

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Jena
(Komm. Direktor: Dozent Dr. med. habil. GÜNTER BRUNS).

Ein Beitrag zur Histotopochemie der *Pneumocystis Carinii*.

Von

G. BRUNS und D. BÖTTGER.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. September 1954.)

Über den Erreger der sog. interstitiellen plasmacellulären Pneumonie (int. Pnm.), einer eigentlichen intraalveolären Pneumonie (PLIESS, BRUNS) der Säuglinge und Erwachsenen, *Pneumocystis Carinii*, sind im pathologisch-anatomischen Schrifttum der letzten Jahre in erster Linie morphologische Untersuchungen bekanntgeworden (VANEK und Mitarbeiter, GIESE, HAMPERL, HERZBERG und Mitarbeiter, PLIESS, BRUNS, JIROVEC und VANEK und FINGERLAND und VORTEL). JIROVEC und VANEK haben kürzlich die neuen deutschen und osteuropäischen Veröffentlichungen zusammengestellt. Die Pathogenität der Pneumocysten für den Menschen ist allgemein anerkannt worden.

Wir haben in eigenen Untersuchungen die Wechselbeziehung zwischen dem Erreger und Lungengewebe verfolgt und *Pneumocystis Carinii* intraepithelial, interstitiell sowie intravasal feststellen können. Bei einer jüngsten Beobachtung (Sekt.-Nr. 335/1954, 10 Wochen alter weiblicher Säugling) ist nun auch eine hämatogene Aussaat der Pneumocysten als Parasitenembolien und -cylinder in der Niere nachzuweisen gewesen. Wir stimmen jetzt mit JIROVEC und VANEK darin überein, daß die intraepithelialen Wabenformen — Sporocysten haben wir hier nicht beobachten können — sehr wahrscheinlich einer Phagocytose und nicht, wie ursprünglich von uns angenommen, einem aktiven Parasitismus entsprechen. Die Seltenheit einer solchen Phagocytose steht nachweislich in keinem annähernden Verhältnis zur Masse der extracellulären Pneumocysten. Die eigens daraufhin mit spezifisch lipophilen Fluorochromen untersuchten Makrophagen zeigen auch durchweg starke fettige Degeneration. Übrigens enthalten die bei int. Pnm. mitunter vorkommenden perifokalen Fremdkörperriesenzellen keine Parasiten, wie wir bei einer einschlägigen Beobachtung (Sekt.-Nr. 8/54, 14 Wochen alter weiblicher Säugling) festgestellt haben (s. a. JIROVEC und VANEK).

Damit entfällt aber einer der Hauptgründe, die Pneumocysten nach der auch bisher durch uns vertretenen Ansicht von VANEK und JIROVEC als Protozoen anzusprechen. Wenn es überhaupt erlaubt ist, Erreger

nach rein morphologischen Kriterien zu systematisieren, dann gehört *Pneumocystis Carinii* trotz mancher gestaltlicher Ähnlichkeit sicher nicht zur Ordnung der vorzüglich intraepithelial parasitierenden Coccidiae (WENYON) bzw. zu deren Gattungen *Klossiella* (STEVENSON) und *Cryptosporidia* (ARAGAO). So ist die den Coccidien eigene Oogamie bisher nicht bei *Pneumocystis Carinii* beobachtet worden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Entwicklung der Pneumocysten extracellulär erfolgt und nur unter allem Vorbehalt zulässig, ihre Vielfachstadien bestenfalls als Sporogonien zu deuten. So ordnen auch JIROVEC und VANEK den Parasiten provisorisch bei den Haplosporidien ein und besprechen in ihrer letzten Veröffentlichung eingehend seine systematische Stellung. Die inhomogene Unterklasse der Haplosporidien dürfte aber zu einem Teil wahre Pilze enthalten (WENYON).

Die Hefenatur der *Pneumocystis Carinii* wird ausgiebig diskutiert (GIESE, BAUCH und LADSTÄTTER, GLEISS, CSILLAG und Mitarbeiter, WUNDERLICH, PETERSEN und SIMON). Wir haben uns in vergleichenden Untersuchungen an Hand zweier Sepsisfälle durch *Candida pseudotropicalis*, über die unser Mitarbeiter BEUTHE berichtet, nicht davon überzeugen können, daß *Pneumocystis Carinii* den Candidapilzen morphologisch gleicht, wie BAUCH und LADSTÄTTER annehmen. Es unterscheiden sich auch die histologischen Lungenbefunde beider Erkrankungen weitgehend voneinander, selbst bei granulierenden Formen der int. Pnm. (Abb. 1 und 2). Candidae sind in unserem Sektionsmaterial in 60% aller untersuchten Organe von SCHABINSKI und SKOBEL als offenbar harmlose Saprophyten nachgewiesen worden. Positive Ergebnisse von Züchtungsversuchen (BAUCH und LADSTÄTTER) scheinen demnach keine Beweiskraft zu haben. Nach unserer Erfahrung an 3 Beobachtungen einer endogenen Candidamykose lassen sich die Pilze post mortem mit akutem Erfolg auf Ratten übertragen, die in den Parenchymen histologisch gleichartige Pilzgranulome aufweisen wie im menschlichen Ausgangsmaterial. Dagegen ist eine entsprechende Übertragung der *Pneumocystis Carinii* auf das Tier entgegen anders lautenden Befunden (HERZBERG und Mitarbeiter, LINNEWEH, DICKMAN) bisher nur CSILLAG und Mitarbeitern gelungen.

