. Dabei darf man die Möglichkeit einer Übertragung der Infektionserreger auf die Eier nicht außer acht lassen.

Literatur.

- Eysell, Wie weist man Hämosporidien im Culicidenleibe nach?
Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1902.
Grassi, Die Malaria. Studien eines Zoologen. Jena, G. Fischer.
Mühlens, P., Die Plasmodien. Handb. d. pathogen. Protozoen
Bd. III, Leipzig, J. A. Barth 1921.
Ruge, Malariaparasiten in Handb. d. pathogen. Mikroorg., 2. Aufl.,
B. VII. Jena, G. Fischer.

2. Coccidiida.

Materialbeschaffung: Im Dünndarm und der Leber des Kaninchens *Eimeria stiedae* häufig, im Darm des Tausendfußes (*Lithobius*) fast immer eine oder mehrere Coccidienarten anzutreffen.

Die Untersuchung der Coccidien hat am lebenden Objekt (am besten im natürlichen Medium, sonst in

physiologischer Kochsalzlösung oder in einer Eiweißlösung (v. Wasielewski), die aus 20 ccm Hühner-eiweiß, 1 g Kochsalz und 200 ccm Wasser hergestellt wird), an Ausstrichpräparaten und Schnitten zu erfolgen. Fixiert wird mit Sublimatalkohol + Eisessig, mit Flemmingscher oder Hermannscher Lösung, auch mit Pikrinessigsäure oder Bouins Gemisch.

Pianese (Arch. parasit. Paris, t. 2, 1899) fixiert die Lebercoccidien in einem Gemisch von 20 ccm 10 % iger wäßriger Kobaltchloridlösung, 5 ccm 2 % iger Osmiumsäurelösung und 1 Tropfen Ameisensäure. Zur Anfertigung von Schnitten werden kleine Stückchen von Darm, Leber oder sonstigen infizierten Organen auf längere Zeit (vgl. S. 16—17) in die Fixierungsflüssigkeit gebracht und nachher sorgfältig ausgewaschen. Es empfiehlt sich, Darmstückchen gleichzeitig von innen und außen zu fixieren, indem man sie zunächst an einem Ende zubindet, die Fixierungsflüssigkeit mit einer Pipette hineinspritzt, dann rasch auch am anderen Ende zubindet und sie so in ein Gefäß mit der gleichen Fixierungsflüssigkeit bringt.

Gefärbt wird mit stark verdünntem Delafields Hämatoxylin — 1 ccm der (bei Grübler-Leipzig) käuflichen Lösung auf 100—200 ccm Wasser — 24 Stunden; handelt es sich um Zysten, so erfolgt die Färbung am besten im 37° Thermostaten, evtl. auch mehrere Tage unter wiederholtem Wechsel der Farblösung. Bei Überfärbung differenziert man mit schwachem salzsäuren Alkohol und wäscht alsdann in Leitungswasser aus. Auch mit Hämalan erhält man gute Färbungen, evtl. nachfärben mit Eosin; dies auch nach Delafields Hämatoxylin. Sehr zu empfehlen ist ferner Eisenhämatoxylin und Nachfärbung mit Bordeauxrot. Man setzt am besten der Differenzierungslösung etwas Bordeauxrot zu. Auch Eosin (in starker, längere Zeit einwirkender Lösung) und Orange G eignen sich zur

Nachfärbung. Schöne Bilder, besonders nach Fixierung in Osmiumgemischen, erhält man mit Safranin-Lichtgrün. In manchen Fällen geeignet sind schließlich feuchte Giemsa-Färbung, Gentianaviolett und Vesuvin.

Zum Studium der Auswanderung und Schicksale der Sporozoiten empfiehlt es sich, die künstliche Infektion der Wirtstiere vorzunehmen. Die Sporozoiten der Lebercoccidien des Kaninchens schlüpfen auch *in vitro* unter Einfluß von Pancreatin depurat (von Dr. Grübler, Leipzig, geringe Menge in 2–3 ccm Wasser mit Spur Sodazusatz) aus.

Literatur.

- Reich, F., Das Kaninchencoccid *Eimeria stiedae*. Arch. f. Protistenk., Bd. 28, 1912.
Reichenow, E., Die Coccidien, Handb. d. pathogen. Protozoen Bd. III, Leipzig, J. A. Barth 1921.
Schaudinn, F., Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool. Jahrb., Bd. 13, 1900.

3. Gregarinida.

Materialbeschaffung: Im Darm der Küchenschabe und des Mehlwurms, ferner in der Samenblase des Regenwurms findet man fast regelmäßig Gregarinen verschiedener Arten.

Die Art der Bewegung der Gregarinen wird zunächst in einem durch Karminpulver oder Tuschesuspension gefärbten Medium untersucht (Schleimproduktion, Gleiten). Für das Studium der Einschlüsse bedient man sich der Vitalfärbungen (Neutralrot, Brillantkresylblau) sowie einer wäßrigen Lösung von Jodjodkalium (Glykogen) oder Methylviolett. Die Präparate werden in Lävulose oder Gummiglyzerin aufbewahrt.

Neben den mit Jodjodkali braungelb färbbaren Körnern, die Bütschli Paraglykogen nennt und die bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure einen violetten Farbenton annehmen, gibt es noch sog. karminophile

Granula, die sich nach der Fixierung mit Pikrokarmin und Essigkarmin färben.

Zur Fixierung ist, abgesehen von Sublimatalkohol + Eisessig (S. 15), Pikrinessigsäure (S. 16), Flemmingscher oder Hermannscher Lösung, besonders das Bouinsche Gemisch (S. 36) zu empfehlen, auch in der etwas anderen Zusammensetzung von Brasil (Pikrinsäure 1 g, Essigsäure 10 ccm, Formol (wäßrige Handelslösung) 50 ccm, Alkohol 75 %ig 150 ccm). Gebraucht wird auch Carnoys Gemisch (Alkohol absol. 6 Teile, Chloroform 3 Teile, Eisessig 1 Teil). Schwierig ist die gute Fixierung der derbwandigen Zysten. Schellack präpariert die starken Zystenhüllen mit feinen Nadeln ab und fixiert dann mit dem Bouinschen Gemisch.

Sonst kann man den Zysteninhalt durch Zerpressen der Zyste freilegen und nach Art der nassen Ausstriche fixieren und färben.

Färbungen: Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung, Hämalan, Safranin, Pikrokarmin. Für Schnitte ist ferner die Färbung nach Mallory zu empfehlen (s. S. 66), für Totoobjekte auch Boraxkarmin (Giemsafärbung ist für Gregarinen im allgemeinen weniger geeignet, besser die Färbung nach Mann (1 %ige wäßrige Eosinlösung 35 ccm, 1 %ige wäßrige Methylblaulösung 35 ccm, Aqu. dest. 100 ccm).

Für das Studium der Kutikula und ihrer Streifung leisten die in der allgemeinen Histologie üblichen Methoden der Vergoldung und Versilberung (vgl. Lee-Mayer, Grundzüge der mikroskop. Technik) in vielen Fällen gute Dienste.

Literatur.

Schellack, Die Gregarinen in Handb. d. pathogen. Protozoen, Bd. 1, 1912. Leipzig, J. A. Barth.

IV. Amoebosporidia.

1. Cnidosporidia.

Myxosporidien und Mikrosporidien untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man die Parasiten oder die parasitenhaltige Flüssigkeit unter ein mit Wachsfüßchen unterstütztes Deckglas bringt. Von dem mit Myxosporidien behafteten Gewebe stellt man Quetsch- oder Zupfpräparate her.

Für das Ausstoßen der Polfäden wird eine ganze Reihe von Reagenzien angegeben: Soda, Potasche (direkt oder nach Eintrocknung der Sporen), Glyzerin, Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Jodlösung, Aqua destillata, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan: Recherches sur les Myxosporidies. Bull. sc. de la France et de la Belgique 1895). Auch Fäulnisprozesse können das Herausschleudern der Polfäden bewirken, ebenso Druck.

Von der Anwesenheit der Vakuole im Amöboidkeim kann man sich durch Zusatz von Alkohol, Osmiumsäure, schwacher Salpetersäure, 2 % igem Silbernitrat überzeugen. Durch Zusatz von alkoholischer Jodlösung oder Lugolscher Lösung werden die Vakuolen oft mahagonibraun gefärbt. Trennung der die Spore zusammensetzenden Schalen wird bewirkt durch Potasche, Soda, Schwefelsäure, Salpetersäure, langen Aufenthalt im Wasser, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan) und Fäulnis.

Für genauere Untersuchungen fertigt man Deckglasausstriche und Schnittpräparate an. Die Methode der Trockenausstriche mit Giemsa färbung von Sporenmaterial oder Entwicklungsstadien der Sporen ist nicht ratsam. Zur Fixierung eignet sich vor allem das Flemmingsche (S. 16) oder das Hermannsche (S. 28) Gemisch, ferner Sublimatalkohol + Eisessig (S. 15), auch Kaliumbichromatessigsäure nach Tellyesniczky:

Kaliumbichromat 3 g, Essigsäure 5 ccm, Wasser 100 ccm. Kleine Objekte bleiben darin 1–2 Tage, werden gut mit Wasser ausgewaschen und durch die Alkoholreihe von 15 % an durchgeführt. Ferner kann man das Orthsche Gemisch (10 Teile Müllersche Flüssigkeit¹⁾ + 1 Teil Formol), Pikrinessigsäure und nach Doflein Pikrinschwefelsäure (1 ccm konz. Schwefelsäure auf 100 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung in Wasser) anwenden.