Im Hinblick auf die noch ausstehende mikrobiologische Einstufung der *Pneumocystis Carinii* können folgende Beobachtungen zur weiteren Klärung beitragen. Pneumocysten sind wie Pilze gegen Autolyse resistent. In völlig autolytischem, praktisch nicht mehr anfärbbaren Lungengewebe lassen sie sich metachromatisch und durch Nilblausulfat nachweisen, besonders nach Differenzierung mit Essigsäure. Von weiterer Bedeutung erscheint uns neben den grampositiven Parasitenformen, die jetzt auch von JIROVEC und VANEK beschrieben worden sind, deren Ansichten über die morphologische Deutung dieser Befunde

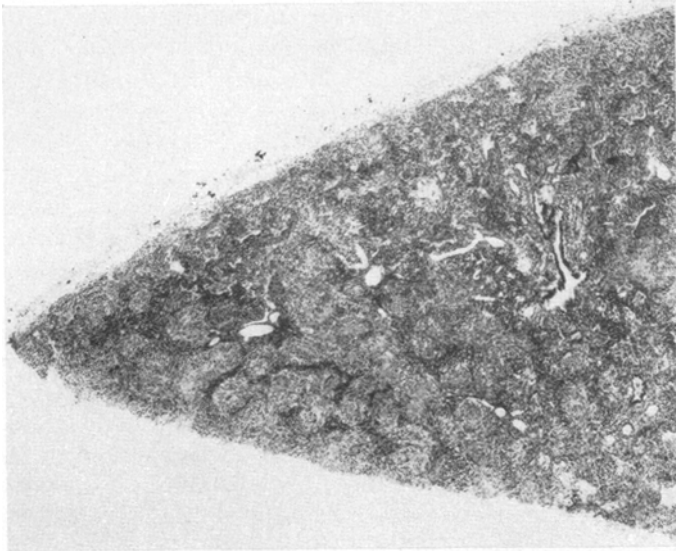


Abb. 1. Sekt.-Nr. 8/40, ♀, 10. Lebenswoche. Lunge, Paraffinschnitt. H.-E. Vergr. 24:1. Granulierende „interstitielle, plasmacelluläre Pneumonie“ mit Fremdkörperriesenzellen.

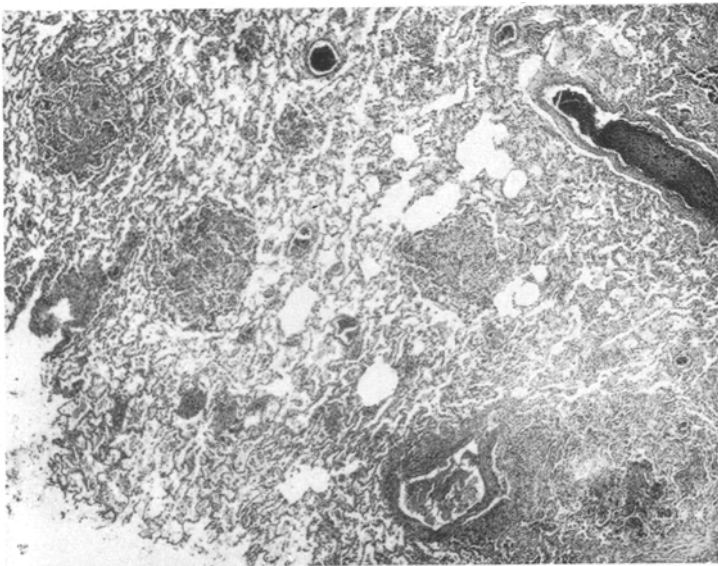


Abb. 2. Sekt.-Nr. 350/54, ♀, 26 Jahre. Lunge, Paraffinschnitt; H.-E. Vergr. 21:1. Vier Pilzgranulome bei Candidasepsis.

aber von anderen abweicht (GIESE, PLIESS), der Nachweis von Sprossungsfiguren (Abb. 3). Das nach GIESE für Pilze symptomatische

Wachstum auf inneren Oberflächen haben wir bei insgesamt 5 endogenen Mykosen nicht beobachten können. Die alternative Frage, ob die Vielfachstadien der *Pneumocysten* Sporogonien oder Sporangien sind, wird sich histologisch überhaupt nicht mit einer ausreichenden Sicherheit entscheiden lassen. Es ist aber anzunehmen, daß sie wegen ihrer relativen Seltenheit im Gewebsschnitt keine Merozoiten darstellen (JIROVEC und VANEK).

Über Strukturanalysen der *Pneumocysten* ist bisher wenig bekanntgeworden. Das morphologische Substrat und die Lokalisation der zuerst von GIESE nachgewiesenen grampositiven Substanzen ist noch ungeklärt (PLIESS, JIROVEC und VANEK). Die von HAMPERL zuerst beschriebene PAS-positive Substanz in den Parasitenmembranen ist bisher nicht weiter analysiert worden. BRUNS und BÖTTGER haben diese Befunde lediglich durch den weiteren Nachweis metachromatischer Stoffe am gleichen Ort ergänzt, der auch an Paraffinschnitten deutlich und noch einfacher durchzuführen ist.

In den folgenden Untersuchungen haben wir die noch ausstehende histotopochemische Analyse der *Pneumocystis Carinii* durchgeführt, in der Erwartung, zur Lösung der Alternative Pilz oder Protozoe beitragen zu können.

Eigene Befunde.

Es ist an Gewebsschnitten mit gebührender Vorsicht, besonders im Hinblick auf die Komplexheit aller Färbevorgänge, versucht worden, aus Farbstoffeffekten an *Pneumocystis Carinii* auf die Art, Struktur und Lokalisation von Baustoffen, Eiweißen, Kohlenhydraten, Fetten und Lipiden zu schließen.

1. Elektrostatische Untersuchungen der *Pneumocystis Carinii*.

a) **Methodisches.** Wie man die Färbung fixierter Gewebe auch physikalisch-chemisch deuten mag, für den Farbstoffeffekt spielen die Ladungsverhältnisse des Gewebes und die Wasserstoffionenkonzentration (CH) der Farbstofflösung (DRAWERT, STRUGGER) eine entscheidende Rolle. Hinsichtlich der Gewebe und ihrer Baustoffe sind es fast ausschließlich Eiweiße, die abhängig von der jeweiligen CH eine in sich wechselnde Masse positiver und negativer Valenzen tragen. Letztere lassen sich daher auch elektrophoretisch trennen (WUHRMANN und WUNDERLY). Die Färbung der Eiweißkörper muß also im histologischen Schnitt unter anderem p_H -abhängig sein. Umgekehrt läßt sich aus der p_H -Abhängigkeit einer Färbung auf eiweißhaltige Substrate im Gewebe schließen. Nach ihrem elektrostatischen Verhalten (BETHE, FISCHINGER) besitzen sie einen isoelektrischen Bereich (IEP_M), den wir im Hinblick auf die Ausarbeitung spezifischer Anfärbungen der Erreger zu bestimmen versucht haben.

Tabelle 1.

pH-Bereich	Pufferlösung
bis 3,6	Salzsäure-Natriumcitrat
bis 5,7	Natriumcitrat-Natronlauge
bis 7,6	prim. Kaliumphosphat—sek. Natriumphosphat
bis 9,6	Salzsäure-Natriumborat
bis 10,5	Natriumborat-Natronlauge

Tabelle 2.

Fluorochrom	Färbezeit	Umschlagbereich	Ladung
Natriumfluorescein	10 min	pH 5,5	Anion
Berberinsulfat	3 min	pH 11	Kation
Rhodamin B	30 sec	pH 2	Kation
Benzpyren-Coffein	20 min	—	elektroneutral

b) **Die Fluorochromierung.** Für die Bestimmung des IEP_M im Gewebe eignen sich vorzüglich Fluorochrome, mit denen sich in geringer Konzentration und nach kurzer Färbezeit starke Farbstoffeffekte erzielen lassen. Bei den Vitalfärbungen beeinträchtigen sie die Gewebe in nur geringem Maße.

Technik: Gefrierschnitte der Lunge nach Formalinfixierung. Die jeweiligen Fluorochromlösungen 1:1000/Aqua dest. zusätzlich mit Pufferlösung auf 1:10000 verdünnt. Die erforderlichen Pufferlösungen nach SÖRENSEN (Rezept nach KÜSTER) s. Tabelle 1.

Die CH der Pufferlösungen ist mit der Glaselektrode, diejenige der Fluorochromlösungen nicht durchgehend kontrolliert worden. Mögliche Differenzen zwischen eingestelltem und realem p_H liegen unter $p_H \pm 0,2$. Aus Tabelle 2 sind die verwendeten Fluorochrome, ihre Ladung und Umschlagbereiche sowie die Färbezeiten ersichtlich. Die Benzpyren-Coffeinlösung ist nach den Angaben von BERG hergestellt worden.

Die Ergebnisse der Fluorochromierungen sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Pneumocystis Carinii besitzt weder im Gefrier- noch im Paraffinschnitt eine Eigenfluoreszenz. Im einzelnen zeigt Berberinsulfat bei Färbung der Pneumocystenkerne zwischen p_H 3,6 und 5,7 einen deutlichen Intensitätssprung der Fluoreszenz. Da Berberinsulfatkationen nur in elektroadsorptiver Bindung fluoreszieren, muß das Adsorbens sauer reagieren. Letzteres verhält sich andererseits im sauren Bereich basisch, kenntlich an der Adsorption der Natriumfluoresceinanionen. Damit zeichnet sich im Kern der Pneumocysten ein IEP_M ab, der auf einen Eiweißgehalt schließen läßt. Ausweislich der geringen Kernfärbbarkeit mit neutralem Rhodamin B und Benzpyrencoffein dürfte dieser Eiweißanteil auch etwas lipidhaltig sein. Die Fluoreszenz der Pneumo-

Tabelle 3. *Die Fluorochromierung des Pneumocystenkerns.*

Farbstoff	Kerne	pH der Farbstofflösung					
		1,7	3,6	5,7	7,6	9,6	10,5
Natriumfluorescein . .	gelbgrün	+	+	—	—	—	—
Berberinsulfat	gelbgrün	—	(+)	+++	+++	+++	+++
Rhodamin B	gelborange	—	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Benzpyren-Coffein . .	bläulich	nur im neutralen Bereich					

Die Fluorochromierung der Pneumocystenmembran.