Gute Färbungen der Sporen erhält man nach Sublimatfixierung, vor allem mit Gentianaviolett (konzentrierte wäßrige Lösung, mehrere Stunden färben), sowie mit der Giemsa-Färbung (S. 19). Außer diesen beiden Färbungen sind für Schnitte wie Ausstriche auch Delafields Hämatoxylin, Hämalaun, Safranin, Boraxkarmin sowie Eisenhämatoxylin (evtl. mit Orange-G-Nachfärbung) anzuraten.

Für Kernfärbungen behandelten Schuberg und Schröder die Zysten 2–3 Tage bei 56° C mit Boraxkarmin vor, betteten die Objekte ein und färbten die 3–5 µ dicken Schnitte mit Methylenblau oder Methylgrün nach. Schöne Färbungen erhielten sie bei Boraxkarminvorfärbung und Anwendung der von Blochmann modifizierten van Giesonschen Färbung.

„Benutzt wurde eine 0,01 %ige Lösung von triphenylrosanilintrisulphosaurem Natrium in gesättigter, wäßriger Pikrinsäurelösung. Hierin wurden die Schnitte bis zu 12 Stunden belassen. Die Schale der Sporen färbte sich gelb, Sporoplasma und Polkapseln grün bei roter Kernfärbung“ (Arch. f. Protistenk. 6. Bd., 1905). Sehr differente Färbungen liefert die wichtige Methode von Mallory. Die Paraffinschnitte (Xylol, Alkoholreihe, Wasser) kommen in $\frac{1}{10}$ %ige Säurefuchsinlösung, dann 1 %ige Phosphormolybdänsäure,

¹⁾ Müllersche Flüssigkeit: Kaliumbichromat 2–2½ g, Natriumsulfat 1 g, Aqu. dest. 100 g.

dann in eine Lösung von Anilinblau (0,5 %) + Orange G (2,0 %) und Oxalsäure (2,0 %) gelöst in destilliertem Wasser (5 Minuten Färbedauer) rasches Abspülen in Wasser, gleich 96 % iger Alkohol, bald Alc. absolut., Xylol und Kanadabalsam. Färbung manchenmal launenhaft.

Materialbeschaffung: In der Gallenblase des Seepferdchens (*Hippocampus guttulatus*) findet sich fast immer eine Myxosporidienart (*Sphaeromyxa*), in der Harnblase des Hechtes häufig *Myxidium Lieberkühni*. Mikrosporidieninfektionen häufig beim Stichling (*Gasterosteus*), auch im Darm der Biene.

Für Infektionsversuche mit Myxosporidien wird das Sporenmaterial in Filtrierpapier eingewickelt, mit einer Schnur befestigt und einem Fisch zum Verschlucken gegeben. (Vgl. auch die Ausführungen von Thélohan.) Für Infektionsversuche mit Pebrine genügt es, das Sporenmaterial mit einem Pinsel an frische Maulbeerblätter aufzutragen und diese nach dem Abtrocknen an junge Seidenraupen zu verfüttern.

2. Sarkosporidia.

Sarkosporidien werden im wesentlichen in gleicher Weise untersucht wie Myxo- und Mikrosporidien.

Die Untersuchung im Leben erfolgt am besten im Gewebssaft, in physiologischer Kochsalzlösung, in Eiweißlösung (Eiweiß 20, 1 g Kochsalz, Aqua dest. 180) oder im filtrierten menschlichen Speichel (evtl. heizbarer Objektisch).

Anzufertigen sind Schnittpräparate der infizierten Muskeln sowie Ausstriche aus den Sarkosporidienschläuchen. Fixierung wie bei Myxo- und Mikrosporidien. Bei verkalkten Muskelschläuchen ist eine Konservierung mit dem Gemisch von Perényi angezeigt, das sonst nicht besonders zu empfehlen ist (s. S. 36).

- Zur Färbung eignen sich vor allem: Eisenhämatoxylin mit Eosin oder Bordeauxrot-Nachfärbung, Giemsa's Färbung sowie Methylenblau. Alexejeff (Arch. Zool. experiment. t. 51, 1913) bringt die mit Eisenhämatoxylin gefärbten Präparate nach Differenzierung für 1 Minute in 2%ige wäßrige Eosinlösung, dann ohne Waschen gleichfalls auf 1 Minute in ca. 1%iges Pikroindigkarmin. Von dort durch die Alkoholstufen und Xylol in Kanadabalsam. Nicolle färbt mit Karbolthionin (100 ccm 1%iges Karbolwasser, 10 ccm gesättigte Lösung von Thionin in 5%igem Alkohol). Auch die anderen für Myxosporidien angegebenen Färbungen sind anwendbar. Trockenausstriche der Sporen (gefärbt nach Giemsa oder Methylenviolett, Gentiana und Fuchsin nach Kitt) genügen höchstens für die erste Orientierung.

Materialbeschaffung: Mit *Sarcocystis tenella* infiziertes Hammelfleisch erhält man leicht vom Schlachthof. Durch Verfütterung fein verhackter Sarkosporidienschläuche mit Kleie an Mäuse gelingt leicht deren Infektion (dauert nach Erdmann 2—3 Monate).

Für Haplosporidien gelten die gleichen technischen Vorschriften wie für Cnido- und Sarkosporidien.

V. Ciliata.

Infusorien kann man sich in größerer Menge durch das Anlegen von Infusionen aus Heu, Stroh, Pferdemit, Pflanzenblättern usw. beschaffen. Rohkulturen von Paramäcien werden nach den Angaben von R. Hertwig auch in folgender Weise gewonnen: Teilstücke der Kiemen und des Fußes der Teichmuschel (*Anodonta*) werden ins Wasser gelegt, worauf sich nach einigen Tagen Paramäcien oben am Wasserrande ansammeln. Diese sammelt man mittels einer gut ge-

reinigten Pipette und überträgt sie in Zuchtgläser mit Teichwasser oder abgestandenem Leitungswasser, in das an einer Schnur ein Gazebeutelchen mit zerkleinerten Salatblättern hineingehängt wird. Bald entwickeln sich zahlreiche Fäulnisbakterien, die den Paramäcien zur Nahrung dienen. Die Salatblätter muß man öfters wechseln. Colpidien-Rohkulturen gewinnt man entsprechend aus Heuinfusionen, indem man hernach die Protisten in einen aufgekochten Blätteraufguß bringt.

Kulturen von einem Individuum aus legt man in der Weise an, daß man sich entsprechende Verdünnungen aus dem Infusorienwasser anfertigt, mittels Kapillarröhrchen wenige Protozoen herausfängt, ihre Zahl in einem ausgehöhlten Objektträger feststellt, nach einer abermaligen Verdünnung die Prozedur wiederholt, bis es gelungen ist, ein Protozoon zu isolieren, das man mit den entsprechenden Bakterien in einer „Reinkultur“ weiterzüchtet.

Größere Ziliaten: Paramäcien, Stylonychien, Stentoren u. a. lassen sich auch unschwer direkt einzeln unter der Lupe mit einer Pipette aus einer verdünnten Rohkultur herausfischen.

Derartige Einzellkulturen („Individuallinien“, „Klone“) sind für exaktere experimentelle Untersuchungen unerläßlich. Sie werden in einem möglichst konstanten Medium geführt. Bewährt haben sich hierbei, besonders für Paramäcienzuchten, Lösungen von 0,025 % igem oder 0,0125 % igem Liebig-Fleischextrakt in destilliertem Wasser (Woodruff), die evtl. durch Zusatz von etwas Sodalösung neutralisiert werden. Zu empfehlen sind ferner Heuabkochungen (immer das gleiche, abgewogene kleine Quantum Heu wird in 1 l destilliertem Wasser gekocht; dann filtrieren) und Salatabkochungen (es wird ein großer Kopf Salat in 1 l destilliertem Wasser längere Zeit gekocht, das Filtrat der Abkochung als Stammlösung steril auf-

bewahrt, vor Gebrauch auf die Hälfte oder noch stärker verdünnt).

Um auch die Bakterienflora möglichst einheitlich zu gestalten, werden die Kulturlösungen bei ganz exakten Versuchen mit einer bestimmten, gut wachsenden Bakterienart, z. B. *Bact. proteus*, vorbeimpft und die Paramaecien vor Übertragung durch Waschpassagen, Kulturgefäße mit steriler Kulturlösung, hindurchgeführt, in denen sie sich vom größten Teile der mitgeführten Bakterien befreien (vgl. Jollos, Experimentelle Protistenstudien I. Jena, G. Fischer, 1921). Wichtig ist die reine Beschaffenheit des verwandten destillierten Wassers. — Infolge der Anhäufung von schädigenden Stoffwechselprodukten in Massenzuchten müssen zur dauernden Erhaltung der Kulturen von Zeit zu Zeit einige Infusorien in frische Nährlösung übertragen werden. (Bei Zucht in $\frac{1}{4}$ -Liter-Gläsern in 0,0125 % iger Liebig-Extrakt-Bouillon alle 4 bis 6 Wochen, bei exakten Versuchsserien jede Woche.)

Für manche genaueren Untersuchungen (Teilungsrate, Parthenogenesenfolge u. a.) züchtet man die Infusorien einzeln in hohlgeschliffenen Objektträgern, die in eine feuchte Kammer (gut schließende Schale mit feuchtem Fließpapier oder Wasser auf dem Boden) gesetzt werden, oder in kleinen, gut abschließbaren Uhrschildchen. Täglich oder nach Bedarf werden dann die einzelnen Infusorien in neue Uhrschildchen oder hohlgeschliffene Objektträger übertragen (Woodruff u. a.).