	Membran						
Natriumfluorescein . .	—	—	—	—	—	—	—
Berberinsulfat	gelbgrün	—	(+)	++	++	++	++
Rhodamin B	gelborange	(+)	+++	+++	+++	+++	+++
Benzpyren-Coffein . .	hellblau	nur im neutralen Bereich					

Tabelle 4. *Diachromierung des Pneumocystenkerns.*

Farbstoff	Kern	pH der Farbstofflösung							
		2,4	2,8	3,2	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2
Säurefuchsin . .	rot	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
Neutralrot . . .	rot	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++

cystenmembran ergibt innerhalb der Pufferreihe mit Berberinsulfat und Rhodamin B einen deutlichen Adsorptionswechsel. Im Gegensatz zur Fluorochromierung der Kerne läßt sich aber hier ein IEP_M nur angenähert abtrennen. Es ist nicht sicher zu entscheiden, ob das Adsorbens eine nicht umladbare Substanz darstellt, die möglicherweise elektro-negativ (Berberinsulfat) und lipidhaltig (Rhodamin B, Benzpyren-Coffein) sein könnte und als Polysaccharid anzusprechen wäre.

c) **Die Diachromierung.** Mit der Fluorochromierung hat sich bisher keine elektive Anfärbung der Pneumocysten erreichen lassen, vor allem nicht wegen der mangelhaften Differenzierung gegenüber anderen Gewebsstrukturen, unter anderem den Zellkernen des Lungengewebes.

Der IEP_M der Pneumocysten ist weiterhin mit Diachromen, dem Kationenfarbstoff Neutralrot und dem Anionenfarbstoff Säurefuchsin eingengt worden.

Technik s. o.: 1 Teil gesättigte wäßrige Stammlösung und 30 Teile Pufferlösung. Färbedauer 10 min und anschließend Wässerung 15 min. Die Anfärbung der Pneumocystenkerne ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

Der IEP_M des Pneumocystenkerns liegt zwischen p_H 3,6 und 4,0. Dieser Wert ist unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Fixierung und der unvermeidlichen Autolyse (die Sektionen haben durchschnittlich etwa 12 Std nach dem Tode stattgefunden) nur als angenähert zu betrachten, worauf kürzlich LORKE hingewiesen hat.

Tabelle 5. Umladebereich der *Pneumocysten*.

Pneumo- cysten	Farbstoffe	pH der Farbstofflösungen											
		3,20	4,13	4,33	4,66	4,93	5,32	6,12	6,75	6,99	7,25	8,18	9,16
{ Membran	Kristallponceau												
	Alkohol . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Formalin . . .								—	+	+	+	+
{ Kerne	Methylenblau												
	Alkohol . . .	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Formalin . . .	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Die Ladung der *Pneumocystis Carinii* verschiebt sich in formalin- und alkoholfixierten Lungenschnitten nach der exakten Methode von PISCHINGER (s. a. ZEIGER, YASUZUMI) unter Benutzung hochdispenser, nicht umladbarer Farbstoffe (saures Kristallponceau und Methylenblau) und des Acetat-Veronalpuffers (MICHAELIS) weiter gegen den Neutralpunkt (Tabelle 5).

Die Umladebereiche der Pneumocystenkerne haben sich auf p_H 5,53 (Formalin) und 6,44 (Alkohol), jene der Membranen auf p_H 6,87 (Formalin) und 7,0 (Alkohol) einengen lassen. Die vorliegenden Ergebnisse sind das Mittel von insgesamt 4 Einzeluntersuchungen. Für die weiteren histotopochemischen Untersuchungen ist der Nachweis einer nur schwach sauer reagierenden, praktisch neutralen Pneumocystenmembran (p_H Mittel 6,94) bedeutungsvoll. Die Vermutung, daß es sich bei dieser Membran um eine praktisch nicht umladbare Substanz handeln könnte (siehe S. 283), scheint dadurch gestützt zu werden.

2. Die Histotopochemie der *Pneumocystis Carinii*.

a) Die Toluidinblaufärbung. Die Erreger der int. Pnm. sind metachromatisch anfärbbar. Die von uns am Gefrierschnitt angegebene Toluidinblaufärbung ist, wie wir inzwischen nach der Technik von LILLIE festgestellt haben, auch in Paraffinschnitten entgegen der Angabe von PLESS positiv.

Technik: 0,2%ige Toluidinblaulösung, Färbung 60 sec. Differenzieren in Aceton, Aufhellung in Xylol.

Die gegenüber dem Gefrierschnitt und im Vergleich zu den stark metachromatischen Bronchialknorpeln sehr viel schwächere Metachromasie ist morphologisch schwer zu lokalisieren. Sie scheint am Gefrierschnitt im eigentlichen Parasitenkörper ($2-4\mu$) stärker ausgebildet zu sein als in den Membranen, während sich der Wabeninhalt nur

schwach metachromatisch zeigt. Im Paraffinschnitt sind die Membranen von metachromatischen Außen- und Innenringen eingefasst. Der eigentliche Parasit ist nicht mehr metachromatisch. Es entsteht so der Eindruck, daß die in den Paraffinschnitten optisch leer erscheinenden Waben doch eine homogene perinucleäre Substanz enthalten. Die Metachromasie der angegebenen Strukturen bleibt in Paraffinschnitten auch nach 24stündiger Alkoholextraktion bestehen. Die Membranen sind in den Wabenkolonien nicht gleichmäßig metachromatisch und besonders im Zentrum, möglicherweise durch Überlagerung der Parasiten, zu bandförmig gezackten Gerinnungsfiguren verdichtet.