Manche kleineren Infusorienarten lassen sich auch auf festen Nährböden kultivieren; so *Colpidium* auf alkalischem Knopagar (Agar 0,5—1 g, 0,05 % ige Knopsche Nährlösung 100, Sodazusatz bis zu schwach-alkalischer Reaktion) und *Chilodon* auf dem zur Amöbenzucht (S. 24) angegebenen Bouillonagar. Die zusammen mit den Infusorien aus den Rohzuchten

(oder Kulturen in flüssigen Medien) übertragenen Bakterien genügen bei ihrer raschen Vermehrung in der Regel zur Ernährung der Colpidien bzw. Chiloden auf den Agarplatten. Solche „Rein“zuchten von kleinen Infusorien auf Agar bieten ein günstiges Material zur Ernährung größerer Arten; so läßt sich z. B. Stentor in Wasser mit Abschwemmungen von Colpidienkulturen gut kultivieren. .

Manche Infusorienarten lassen sich auch mit abgetöteten Bakterien in völliger Reinkultur züchten. Colpoda steinii kann man nach Öhler (Flagellaten- und Ziliatenzucht auf reinem Boden, Arch. f. Protistenk., Bd. 40, 1919) auch in sterilen dünnen Aufschwemmungen von Eiweißpulvern (z. B. Nährstoff Heyden, Kasein, Edestin) in Wasser kultivieren.

Um die Geschwindigkeit der Ortsveränderungen der Ziliaten herabzusetzen, bedient man sich nach dem Vorschlag von E. Stahl und Jensen der Gelatine.

K. Ludolff setzte einigen Tropfen der Infusorienflüssigkeit zu diesem Zwecke etwas von 3 % iger Gelatinelösung hinzu. Die Gelatine muß aber vorher erwärmt werden, auch kann man eine gleichmäßige Mischung beider Medien nur schwer erzielen. Statkevitch züchtete daher die Infusorien direkt in schleimig-kolloidalen Medien (Medium syrupoidale et colloidale), wobei die Bewegungstätigkeit der fraglichen Mikroorganismen herabgesetzt worden ist. Auf den Boden eines breiten Probiergläschens streut man zu diesem Zwecke Samen Psyllii 1—2 cm hoch und gießt darüber 5—8—10 ccm Kulturflüssigkeit mit den Protisten auf.

Unter den verschiedensten Versuchsbedingungen ist aber Alga Caragaheen als Zusatz besonders geeignet. Alga Caragaheen wird in reinen, weichen Marlesäckchen in die Kulturflüssigkeit hineingehängt, wor-

auf die schleimige Substanz in das Wasser hineindiffundiert.

Das Untersuchungsmedium erhält ferner durch Zusatz von Samen *Cydoniae* und Gummi *Tragacanthae* nach einiger Zeit eine ziemlich steife Konsistenz. Weniger geeignet ist Gummi *cerasi* und Gummi *arabicum*.

Schließlich ist hier Agaragar (Tjien-Tjien) zu erwähnen. Es werden davon 3–7 g in Stangen von 8–10 cm Länge zerkleinert, worauf darüber ein Aufguß von 100–200 ccm Wasser, dem kohlen-saures Natron oder phosphorsaures Kalzium hinzugefügt worden ist, kommt.

Für das Studium der Art der Wimperbewegung eignen sich Suspensionen von Tusche, Indigokarmin (Ehrenberg), Kohle, *Lykodium* usw. Durch die Methode der Vitalfärbung (Neutralrot, Methylenblau, Brillantkresylblau) kann zunächst die Art und der Verlauf der Verdauung untersucht werden (mit Neutralrot, sauer-kirschrot, alkalisch-gelbrot, ferner kann in manchen Fällen (z. B. bei alkalischer Reaktion des Mediums, Kalkwasser, Lithiumkarbonat) eine Tinktion des Kernes erzielt werden, außerdem färben sich verschiedene Granulationen (Fermentträger nach Nirenstein) mit Neutralrot, weniger gut oder gar nicht mit Methylenblau. Schließlich kann durch das Neutralrot der Grad der Vitalität der verschiedenen Organoide der Zelle sowie das Eintreten des Zelltodes festgestellt werden, indem sich die gefärbten Einschlüsse bei den postmortalen Reduktionen entfärben.

Für die Feststellung der Reaktionen bei der Verdauung ist auch Lackmuspulver und Kongorot geeignet.

Zur Darstellung der Oberflächenstrukturen, besonders der Wimpern und ihrer Insertion empfiehlt sich vor allem das neuerdings von Breßlau für

Ziliaten herangezogene, für Spirochäten und Bakterien gebräuchliche Ausstrichverfahren mit Cyanochin nach Eisenberg: Man bringe einen möglichst kleinen Tropfen des die Infusorien enthaltenden Mediums auf einen gut gereinigten Objektträger, setze daneben einen gleich großen Tropfen Cyanochin (gebrauchsfertige Lösung¹⁾ von Dr. Grübler-Leipzig; es ist ein Gemisch von 3 Teilen Chinablau und 1 Teil Cyanosin, beides in konzentrierter wässriger Lösung), verrühre beide Tropfen und streiche dann das Gemisch dünn aus. Darauf läßt man das Präparat lufttrocknen werden und kann es dann ohne weiteres in Zedernholzöl untersuchen oder in Kanadabalsam einschließen.

Die Methode ergibt wohl die klarsten Oberflächenstrukturbilder und ist dabei wesentlich einfacher und rascher durchführbar als alle älteren Färbeverfahren. Ihr Erfolg beruht nach Breßlau darauf, „daß das Chinablau als hochkolloider Farbstoff die Eigenschaft hat, nach dem Ausstreichen rasch zu einem homogenen Gallerthäutchen zu erstarren, wobei gleichzeitig die in dem Ausstrich enthaltenen Ziliaten mitgelatinisiert werden . . .“

Für besonders empfindliche Ziliaten ersetzt Breßlau das Cyanochin durch eine entsprechend wirkende, aber noch weniger giftige Mischung von Opalblau und Phloxinrhodamin (beides von den Höchster Farbwerken). Zu 1 ccm einer 10 %igen Opalblaulösung werden, je nach dem Objekt, 2—5 Tropfen einer 6,5 %igen Phloxinrhodaminlösung hinzugefügt, die Mischung vor dem Gebrauch jeweils kurz aufgekocht und in gleicher Weise wie das Cyanochin verwandt. — Zur Darstellung der Zilien färbt man sonst mit Eisenhämatoxylin nach Fixierung in Flemmingscher Lösung oder Sublimatalkohol.

¹⁾ Vor Gebrauch ist der etwa ausgeflockte Farbstoff durch kurzes Aufkochen wieder zu lösen.

Schuberg (Arch. f. Protistenk., Bd. 6, 1905) bringt zu dem gleichen Zwecke die Infusorien in einem kleinen Tropfen in ein größeres Uherschälchen und übergießt sie mit einer Mischung von 5 Teilen 2 % iger Kaliumbichromatlösung und 1 Teil 1 % iger Osmiumsäure. Das Gemisch wird ordentlich durch mehrmaliges Aufsaugen mittels einer Pipette mit Gummihütchen durchgemischt, dann kommen die Infusorien mit wenig Flüssigkeit in eine verdünnte Silbernitratlösung und schließlich in eine 1 % ige Silbernitratlösung, wo sie wiederum mit der Pipette durchgewirbelt werden. Sodann werden die Protisten in einer größeren Menge destillierten Wassers gewaschen und durch die Alkoholreihe in Nelkenöl übertragen. Durch Klopfen auf das Deckgläschen werden einzelne Teile abgesprengt und auf die Insertion der Zilien usw. untersucht.

Auch nach der Methode von Löffler können die Zilien dargestellt werden. Als Beize nimmt man Tannin-Eisenalaun-Wollschwarz, ein Gemisch, das unter dem Namen Löfflers Geißelbeize (10 ccm von 20 g Tannin in 80 ccm Aqua dest. + 5 ccm gesättigte Lösung von Eisenoxydulammoniumsulfat + alkohol. Lösung Wollschwarz) käuflich ist, und färbt mit Anilinwasser-Fuchsin nach, nur daß man im Gegensatz zu der bakteriologischen Methode die ganze Färbung stets auf nassem Wege ausführt und ein Erhitzen der Beize sowie der Färbeflüssigkeit übergeht, dafür aber beide mindestens eine halbe Stunde einwirken läßt. Nach der Alkoholreihe wird in diesem Falle zum Aufhellen statt Nelkenöl Xylol genommen.

Einzelne Infusorien fixiert man unter dem Deckglas, indem man rasch die Fixierungsflüssigkeit von der einen Seite des Präparates hinzutreten läßt und gleichzeitig von der anderen Seite mit Wollfäden oder Fließpapierstreifen absaugt. Es ist jedoch darauf zu achten,

daß bei allen diesen Manipulationen das Objekt nicht trocken wird.

Auch das auf S. 38 für Heliozoen angegebene Verfahren leistet bei Infusorien häufig gute Dienste. In diesen Fällen empfiehlt sich vor allem die Fixierung mit Pikrinessigsäure, evtl. auch mit Sublimatalkohol.

Von Agarkulturen macht man Abklatsch- oder Ausstrichpräparate wie von Kulturamöben. Auch von Ziliaten in der Kahlhaut einer Infusion werden Ausstrichpräparate angefertigt. Steht eine größere Menge von Ziliaten zur Verfügung, so bedient man sich der sog. Massenmethode, indem man die Protisten in einem Zentrifugenröhrchen konserviert, auswäscht und färbt (s. S. 30). Größere Arten werden bequemer im Röhrchen mit Gazeverschuß (S. 30, 35) fixiert und gefärbt.

Als Konservierungsflüssigkeiten für Ziliaten sind vor allem Pikrinessigsäure (S. 16), auch das Bouinsche Gemisch (S. 36) und das vom Rathsche Gemisch: 100 ccm gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 6 ccm 2 %iger Osmiumsäure, 1 ccm Eisessig (Auswaschen in Alkohol) zu empfehlen, ferner Sublimatalkohol + Eisessig (S. 15), sowie die Flemmingsche Lösung.

Für manche Arten (*Stylonychia*) wird auch die Perényische Flüssigkeit (4 Teile 10 %ige Salpetersäure, 3 Teile 90 %iger Alkohol und 3 Teile $\frac{1}{2}$ %ige Chromsäurelösung) angewandt, in der sich die kristallinen Einlagerungen lösen.

Zur Färbung von Totalpräparaten von Infusorien verwendet man Hämalan, Delafields Hämatoxylin, Boraxkarmin, Bealsches Ammoniakkarmin, Alaunkarmin (überfärbt kaum), ferner Eisenhämatoxylin sowie Ehrlich-Biondis Methylgrün-Säurefuchsin-Orange G (Gemisch fertig bei Grübler & Hollborn-Leipzig käuflich, oder man löst nach Mayer zuerst 2 g Orange G und 3 g Säurefuchsin, dann 1 g

Methylgrün in einer Mischung von Glycerin 10 ccm, 90 %igem Alkohol 25 ccm, Aqu. dest. 45 ccm.

Auch werden Infusorien einzeln isoliert und in Zedernöl oder Nelkenöl untersucht. Die genannten Öle hellen sie schön auf, und man kann sie unter dem mit einem feinen Haar gestützten Deckgläschen von allen Seiten untersuchen.

Zur genaueren Untersuchung größerer Infusorien ist auch die Anfertigung von Schnitten erforderlich. Wenn möglich, empfiehlt sich auch hierbei die Anwendung von Röhrchen mit Gazeverschuß, in denen die Infusorien durch die Fixierungs- und Waschflüssigkeiten, durch die Alkoholstufen, Xylol, Xylolparaffin in Paraffin übergeführt werden. Sonst ist die Durchführung und Einbettung, wie S. 30 angegeben, mit Hilfe der Zentrifugiermethode vorzunehmen.

Stehen nur wenige Infusorien zur Verfügung, so kann man sie nach Enriques (Arch. f. Protistenk., Bd. 26, 1912) in ein schon vorher an einem Ende zugebundenes und unter möglicher Aufblähung fixiertes Stückchen Froschdarm hineinspritzen, bindet dann auch das andere Ende des Darmes zu. Man kann die Infusorien im Darmstückchen durch alle Flüssigkeiten in Paraffin bringen und schneiden. Einzelne Infusorien bringt Enriques nach Fixierung in einen Wassertropfen und mischt diesen alsdann in einem Uhrgläschen oder auf dem Objektträger mit einem Tropfen (vorher in Wasser gequollener) durch vorsichtiges Erwärmen ohne Wasserzusatz gelöster Gelatine. Ist die Gelatinemischung mit dem Infusor durch Abkühlung wieder fest geworden, so sucht man das Infusor unter dem Mikroskop auf und schneidet es zusammen mit einem (beliebig) kleinen Stückchen Gelatine heraus, in dem dann die Weiterführung durch Alkohol und Xylol in Paraffin erfolgt.

Die Schnitte färbt man mit Heidenhains Eisen-

hämatoxylin mit Bordeauxrot- oder Rubin-S.-Nachfärbung, mit Ehrlichs Methylgrün-Säurefuchsin-Orange G (S. 75), mit Boraxkarmin-Methylgrün (Enriques) oder auch nach der Malloryschen Methode (S. 66). Die Methode ist manchmal etwas launenhaft und wenig dauerhaft. Die Nukleolärsubstanzen werden gelb, orange oder rot gefärbt. In den einzelnen Farbmischungen bleiben die Schnitte etwa 2 Minuten. Die Phosphormolybdänsäure muß gut ausgewaschen werden.

Parasitische Infusorien (*Balantidium*, *Nyctotherus* u. a.) werden im allgemeinen in gleicher Weise wie die freilebenden fixiert und gefärbt. Anzuraten ist die Anfertigung von Ausstrichpräparaten und Schnitten. Fixierung mit Flemmingscher Lösung, Sublimatalkohol + Eisessig oder Pikrinessigsäure, Färbung mit Eisenhämatoxylin, Methylgrün-Säurefuchsin-Orange G oder mit Hämalaun. Auch die Heidenhain-Zeitfärbung nach Nöller (s. S. 32) ist für die Darminfusorien anwendbar, nur müssen — zum Unterschiede von der entsprechenden Färbung der Entamoeben — die Präparate etwas länger, 5–6 Minuten, in Eisenaun differenziert werden.

Materialbeschaffung: In Kloake und Enddarm des Frosches und der Unke finden sich meist zahlreiche parasitische Infusorien verschiedener Gattungen (*Opalina*, *Balantidium*, *Nyctotherus*); im Enddarm des Schweines nicht selten *Balantidium coli*.

Anhang.

I. Spirochäten.

Materialbeschaffung: Im Zahnbelag, besonders am Zahnfleisch und in kariösen Zähnen finden sich fast bei jedem Menschen zahlreiche Spirochäten verschiedener Art, die sich sehr gut für die Erlernung der Untersuchungstechnik eignen.

Spirochäten werden im lebenden Zustande im mit Vaseline umrandeten Deckglaspräparat untersucht, und zwar ist vor allem die Untersuchung im Dunkelfeld (S. 6) anzuraten.

Vitalfärbungen ergeben im allgemeinen keine besonderen Resultate. Mit Spuren von Methylenblau färbt sich z. B. die Hühnerspirochäte. Durch Zusatz von Spuren Kaliumkarbonat wird die Affinität zu den Vitalfarbstoffen erhöht. (*Sp. pallida*.) Mit Neutralrotfärbung kann man die verschiedenen Verdauungsstadien der von Leukozyten aufgenommenen Spirochäten des *Ulcus tropicum* sowie der Mundspirochäten verfolgen. Durch Kalilauge und taurocholsaures Natrium werden die Spirochäten bis auf unbedeutende Schatten gelöst.

Für Dauerpräparate werden Ausstriche angefertigt (von infiziertem Blut oder Serum nach der auf S. 14 beschriebenen Methode), in manchen Fällen daneben auch Schnittpräparate. Für die meisten Spirochäten ist eine feuchte Fixierung und Weiterbehandlung der Ausstriche nicht erforderlich (nur für die großen „Cristispiiren“ der Muscheln ist sie angezeigt, die man am

besten mit Flemmingscher Lösung (S. 16) fixiert und mit Eisenhämatoxylin färbt).

Man fixiert die Ausstriche entweder über Osmiumdämpfen (S. 82) oder bringt sie, nachdem sie lufttrocken geworden sind, auf 10 Min. in absoluten Alkohol oder eine Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Äther. Oft ist es vorteilhaft, die Spirochätenausstriche gar nicht mit absolutem Alkohol zu fixieren, sondern sie sofort ohne Fixierung zu färben.

Genauer wird die Technik der Spirochätenuntersuchung für die medizinisch wichtigste Art, die *Spirochaeta pallida* angegeben (S. 81).

Kultivierung der Spirochäten.

Von manchen Spirochätenarten sind Kulturen relativ leicht zu erzielen. Die ursprünglich angewandte Methode der Anreicherung in Kollodiumsäckchen in der Bauchhöhle eines Kaninchen hat heute fast nur noch historisches Interesse.

Mühlens hat die Mundspirochäten in Pferdeserumagar (1:3) in hoher Schicht (Schüttelkultur) und Serumbouillon unter streng anäroben Verhältnissen nach 10 Tagen gezüchtet. (Mühlens und Hartmann Zeitschrift f. Hygiene, 06). Schüttelkulturen: Agarröhrchen (Reaktion schwach alkalisch oder besser neutral) zur Austreibung des Sauerstoffs $\frac{1}{2}$ St. gekocht. Nach Abkühlung auf 45° Zusatz von Pferdeserum, das etwa $\frac{1}{2}$ St. auf 58–60° erhitzt worden ist und sich auf 45° abgekühlt hat (2 Teile Agar, 1 Teil Serum). In den noch flüssigen Serumagar (40–42°) wird aus einer in Serumbouillon angelegten Verdünnung des Ausgangsmaterials mit Platinnadel geimpft, sodann zur Gewinnung möglichst isolierter Kolonien eine weitere Verdünnung angelegt. Der geimpfte und geschüttelte Agar wird, nachdem er erstarrt ist, auf 37° (nicht Zimmertemp.) gebracht. Wachstum nach 9 bis

12 Tagen (hauchartige, weißliche Trübungen). Agar-säule wird zur Untersuchung der Kolonien in Scheiben geschnitten. An Stelle des Pferdeserums kann: Hammel-, Kalbs-, Kaninchen-, Ziegenserum sowie Aszitesflüssigkeit (Erfolg unsicher) treten. Schüttelkultur kann durch Stichkultur ersetzt werden.