Betrachtet man *Pneumocystis Carinii* als Hefe, so könnte die nachgewiesene Metachromasie auf die Existenz von Pilzvolutin hinweisen, das in Hefezellen als Metaphosphat vorkommt (WIAHE). Immerhin enthalten auch Protozoen, besonders die Coccidien, Volutin (DOFLEIN-REICHENOW). Dieses besitzt in noch nicht bestimmbarer Form Nucleinsäuren, ähnlich der grampositiven Substanz, welche aber nicht mit dem Volutin identisch ist. In Hefezellen sind die feulgen- und grampositive Substanz mit Phosphatasen verknüpft (SCHUSSNIG). Vergleicht man nach GOMORI phosphorylierte Hefezellen mit einer Goldner-Färbung der Pneumocysten, so gewinnt man auf Grund adäquat angefärbter Strukturen den Eindruck, als ließen sich die Pneumocysten in einem Gewebsschnitt nacheinander metachromatisch (Toluidinblau) und mittels Gramfärbung vollständig darstellen. Diese Kongruenz beider Färbungen halten wir im Hinblick auf die mögliche Hefenatur der Pneumocysten für bemerkenswert.

b) Die Gramfärbung. Nach GIESE sind gewisse Strukturen der Pneumocysten grampositiv. PLIESS hält diese für Kernsubstanzen, was von JIROVEC und VANEK bestritten wird. Mit Kernfarbstoffen ist es uns bisher nicht gelungen, in den Pneumocysten Strukturen von Größe und Form der grampositiven Elemente nachzuweisen. Das trifft auch für die von PLIESS beschriebenen grampositiven Napf- und Kugelformen der Parasiten zu. Die grampositive Substanz liegt in der Zellperipherie des etwa kugelförmigen Erregers (s. Abb. 3 und 4), wobei nicht recht zu unterscheiden ist, ob sie nur der Zellmembran anliegt, oder aber in sie eingelagert ist. In der Flächenausdehnung bildet sie stets mehr oder weniger große Kugelkappen, allenfalls Kugelzonen, selten vollständige Kugeln. Wir können also in den wesentlichen Punkten die jüngst veröffentlichten Befunde von JIROVEC und VANEK bestätigen. Die grampositiven Strukturen fallen bei schiefer Beleuchtung und Abblendung sowie im Dunkelfeld durch intensiven Glanz auf. Wir sind allerdings nicht der Meinung, daß dieses optische Phänomen durch ungenügende Entwässerung der nach Gram gefärbten Paraffinschnitte zustande kommt. Eine starke, zum Teil nur segmentale Lichtbrechung haben wir auch in nicht grampositiven Wabenformen gesehen.

Nach SCHUSSNIG ist „ die GRAMSche Färbungsreaktion ein Indicator für einen strukturellen Zustand der Bakterienzelloberfläche..., in

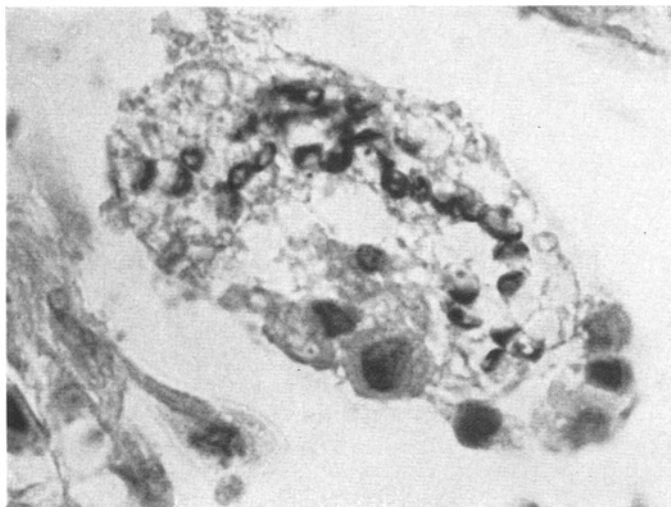


Abb. 3. Sekt.-Nr. 625/53, ♂, 18. Lebenswoche. Lunge, Paraffinschnitt. Gramfärbung. Vergr. 1260:1. In der Alveole Wabenkolonie von *Pneumocystis Carinii*. Kettenförmige, nach oben konvexe Sprossungsfigur grampositiver Pneumocysten. Am linken Kettenende sog. Napfformen des Parasiten.