Noguchi (Journ. exper. Med. vol. 15/16, 1912) züchtet die Rekurrens- und Hühnerspirochäten in Aszites oder Hydrozelenflüssigkeit, zu der er frische, peinlichst steril entnommene Gewebsstückchen, am besten von Kaninchen-Niere oder -Hoden hinzufügt, bei der Zucht von *Sp. gallinarum* Stückchen von Muskeln oder Niere vom Huhn. Nicht jede Aszitesflüssigkeit ist für die Zucht brauchbar; sie darf vor allem keine Galle enthalten und muß beim Erhitzen ein feines Fibrinnetz ausscheiden. Die Zucht erfolgt bei 37°. Die beimpfte Kulturflüssigkeit wird mit Paraffinöl zum Luftabschluß überschichtet.

In ähnlicher Weise lassen sich nach der Methode von Noguchi auch die Spirochäte der Weilschen Krankheit u. a. züchten (vgl. S. 89).

Am meisten zu empfehlen und am bequemsten anzulegen sind Kulturen von *Sp. duttoni*, obermeieri, *gallinarum* und *ictero-haemorrhagiae* nach der Methode von Ungermann (Arbeiten a. d. Reichsgesundheitsamt Bd. 51, 1919): Die Zucht erfolgt in Röhrchen von 9 mm Weite und ca. 10 cm Höhe in unverdünntem (oder ganz wenig verdünntem) inaktivierten Kaninchenserum (evtl. auch Hammelserum), das noch heiß mit hoher Schicht sterilen flüssigen Paraffins zum Luftabschluß überschichtet wird. (Inaktivierung: 30 Min. im Wasserbad von 58—60°.) Zur Anlage der Kultur überträgt man einige Tropfen infiziertem Blutes mit steriler Glaskapillare in das Kaninchenserum, zur Weiterführung etwa alle 5 Tage je 0,1 ccm aus dem alten Röhrchen auf je 1,5 ccm neuer Nährlösung.

Sp. gallinarum wird bei 30°, Sp. duttoni, Sp. obermeieri und Sp. ictero-haemorrhagiae bei 30–37° kultiviert.

Die Virulenz bleibt bei diesen Kulturen durch zahlreiche Passagen erhalten, schwindet aber allmählich.

Bei der Zucht von Sp. duttoni und Sp. obermeieri empfiehlt es sich dem inaktivierten Kaninchenserum einige Tropfen einer Aufschwemmung frischer, nicht erhitzter Kaninchenblutkörperchen zuzusetzen. — Zuchten der Sp. ictero-haemorrhagiae („Weilsche“ Spirochäte) kann man nach Manteufel (Dtsch. Med. Wochenschr. 1921) auch noch einfacher dadurch erhalten, daß man 2–3 ccm infizierten Blutes in 8–10 cm destillierten Wassers verdünnt und 3–4 Tage bei 25–30° hält. (Für diagnostische Zwecke wichtig!) Über die Kultur der Spirochaeta pallida s. S. 89.

Spirochaeta (Treponema) pallida („Syphilisspirochäte“).

Die Untersuchung der Syphilisspirochäte erfolgt zunächst im Leben, vor allem im Dunkelfeld (s. S. 6). Im sorgfältig mit Vaseline umrandeten Deckglaspräparat bleiben die Spirochäten recht lange — nach Beer bis etwa 4 Wochen! — im beweglichen Zustand erhalten. Das zu untersuchende Material (Reizserum s. u.) kann mit etwas 0,85% NaCl-Lösung verdünnt werden.

Für Herstellung von gefärbten Dauerpräparaten sind dünne Ausstriche anzufertigen, indem man ein Tröpfchen von durch Schaben und Reiben verdächtiger Stellen nach einigen Minuten gewonnenem Reizserum (Hoffmann) oder durch Quetschen mit einer Pinzette herausgepreßtem Quetschserum auf ein Deckglas oder Objektträger bringt und nach Art der Blutausstriche (s. S. 14) verstreicht. Trocknen an der Luft. 10 Minuten

Fixierung in Alk. absolut. Bei alten Präparaten Fixierung überflüssig.

Statt der Alkoholfixierung wird häufig mit gutem Erfolg die Fixierung durch Osmiumdämpfe angewandt: 5 ccm 1% ige Osmiumsäure werden in eine flache Glasdose gegossen und 10 Tropfen Eisessig werden hinzugefügt. Gut gereinigte Objektträger oder Deckgläschen werden über die Dose gelegt und der Einwirkung der Dämpfe mindestens 2 Minuten ausgesetzt. Hernach fertigt man rasch über der „Dampfseite“ des Objektträgers oder Deckgläschens den Ausstrich an und läßt ihn zur Vollendung der Fixierung über der Glasdose 1—2 Minuten trocknen. Schließlich läßt man auf die Präparate für eine Minute eine dünne, hellrote Kaliumpermanganatlösung einwirken, wäscht aus und färbt. (Weidenreich-Hoffmann, Halle.)

Häufig werden die lufttrockenen Ausstriche auch ohne besondere Fixierung gefärbt. Für die Färbung der Syphilisspirochäte ist eine so große und ständig wachsende Zahl von Methoden und Modifikationen angegeben worden, daß wir uns hier mit der Wiedergabe nur der wichtigsten begnügen müssen, mit denen sowohl der Forscher wie der Praktiker völlig auskommt:

Schaudinn und Hoffmann (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 20, 1904) gaben folgende Methode an: „Die gut fixierten Deckgläser kommen für 16—24 Stunden in eine stets frisch hergestellte Mischung von:

1. 12 Teilen Giemsa's Eosinlösung (2,5 ccm 1% ige Eosinlösung auf 500 ccm Wasser).
2. 3 Teile Azur I (Lösung 1:1000 Wasser).
3. 3 Teile Azur II (Lösung 0,8:1000 Wasser).

Nach kurzem Abspülen in Wasser werden die Deckgläser getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen.

Heute hat diese Methode im allgemeinen nur noch historisches Interesse; man bedient sich ihrer nur dann,

wenn kein gutes destilliertes Wasser zur Verfügung steht.

Anzuraten ist:

1. Färbung mit Giemsa's Azur-Eosinmisch (käuflich bei Grübler-Leipzig) wie bei Trypanosomen oder Plasmodien (vgl. S. 46). Färbedauer $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde.

2. Schnellfärbung nach Giemsa (s. S. 47).

3. Schnellfärbung nach Preis-Hoffmann:

Zu 10 ccm destillierten Wassers 1—2 Tropfen Sol. Kalii carbon., dann 20—25 Tropfen Giemsa-Lösung. Die auf gut gereinigten Objektträgern hergestellten dünnen Ausstriche bedeckt man mit der Farblösung, erwärmt vorsichtig, bis Dämpfe aufsteigen, gießt die Farblösung ab und wiederholt das Verfahren 3—4 mal, spült kurz ab, bringt die Objektträger zur Entfärbung des Untergrundes auf ca. 2 Min. in 25%ige Tanninlösung, wäscht dann gut in Wasser aus und läßt die Objektträger trocknen.

4. Versilberung nach Fontana (Dermatol. Wochenschrift 56, 1913):

Reizserum (S. 81) wird mit 1 Tropfen Wasser verdünnt und dann ausgestrichen. Auf das lufttrockene Präparat 10—15 Tropfen einer Mischung von Eisessig 1 ccm, 40%iges Formol 2 ccm, Aqu. dest. 100 ccm auf-tropfen und sogleich mehrmals in 1 Minute erneuern, dann abspülen in fließendem Wasser. Beizen in Mischung von: Gerbsäure 5, Karbolsäure 1, Aqu. dest. 100. Präparat mit der Beize bedecken und über der Flamme schwach erwärmen ca. 20 Sekunden (nicht kochen!), bis Dämpfe aufsteigen. Abspülen in fließendem Wasser $\frac{1}{2}$ Minute. Versilberung in frisch hergestellter Lösung von: Silbernitrat 0,25 g, Aqu. dest. 100. Zu 2—3 ccm dieser Lösung Ammoniak tropfenweise zusetzen, so daß der entstehende Niederschlag sich wieder

löst, dann tropfenweise Silbernitratlösung, bis das Gemisch leicht opalesziert. Die Silberlösung wird auf das Präparat gegossen, dann wieder schwach erwärmt. Abspülen $\frac{1}{2}$ Minute in fließendem Wasser. Trocknen.

5. Löfflersche „Geißelfärbung“, wie S. 43 beschrieben.

6. Färbung mit Fuchsin nach Shmamine (Zbl. f. Bakt. I Bd. 61, 1912).

Auf die in der Flamme oder mit Alkohol fixierten Ausstriche tropft man 15 Tropfen 1%ige Kalilauge, sodann 10–15 Tropfen Fuchsinlösung (Fuchsin 15 g in 1000 96%igen Alkohol. — Diese Stammlösung wird zum Gebrauch 1:20 mit dest. Wasser verdünnt). Das Gemisch läßt man 3 Minuten auf dem Präparat, spült ab und läßt trocknen (oder wiederholt die Färbung).

7. Färbung mit einer filtrierten, heißgesättigten Gentianaviolettlösung (10 g Gentianaviolett in 100 ccm Aqu. dest.). 15 Minuten Wasserspülung, Trocknen, Kanadabalsam. (Herxheimer.)

8. „Vitalfärbung“ nach Meirowsky.

1 Tropfen einer Lösung von Methylviolett 20,0, Methylenviolett 4,0, 0,5%ige NaCl-Lösung 100,0. Acid. carbol. 0,25 wird auf einem Objektträger ausgestrichen und trocknen gelassen. Dann legt man ein Deckgläschen mit einem Tropfen Reizserum auf die ange-trocknete Farblösung. Spirochaeta pallida färbt sich hierbei erst nach 1–2 Stunden schwach. Innerhalb der ersten halben Stunde gefärbte Spirochäten sind also keine Syphilisspirochäten.

Zum Auffinden der Spirochäten im gefärbten Präparat (besonders bei Methode 1–3) ist auch die Beobachtung im Dunkelfeld („Leuchtbildmethode“ nach Hoffmann, vgl. S. 7) sehr anzuraten.

Neben der Färbung im Ausstrich ist für den Nachweis der Syphilisspirochäte in manchen Fällen die Anwendung der Schnitttechnik von besonderer Wichtigkeit.

Für Schnittfärbung wird vor allem die Methode der Versilberung nach Levaditi mit mannigfachen Modifikationen benutzt.

Zunächst sei sie in der etwas abgeänderten Form von Hoffmann und Beer (Deutsche med. Wochenschr. 1906) angegeben:

1. Formalinfixierung (1 Teil Formalin + 9 Teile Wasser) 24 Stunden lang. Zur Erweichung des Gewebes kann man nachträglich 5% Eisessiglösung anwenden.

2. Übertragung möglichst kleiner Stücke (0,5 ccm) in 96%igen Alkohol über Nacht.

3. Überführung in destilliertes Wasser (einmal wechseln) bis zum Sinken der Stücke (15 Minuten).

4. Die (an feinen, weißen Zwirnfäden aufgehängten) Stücke kommen in eine jedesmal frisch zu bereitende Mischung von 90 ccm 1,5%ige Silbernitratlösung + 10 ccm reinsten Pyridins und verbleiben dort 3 Stunden bei Zimmertemperatur und weitere 3—5 Stunden im Thermostaten bei 45—50° (dunkle Flasche mit Glasstopfen).

5. Dann kommen sie in eine jedesmal frisch zu bereitende Reduktionsmischung:

- a) 90 ccm 4%iger wäßriger Pyrogallolösung + 10 ccm reinen Azetons (Stammlösung).

- b) 85 ccm von a) + 15 ccm Pyridin puriss., hierin verbleiben die Stücke bei Zimmertemperatur über Nacht. Abspülen in dest. Wasser.

6. Rasche Paraffineinbettung.

Die Schnitte kann man mit 1%igem Jodgrün, Löfflers Methylenblau oder Toluidinblau nachfärben. Für Vergleichszwecke kann man die Sp. nach Versè durch braune Jodjodkaliumlösung, Abspülen im Wasser und

konzentrierte Natriumthiosulfatlösung wieder entfärben.

Bei der alten Levaditimethode kommen die Objekte nach 3. in 1,5%ige AgNO_3 -Lösung 3–5 Tage bei 38°C . Dann Reduktion in Acid. pyrogall. 4,0, Formol 5,0, Wasser 100. 48^h Zimmertemp. Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Paraffin.

Im wesentlichen nach dieser alten Levaditimethode behandelt auch Noguchi (Münch. med. Wochenschr. 1913) Gehirnmateriale zum Nachweis von Spirochäten (Progressive Paralyse). Wichtig für das Gelingen der Versilberung ist ein möglichst langes Verweilen des Materials in Formalin, sowie Nachbehandlung mit Alkohol: Von dem zu untersuchenden in Formalin aufbewahrten Gehirn werden kleine (2–4 mm dicke) Stückchen auf 5 Tage bei Zimmertemperatur in eine Mischung von Formalin 10,0, Pyridin 10, Azeton 25, Alkohol 25, Aqu. dest. 30 gebracht. — Auswaschen in Aqu. dest. 24 Stunden, versetzen in 96%igen Alkohol auf 3 Tage, dann wieder auswaschen in Aqu. dest. 24 Stunden. — Übertragen in 1,5%iges Silbernitrat (in dunkler Flasche) auf 3 Tage bei 37° oder 5 Tage bei Zimmertemperatur. — Auswaschen in Aqu. dest. 2 Stunden. — Übertragen in 4%ige Pyrogallussäure + 5%iges Formalin auf 24–48 Stunden bei Zimmertemperatur. — Gründlich auswaschen in Aqu. dest. — Übertragen in 80%igen Alkohol auf 24 Stunden, dann in 95%igen Alkohol auf 3 Tage (bei täglicher Erneuerung des Alkohols), in Alkohol absolutus auf 2 Tage; Xylol, Xylol-Paraffin und Paraffin.

Jahnel bringt die Gehirnstückchen aus dem Formalin zum Auswaschen auf 1–3 Tage in Wasser, dann auf 1–3 Tage in reines Pyridin, wäscht alsdann in mehrfach gewechseltem Wasser bis zum Schwund des Pyridingeruches (2–3 Tage), überträgt für $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde in 1%iges Urannitrat (Merck) bei 37° ,

wäscht wiederum 1 Tag in Aqu. dest. aus, überträgt für 3—8 Tage in 96%igen Alkohol, wäscht in Aqu. dest. aus bis zum Untersinken der Stückchen, bringt für 5—8 Tage bei 37° in 1½%iges Silbernitrat in dunkler Flasche, gießt dann die Silberlösung ab und ersetzt sie für 1—2 Tage durch die auf S. 85 unter 5 angegebene Pyrogallol-Azeton-Pyridinmischung, wäscht in Aqu. dest. aus und überträgt durch die Alkoholstufen usw. in Paraffin.

Yamamoto (Cent. f. allg. Pathol. 1909) fixiert in „verschiedenen Lösungen“; sodann schneidet er die Organteile in 10 mm lange und 5 mm dicke Stücke, wäscht in Wasser 24 Stunden aus (bei 70%igem Alkohol nicht nötig), erwärmt die Objekte in 10 ccm 5%iger Silbernitratlösung 48 Stunden bei 37° C (braune Flaschen) und reduziert in 20 ccm von: Acid. pyrogall. 2,0, Acid. tannic. 1,0, Aqu. dest. 100,0 über 24 Stunden alte Lösung 24 Stunden bei 37° C (Flüssigkeit nach 30 Minuten erneuern), hernach 1 Stunde Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Paraffin; besser Celloidin-einbettung, zum Aufhellen des Schnittes statt Xylol Origanumöl.

Nächst der Silberimprägnierung kann man sich zur Spirochätenfärbung auf Schnittpräparaten auch der feuchten Giemsaefärbung (S. 19), gelegentlich auch des Eisenhämatoxylin's bedienen.

Für die Diagnose der Syphilisspirochäte sind zusammenfassend folgende Methoden zu empfehlen:

1. Lebenduntersuchung im Dunkelfeldapparat oder mikroskopische Untersuchung (im Hell- wie im Dunkelfeld!) der nach Giemsa oder einer der anderen auf S. 83/84 angegebenen Methoden gefärbten Ausstriche aus Reiz-, Quetsch- oder Schabeserum.

2. Mikroskopische Untersuchung des Drüsenpunktionssaftes (frisch oder gefärbt). Hoffmann.

3. Exzision der fraglichen erkrankten Teile und der histologische Nachweis der Spirochäten nach der Silberimprägnierungsmethode.

4. Verimpfung des Reizserums oder des durch Punktion gewonnenen Drüsensaftes an ein empfängliches Tier (Affe, Kaninchen), kürzeste Inkubation beim Affen etwa 14 Tage.

Das zerkleinerte Material (auch Stücke von winziger Größe) kann man auch in die vordere Augenkammer des Kaninchens bringen (Bertarelli), und weist die Spirochäten dann nach Levaditis Methode in dem Bindegewebe unterhalb der Bowmanschen Membran des Corneaepithels (etwa nach zwanzig Tagen) nach.

5. Eventueller Nachweis der Spirochäten im Blute nach der Methode von Noeggerat und Staehelin (Münch. med. Wochensch. 1905): man fängt mindestens 1 ccm Blut aus einer Vene oder aus dem Ohrläppchen in einer ungefähr zehnfachen Menge $\frac{1}{3}\%$ ige Essigsäure auf, zentrifugiert das Ganze in einer starken Zentrifuge und verarbeitet den Bodensatz zu Ausstrichpräparaten (gelingt relativ selten).

Für die Schnelldiagnose empfiehlt sich die Anwendung des Dunkelfeldapparates oder das Tuscheverfahren nach Burri: 1. Öse des Sekretes wird mit etwas Wasser verdünnt, davon verrührt man 1. Öse mit einem kleinen Tropfen käuflicher chinesischer Tusche (z. B. Pelikantusche von Grübler) und verstreicht das Ganze zu einem bräunlichen Fleck. Trocknen. Sofortige Untersuchung mit Immersion. Statt der Tusche kann man in gleicher Weise auch das (gleichfalls bei Grübler-Leipzig gebrauchsfertig käufliche) Cyanochingemisch nach Eisenberg anwenden.

Von Färbungen kommen für die Schnelldiagnose vor allem die unter 3, 5 und 6 auf S. 83/84 angegebenen in Betracht.