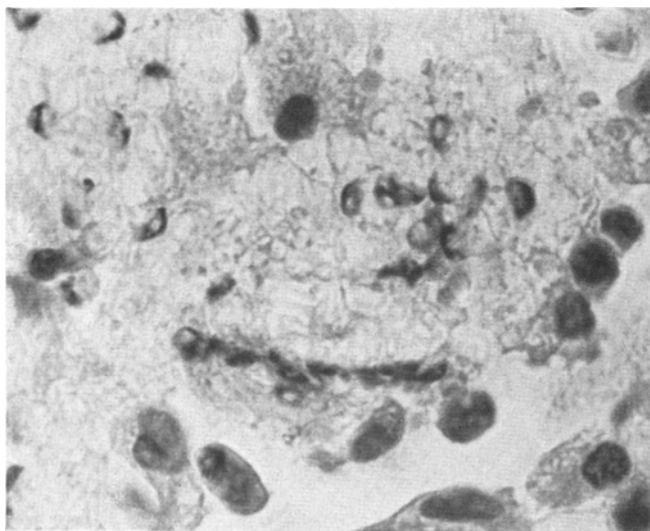


Abb. 4. Sekt.-Nr. 625/53 (s. Abb. 3). Gradlinige Sprossung der Pneumocysten über dem unteren Alveolarrand.

welcher, außer der eiweißstofflichen Grundtextur, Ribonucleinsäure, Polysaccharide und verschiedene Enzymsysteme zu einem komplexen

Molekulargefüge vereinigt sind“. Der Analogieschluß, daß diese Definition auch für eine grampositive kernhaltige Zelle gilt, scheint erlaubt. Die lichtoptisch glänzenden, grampositiven Substanzen, können also nicht allein aus Kernstoffen bestehen noch auf einem Arteffekt bei der Schnittverarbeitung beruhen.

Es ist durchaus denkbar, daß dieses Phänomen auf eine mögliche derbe Sporangienhülle hinweist. Es ist aber PLIESS beizupflichten, daß nur die Entwicklungsstadien des Erregers grampositiv sind.

Man kann gelegentlich sehen, daß die grampositiven Strukturen, besonders in den Achterstadien, einen roten, von der Tinktion mit Kernechtrot herrührenden Innenbezirk haben, wie er auch nach reiner Kernechtrotfärbung auftritt. Wir sind der Ansicht, daß es sich bei diesen Kernechtrot-positiven Zentren um Kerne oder Kernäquivalente handelt, die von der grampositiven Substanz umhüllt werden. Die naheliegende Frage, ob es möglicherweise auch Sporen sein könnten, vermögen wir nicht zu entscheiden. Für GIESE ist die Anfärbung der Pneumocysten nach GRAM ein Hauptgrund, in den Erregern Hefen zu vermuten. Unter den Protozoen sind nur die Trichomonaden grampositiv, allerdings erst nach einer modifizierten Methode (MERLIN).

c) **Die Trichromfärbungen.** Die Anfärbung der Pneumocysten nach GOLDNER und VAN GIESON hat nach Vergleichen mit der H.-E.-Färbung folgendes Ergebnis. Keine der Färbungen ermöglicht eine Differenzierung zwischen der Membran und dem eigentlichen Parasitenkörper. Erstere scheint die sauren Plasmafarbstoffe etwas intensiver aufzunehmen. Diese stärkere Tinktion kann aber auch durch die Krümmung der Membran zustande kommen, da wegen des tangentialen Strahlenganges die Lichtabsorption in der Peripherie des Parasiten stärker sein muß.

Bemerkenswert ist der Unterschied in der Färbbarkeit des Parasitenkerns nach H.-E. und Goldner. Bei der H.-E.-Färbung ist der Kern blau, inhomogen, polymorph; nach der Goldner-Färbung läßt sich ein brauner von einem roten Kernanteil unterscheiden. Manche Pneumocysten haben nur rote, andere rot und braun gefärbte Kerne. Außerdem kommen in der Zellperipherie durch Ponceau und Säurefuchsin färbbare, leuchtend rote, sichelförmige Strukturen wie in den Kernen vor, welche aber niemals die Größe der grampositiven Strukturen erreichen. Man kann also feststellen, daß sich ein Teil, meist der größere des Zellkerns nicht mit Kationen, sondern mit Anionenfarbstoffen darstellt. Dieser acidophile Kernbestandteil kann ein Nucleolus, möglicherweise aber auch ein bei den Hefen innerhalb der Kernmembran gelegenes Zentrosom sein. So ist nach LINDEGRENS karyologischen Studien an Hefen das große, überdies interphasisch von Heterochromatin umgebene Zentrosom bisher fälschlicherweise immer als Zellkern aufgefaßt worden.

Während der Mitose soll es zu einer Dissoziation des Zentrosom vom Heterochromatin kommen und das Zentrosom in Richtung auf die Tochterzelle vorausseilen. So lange es sich aber in der Mutterzelle befindet, bleibt es mit den Chromosomen durch einen anionischen Plasmastrang verbunden, der sich färberisch auf Grund gleicher Ladungen nicht von dem übrigen Cytoplasma differenzieren läßt. Diese partielle Dissoziation des Kerns muß also nach den physikochemischen Voraussetzungen als totale Dissoziation imponieren. Es ist also durchaus denkbar, daß die bei der Trichromfärbung nach GOLDNER neben-

einander rot und braun tingierten Kernsubstanzen eine solche Dissoziation wie bei den Hefen anzeigen.

d) Die Fettfärbungen. Für die Existenz von Fetten und Lipiden in den Pneumocysten sprechen die schwach positiven Färbungen nach Sudan III und Nilblausulfat sowie die intensive Fluoreszenz nach Rhodamin B und Benzpyren-Coffein (siehe Abb. 5). Nach Rhodamin B-Fluorochromierung leuchten fast ausschließlich die Mem-