Kultur der *Spirochaeta pallida* wurde zuerst von Schereschewsky erzielt (Deut.med. Wochenschr. 35. Jhrg., 1909). Er züchtet bei 37° 3—5 Tage auf Pferdeserum, das bei 58—60° zu gallertiger Konsistenz gebracht wurde und zirka 3 Tage im Thermostaten bei 37° teilweise autolytierte. Versenken eines Papel- oder Kondylomfragmentes oder Stückchens von fötaler Luesmilz mit hakenförmiger Glaskapillare in das Medium. Wachstum frühestens am 3., meist 5—12 Tage. Es handelt sich bei der Natur des Ausgangsmaterials zunächst natürlich um Mischkulturen. Doch kann man dann von derartigen Kulturen aus nach der für *Spir. dentium* (S. 79) beschriebenen Methode Reinzuchten gewinnen. Mühlens gelang dies auch direkt von einer infizierten Lymphdrüse aus.

Noguchi (Journ. exper. Med. 1912) züchtet *Sp. pallida* in einer Mischung von 1 Teil Pferde-, Kaninchen- oder Schafserum und 3 Teilen destillierten Wassers. Die Mischung wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf 100° erhitzt, dann (nach Erkalten) mit einem frischen, nicht sterilisierten (aber peinlichst steril entnommenen!) Stückchen Kaninchen-Niere oder -Hoden beschickt und mit flüssigem Paraffin überschichtet. Die mit Spirochätenmaterial beimpften Kulturröhrchen werden unter strengster Anaerobiose in einer Wasserstoffatmosphäre bei 35—37° gehalten.

II. „Chlamydozoa“.

Die bei einer Anzahl von Infektionskrankheiten (Variola, Trachom, Lyssa u. a.) nachweisbaren, in ihrem Wesen noch immer nicht ausreichend aufgeklärten Zelleinschlüsse werden auf Ausstrich und Schnittpräparaten untersucht.

Man fixiert im allgemeinen mit Flemmingscher Lösung (S. 16), Sublimatalkohol (S. 15) oder Zenkerscher

Lösung (S. 29) und färbt mit Eisenhämatoxylin (S. 17), mit Giemsas Farbgemisch (S. 19), mit Delafields Hämatoxylin oder mit Hämalaun.

Die Untersuchung von Trockenausstrichen nach Art der Malaria- oder Spirochätenpräparate ist im allgemeinen nicht anzuraten.

Neben diesen allgemeinen technischen Vorschriften sei im einzelnen noch auf folgendes verwiesen:

1. Variola-Vakzine.

Für morphologische Zwecke empfiehlt sich in allen Fällen die Verimpfung des Virus auf die koka-inisierte Kaninchenkornea. Strichelung derselben mit einer möglichst feinen Nadel, Impflanzette oder Impffeder, oder Anlegen einer Epitheltasche mit schief gehaltener Lanzette, Einbringen des Virus oder Vakzinelymphe. Falls Streptokokken bei dem Variola virus vorhanden sind, treten grobe Defekte auf. In seltenen Fällen treten bereits nach 3 Stunden sehr spärliche „Guarnierische Körperchen“ neben dem Kern auf. Reichlich ist die Ausbeute am 2.—4. Tage. Guarnierische Körperchen treten auch im Brutschrank in ausgeschnittener Kaninchenkornea auf.

Man tupft die Kornea mit Deckgläschen oder Objektträgern ab oder schabt etwas Korneaepithel ab und streicht es auf einem Objektträger aus, fixiert und färbt nach einer der oben angegebenen Methoden. Oder man nimmt das Auge heraus, fixiert die Kornea und bringt sie zur Anfertigung von Schnitten durch die Alkoholstufen und Xylol in Paraffin. Färbung der Schnitte (außer nach den zuvor genannten Methoden) auch mit Ehrlich-Biondis Gemisch (S. 75) oder nach Mallory (S. 66).

Für diagnostische Zwecke gut bewährt hat sich endlich die makroskopische Methode von Paul (Centrbl.

f. Bakt. Abt. I, Bd. 75, 1915): Inhalt Variola-verdächtiger Pusteln wird mit einem Spatel auf die wie oben angegeben mit einer feinen Nadel vielfach gestrichelte Kaninchenkornea aufgerieben. Während die Hornhaut sonst nach 48 Stunden in der Regel wieder glatt erscheint, kann man, wenn es sich tatsächlich um Variola handelte, mit einer Lupe auf ihr zahlreiche spitze Erhebungen erkennen. Das Auge wird vorsichtig enukleiert und in Sublimatalkohol eingelegt. Nach 2—5 Minuten heben sich alsdann Variola-virus-Herde als kreisrunde, milchweiße Fleckchen von verschiedener Größe deutlich (besonders bei schwarzem Hintergrunde) ab. Diese Reaktion fehlt bei Varizellenmaterial! Um sie zu erkennen, ist vor dem Einlegen in Sublimatalkohol der Korneaoberfläche anhaftendes Blut oder eitriger Schleim durch Wasserstrahl zu entfernen.

2. Tollwut (Lyssa).

Für die Darstellung der für Lyssa charakteristischen „Negrischen Körperchen“ im Ammonshorn bedient man sich außer den eingangs angegebenen noch folgender Methoden:

1. Fixierung kleiner Stückchen vom Ammonshorn in Zenkerscher Flüssigkeit, Einbettung in Paraffin, Färbung der Schnitte nach Mann (s. S. 64) 24 Stunden. Abspülen in Wasser, Alk. absolut., dann Alkohol absolut. mit Zusatz von Natronlauge (30 ccm Alkohol absolut. 5 Tropfen einer 1%igen Lösung von Natronlauge in Alk. abs.) wieder mehrmals Abspülen in Alkohol absol. Xylol, Kanadabalsam. (Negri.)

2. Methode von Bohne und Lentz: 2—3 mm dicke Querscheiben des Ammonshorns werden 1 Stunde in Azeton bei 37° C gehärtet, dann 1 ½ Stunde Paraffin (Schmelzpunkt 55° C), dann Paraffinschrank von 58° C,

Einbetten, Schneiden, Ankleben mit Wasser, Xylol, Alkohol. Färbung: 1 Minute: Eosin extra B-Höchst 0,5 + 60% iger Äthylalkohol 100,0; Wasser; Färben 1 Minute: Gesättigte alkohol. Methylenblaulösung B-Patent Höchst 30,0 + 0,01% ige Kalilauge 100,0; Wasser; leichtes Abtupfen mit Fließpapier; Differenzieren in alkalischem Alkohol bis zur schwachen Eosinfärbung, dann Differenzieren in saurem Alkohol (1 Tropfen 50% ige Essigsäure auf 30,0), bis die Ganglienzüge eben noch als blaue Linien sichtbar sind; kurzes Abspülen in Alk. absolut. Xylol, Kanadabalsam.

3. Harris (Journ. of infect. diseases 5) fixiert Ausstriche in Methylalkohol 1 Minute, Wasser, Eintauchen in alte gesättigte alk. Eosinlösung (1—3 Minuten), 2—3 Sekunden waschen, Eintauchen in eine Lösung von frischem Unnas alkalischem Methylenblau 5—15 Sekunden Wasser, Entfärben in 95% igem Alkohol, absolut. Alkohol, Xylol, Zedernöl.

Es empfiehlt sich für Quetschpräparate einen Ammonshornquerschnitt zwischen 2 Objektträgern zu zerquetschen, die Ausstriche in Methylalkohol zu fixieren, in Alk. absolut. abspülen und wie oben zu färben.

3. Gelbsucht der Seidenraupe und Nonne.

Diagnostisch wichtig sind die intranuklear entstehenden Proteinkristalloide — polyedrischen Körperchen; sie färben sich mit Jodlösungen gelb, mit Millons Reagens (Quecksilber 10 g; rauchende Salpetersäure 10 ccm, Wasser 20 ccm) rötlich, mit Zucker und Schwefelsäure morgenrot, mit 5% igem Säurefuchsin violett, mit Giemsa's Eosinazur je nach ihrer Entwicklung violett und blaurot, mit Löfflers Beize und Anilin-fuchsin (s. S. 43) rot, ferner färben sie sich nach Bolle (Seidenbau in Japan, Hartlebens Verlag, 1899) mit

Fuchsin, Eosin, Erythrosin, Methylgrün, Meteorblau, Gentianablau, Methylviolett; mit Brillantkresylblau werden sie bläulich. Pikrinsäure färbt sie gelb, bei Pepsinsalzsäurezusatz verschwinden sie nach einiger Zeit (32° C).

Außerdem sind noch kleinste „Einschlußkörperchen“ beschrieben worden.

Register.

A

Abbéscher Zeichenapparat 2, 8
Abklatschpräparate 14
Amoeben 23 ff.
Anopheles 57 ff.
Ausstrichpräparate 14

B

Beleuchtungsapparate 4
Blutausstriche 14

C

Chromatinnachweis 21
Chromolyse 21
Ciliata 68 ff.
Cnidosporidia 65 ff.
Coccidia 61 ff.
Cyanochin 73

D

Darmflagellaten 44
Darminfusorien 77
Dicker Tropfen 48
Dunkelfeldapparat 1, 6, 7
Dysenterieamöben 31 ff.
— Schnelldiagnose 33

E

Einzellkulturen 69

F

Färbungen:

Bests Karmin 44
Delafields Hämatoxylin 29, 36
Ehrlich - Biondis Methylgrün-
Säurefuchsin-Orange G 75

Färbungen:

Eisenhämatoxylin nach Heiden-
hain 17

— — Zeitfärbung nach Nöller
32, 44, 77

— nach Breinl-Rosenbusch 46
van Giesons Färbung 66

Giemsas Azur-Eosin (feuchte
Methode) 19

— (Trockenpräparate) 45

— Schnelfärbung 47

Hämalaun n. Mayer 17

Karbolthionin 68

Löfflers Geißelfärbung 43, 74

Mallorys Färbung 66

Manns Methylblau-Eosin 32,
64

Manson's Methylenblau 53

Methylgrünessigsäure 21

Pikroindigkarmin 68

Romanowsky Färbung (nach
Schaudinn-Hoffmann) 82

— (nach Schilling) 54

Safranin-Lichtgrün 18.