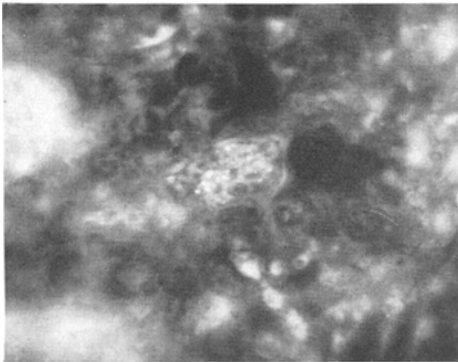


Abb. 5. Sekt.-Nr. 625/53 (s. Abb. 3). Lunge, Gefrierschnitt. Benzpyren-Coffeinfluorochromierung. UV-Licht. Vergr. 290:1. Im Zentrum fluoreszierende Wabenkolonie in einer Alveole mit lipidhaltigen Pneumocysten.

branen orange gelb, weniger die Kerne. Obwohl dieses Fluorochrom ab p_H 2,0 in molekularer, lipidlöslicher Form vorliegt, darf aus der Fluorochromierung nicht auf einen ausschließlichen Lipidgehalt der Pneumocystenmembranen geschlossen werden. Unter Berücksichtigung der wenn auch nur geringen Fluoreszenz der unscharf begrenzten Parasitenkerne muß an die Möglichkeit gedacht werden, daß gewisse Substrate aus molekularen Farbstofflösungen Farbstoffkationen an sich zu reißen vermögen. HÖFLER erwähnt einen solchen Fall bei der Fluorochromierung pflanzlicher Gewebe mit dem Acridinorange. Dieser Vorgang läßt sich in einem Modellversuch demonstrieren. Gibt man einen Tropfen Xylol, der Berberinsulfat in molekularer Lösung enthält, auf Filterpapier, so erscheint statt der ultramarinblauen Fluoreszenz der Xylol-Fluorochromlösung alsbald die typisch hellgelbgrüne intensive Fluoreszenz adsorbierter Berberinsulfatkationen.

Im Gegensatz zu den bestenfalls minimal lipidhaltigen Zellkernen fluorescieren die Pneumocystenmembranen mit dem spezifischen Benzpyren-Coffein hellblau (Abb. 5). Die Intensität der Fluoreszenz entspricht nach BERG einer mäßig starken Konzentration an maskierten

Lipiden. Mit dem Benzpyren-Coffeingemisch läßt sich der Kern kaum fluorochromieren, während innerhalb der Wabe einige wenige Lipidtröpfchen nachgewiesen werden können.

e) **Die Polysaccharidfärbungen.** Die Membranen der Pneumocysten und einige Granula in den Waben ergeben nach HAMPERL eine positive PAS-Reaktion. Wir haben nach Entparaffierung und Ausschluß freier Aldehydgruppen Lungenschnitte mit der Hotchkiss-Methode gefärbt. Das Färbeergebnis scheint praktisch mit dem nach Toluidinblaufärbung

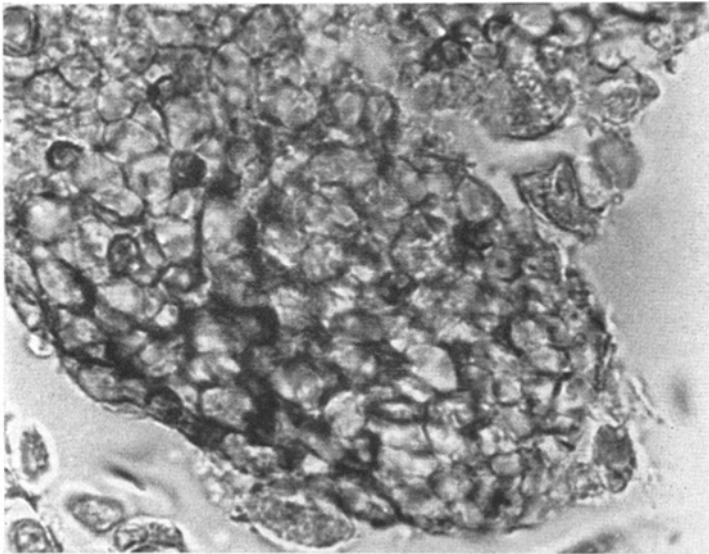


Abb. 6. Sekt.-Nr. 625/53 (s. Abb. 3). Lunge, Paraffinschnitt. PAS-Reaktion. Vergr. 1240:1. PAS-positive Pneumocystenmembranen in einer Wabenkolonie. In einzelnen Parasiten schwach positive Innenringe, die bei extrafokaler Einstellung glänzen.

übereinzustimmen; die Membranen zeigen nur stärkere Rötung als Metachromasie. Die Rötung ist jedoch in der Kolonie ebenso ungleichmäßig verteilt und läßt deutliche zentrale Verdichtungsfiguren erkennen. Die Innenringe der Membranen sind gegenüber der Toluidinblaufärbung nur schwach gerötet, fallen aber nach Abblendung durch starken Glanz auf (Abb. 6). Nach 24stündiger Alkoholbehandlung der entparaffinierten Schnitte ist der Innenring zum größten Teil eluiert, während die Verdichtungsfiguren erhalten bleiben. Über die weitere Differenzierung der PAS-positiven Substanzen unterrichtet Tabelle 6.