Spirochätenfärbungen 83 ff.

Toluidinblau-Orange G 32

Fixierungen:

Bouins Gemisch 36, 64

Carnoy's Gemisch 64

Flemmings Chromosmiumessig-
säure 16

Hermanns Platinchloridosmium-
essigsäure 28, 29

Kaliumbichromatessigsäure Tel-
lyesniczky) 65, 66

Fixierungen:

Kobaltchlorid-Osmiumameisen-
säure (Pianese) 62

Orthisches Gemisch 66

Osmiumsäure 29

Osmiumsäuredämpfe 82

Perénysche Flüssigkeit 36, 75

Pikrinessigsäure 16

Pikrinosmiumplatinchlorid 39

Pikrinschwefelsäure 66

Platinchloridchromessigsäure
(Braß) 30

v. Rathsches Gemisch 75

Sublimatakohol (Schaudinn) 15

Sublimatakohol-Eisessig 15

Zenkers Gemisch 29

Zimmermanns Gemisch 29

Fixierungsmethoden:

Abklatschpräparate 14

Ausstriche 14

— nach Breßlau 72/73

Centrifugiermethode 30

Gazeröhrchenmethode 30

Trockenausstrichpräp. 46, 53, 79

Fixierung unter dem Deckglas 29,
38, 74

Fixierung einzelner Protozoen nach
Enriques 76

Flagellaten 40 ff.

Foraminiferen 36

G

Gelbsucht der Seidenraupe und
Nonne 92

Glykogennachweis 44

Gregarinen 63

H

Hängender Tropfen 8

Haplosporidien 68

Heliozoen 37

Hemmung der Bewegung der
Protozoen 9, 71, 72

I

Immersion 3

K

Kultur von;

Actinophrys 37

Actinosphärium 37

Amöben 23 ff.

Babesia 57

Chlamydomonaden 40 ff.

Cryptomonas 42

Dinoflagellaten 42

Euglenen 40 ff.

Infusorien 68 ff.

Leishmania 52

Malariaplasmodien 57

Prowazekia 42

Spirochäten 79

Spirochaeta pallida 89

Thekamöben 35

Trypanosomen 49, 50

Uroglena 42

Volvocineen 40 ff.

L

Leishmanien 52

Leuchtbilduntersuchung 7

Lyssa 91

M

Malariaparasiten 53 ff.

Mikroskop 1

Mikroskopierlampen 4, 5

Mikrosporidien 65

Myxosporidien 65

N

Nährlösungen:

nach Benecke 41

„ Knop 40

„ v. Wettstein 42

„ Zumstein 41

P

Piroplasmen 56

R

Radiolarien 39

Reizserum 81

S

Sarkosporidien 67, 68

Spirochäten 78 ff.

Spirochaeta pallida 81

— Diagnose 87 ff.

T

Trachom 89

Trypanosomen 45 ff.

Trypanosomen - Nachweis 48, 49

— Überträger 50 ff.

V

Vaccine 90

Variola 90

Vitalfärbung 10 ff., 72

Verlag von Johann Ambrosius Barth in Leipzig.

HANDBUCH DER PATHOGENEN PROTOZOEN.

Unter Mitwirkung von zahlreichen Fachgelehrten herausgegeben von
S. v. Prowazek †, fortgeführt von **W. Nöller**, Berlin.

Band I (Lief. 1—4): VIII, 514 Seiten mit 205 Abbildungen im Text,
7 schwarzen und 6 farbigen Tafeln. 1912.

M. 115.—, geb. M. 140.—.

Band II (Lief. 5—7): IV, 524 Seiten mit 124 Abbildungen im Text,
5 schwarzen und 6 farbigen Tafeln. 1920.

M. 115.—, geb. M. 140.—.

Band III Lief. 8: 254 S. mit 100 Abbild. im Text und 1 farb. Tafel.
1921.

M. 64.—.

Lief. 9: 126 S. mit 143 Abbild. im Text, 1 farbigen und 1 schwarzen
Tafel. 1921.

M. 45.—.

Lief. 10: 206 S. mit 40 Abbild. im Text, 2 schwarzen und
3 farbigen Tafeln. 1921.

M. 63.—.

Lief. 11 mit Register für Band I—III wird Anfang 1922 das Werk abschließen.

Aus Breitensteins Repetitorien

für Mediziner, prakt., Ärzte, Pharmazeuten, Apotheker, Mathematiker,
Chemiker, Physiker, Techniker, Lehrer, als Katechismus für die Prü-
fungen, sowie als Vademekum für das Studium und die Praxis

seien empfohlen:

Arzt und Bakteriologisches Untersuchungsamt. Anleitungen zur
Entnahme und Versendung infektiösen Materials für Ärzte und
Studierende, zusammengestellt von Arno Trautmann.

V, 51 Seiten. 1920.

M. 7.—, geb. M. 9.40.

Bakteriologie (Systematik, Morphologie, Biologie und Nachweis-
methoden der wichtigsten menschenpathogenen Mikro-
organismen) als Vademekum für Studierende und praktische
Ärzte. 3., neubearbeitete Auflage. VII, 124 Seiten. 1919.

M. 5.75, geb. M. 8.15.

Epidemische Krankheiten als Vademekum für Aerzte und Studierende.

I. Teil: **Cholera** (Cholera asiatica, Cholera nostras, Cholera infantum)
gearbeitet nach Flügge, Koch, Pasteur, Pettenkofer u. a.
III, 29 Seiten.

M. 1.10, geb. M. 3.50.

II. Teil: **Akute Exantheme** (Morbilli, Skarlatina, Rubeolae, Variola,
Morbus miliaris etc.) gearbeitet nach Jürgensen, Leube,
Leyden, Nothnagel, Strümpell u. a. III, 47 Seiten.

M. 1.10, geb. M. 3.50.

III. Teil: **Typhus** (abdominalis, petechialis, recurrens) **und Dysen-
terie** gearbeitet nach Nothnagel, Seitz, Strümpell, Ziemssen
u. a. II, 41 Seiten.

M. 1.10, geb. M. 3.50.

Parasitenkunde. Tierische Parasiten des Menschen und der Haus-
tiere und die von ihnen herrührenden Krankheiten. VII,
143 Seiten.

M. 2.35, geb. M. 4.75.

Zoologie zum Gebrauche für Mediziner, Pharmazeuten. 4., vollständig
umgearbeitete Auflage. Etwa 8 Bogen. Erscheint Anfang 1922.

Für das Ausland kommt zu den Preisen ein Valuta-Aufschlag hinzu.

Verlag von Johann Ambrosius Barth in Leipzig.

Die Plasmodiden (Malariaerreger, sowie Plasmodien der Tiere) von **P. Mühlens**, Hamburg. IV, 216 Seiten mit 40 Abbildungen im Text, 2 schwarzen und 3 farbigen Tafeln. 1921. M. 66.—, geb. M. 74.—.

Tropenkrankheiten der Haustiere von **P. Knuth** und **P. J. du Toit**. XVI, 889 Seiten mit 143 Abbildungen im Text und 4 farbigen Tafeln. 1921. M. 240.—, geb. M. 264.—.
(Bildet Handbuch der Tropenkrankheiten, herausgegeben von Carl Mense, Band VI.)

Hämolysine, Zytoxine und Präzipitine von **A. v. Wassermann**. Neubearbeitet und ergänzt von J. Leuchs und M. Wassermann. IV, 124 Seiten. 1911. M. 12.—, geb. M. 18.—.

Die wirtschaftlich=wichtigen Zecken mit besonderer Berücksichtigung Afrikas von **W. Dönitz**. VIII, 127 Seiten mit 38 Abbildungen auf 6 Tafeln. 1907. M. 12.—, geb. M. 15.—.

Die Deutschen Marianen von **S. v. Prowazek**. Ihre Natur und Geschichte. VI, 125 Seiten mit 15 Abbildungen im Text. 1913. M. 8.—.

Über Stechmücken, besonders deren europäische Arten und ihre Bekämpfung Herausgegeben mit Unterstützung der Hamburgischen wissenschaftlichen Stiftung. Von **E. Martini**. 267 Seiten mit 117 Abbildungen und 4 Tafeln. 1920. M. 60.—.
(Bildet Beiheft I zum Archiv für Schiffs- u. Tropenhygiene, Band 24, 1920.)

Analytisches Diagnostikum Die chemischen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden von Harn, Auswurf, Magensaft, Blut, Kot usw. Ein Handbuch zum Gebrauche für Ärzte, Apotheker, Chemiker und Studierende von **Ernst Kraft**. 3., neubearbeitete Auflage. XVI, 480 Seiten mit 147 teils farbigen Abbildungen im Text und 5 farbigen Tafeln. 1921. M. 64.—, geb. M. 70.—.

Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie von **A. Dieudonné** und **W. Weichardt**. 10. umgearbeitete Auflage. VII, 240 Seiten. 1920. M. 28.—, geb. M. 36.—.

Differential-Diagnostik der inneren Krankheiten von **Georg Kühnemann**. 6. u. 7., durchgesehene Auflage. VIII, 242 Seiten. 1921. Geb. M. 25.—.

Für das Ausland kommt zu den Preisen ein Valuta-Aufschlag hinzu.