Ergebnis. Die metachromatischen und PAS-positiven Substanzen sind in Paraffinschnitten an den gleichen Orten des Parasiten lokalisiert. Stark positiv sind die zentralen Verdichtungsfiguren, schwach positiv die Innenringe, welche nur im Paraffinschnitt erscheinen. Bei einem Vergleich der Gefrier- und Paraffinschnitte ist der metachromatische Innenring offenbar ein lipid-unlöslicher Rest des eigentlichen

metachromatischen Cytoplasmas. Es liegt der Schluß nahe, daß dieser nur im Paraffinschnitt erscheinende Innenring durch Entfettung, Verdichtung und stärkere Oberflächenspannung des cytoplasmatischen Parasitenkörpers zustande kommt.

Besprechung.

Der überwiegende Teil der metachromatischen Substanzen wird durch Hyaluronidase (Kinetin) verdaut. Die PAS-positiven Substanzen der Pneumocysten werden dagegen durch Kinetin nur zu einem geringen Teil angedaut. Beide Substanzen sind demnach nicht miteinander identisch.

Die vorliegenden Untersuchungen der *Pneumocystis Carinii* haben unter Verwendung spezifischer Färbemethoden eine Differenzierung und Lokalisation der einzeln darstellbaren Baustoffe des Erregers ermöglicht. Die jeweiligen Färbeverfahren erfassen aber nur eine oder einfach gekoppelte Baustoffträger, nicht den Gesamtkomplex der Molekularstrukturen. Die einzelnen Bausteine ergeben ein Mosaik, dessen histotopochemisch unterbaute Struktur die Grundtextur des Erregers darstellt. Diese hat nach den in allen Untersuchungen weitgehend übereinstimmenden Umladebereichen einen elektrostatisch schwach sauren, praktisch neutralen Charakter. Dieses Verhalten läßt zunächst auf elektrisch indifferente Eiweißbausteine des Parasitenkörpers schließen, die vermutlich aus Polypeptiden mit ausgeglichenen elektronegativen und -positiven Valenzen bestehen. Die elektrostatische Indifferenz der Eiweiße wird durch die Benzpyren-Coffeinfluorochromierung der Pneumocysten weiter gestützt. Die positive Fluoreszenz dieses Fluorochromgemisches tritt nach eigenen Untersuchungen immer bei neutral reagierenden Adsorbenten und Adsorbaten auf. Deswegen eignet es sich vorzüglich zur Darstellung maskierter glyko- und proteidhaltiger Lipidkomplexe. Die Fluoreszenz dieser Lipidkomplexe wird durch die physiko-chemische Wirkung des basischen Coffeins induziert, das als Eiweißhaptin fungiert und die Lipidlöslichkeit des 1,2-Benzpyrens ermöglicht. Der Hauptbaustoff der Pneumocysten sind aber Polysaccharide, die als PAS-positive Substanz und nach den Kontrolluntersuchungen (McMANUS und CASON) benachbarte, unveresterte α -Glykolgruppen enthalten. Die weitere Analyse dieser Polysaccharide hat ergeben, daß entsprechend dem schwach sauren Umladebereich der Pneumocysten von den in Betracht kommenden KH-Gruppen überwiegend neutrale α -Aminoalkohole, α -Alkylaminoalkohole oder ungesättigte Äthylenverbindungen vorliegen müssen. Nur ein verschwindend geringer Anteil der KH reagiert als saures mesenchymales Mucopolysaccharid und wird durch Toluidinblau und die HALESCHE Reaktion dargestellt sowie durch Hyaluronidase (Kinetin) fast vollständig verdaut. Von den Polysacchariden mit 1,2 OH und 1,2 OH NH₂-Grup-

pierung (NICOLET und SHINN) wird man nach den Untersuchungen von HOTCHKISS und GOMORI letztere als wesentliche Bestandteile der Pneumocysten ausschließen dürfen, da sie in Oxyaminosäuren praktisch durch Polypeptide blockiert und PAS-negativ sind. Die in Pneumocystis Carinii nachgewiesenen PAS-positiven Substanzen sind also vorwiegend neutrale Mucopolysaccharide und Glykolipide, letztere in voller Übereinstimmung mit den Färbeergebnissen bei der Benzpyren-Coffeinfurochromierung. Neutrale Mucopolysaccharide kommen hauptsächlich in der Leibessubstanz einiger Mikroorganismen und im Chitin von Pilzen vor (RIPPEL-BALDES). Die histochemisch nachgewiesenen Glykolipide lassen sich teilweise blockieren (s. Tabelle 6). Quantitativ dürften

Tabelle 6.

Färbungen	Membran	Gerinnungsfiguren	Innenring	Wabe	Parasit
Toluidinblau (Gefrierschnitt) . .	++	+++	—	+	++
Toluidinblau (Paraffinschnitt) .	++	+++	+	—	—
Hyaluronidase (Paraffinschnitt).	(+)	(+)	(+)	—	—
PAS-Reaktion (Paraffinschnitt).	+++	++++	(+)	—	—
Hyaluronidase (Paraffinschnitt).	++	+++	(+)	—	—
PAS-Acetylierung	entfärbt	entfärbt	entfärbt	—	—
PAS-Entacetylierung	++	+++	(+)	—	—
HALESche Reaktion	+	++	—	—	—

sie hinter den neutralen Mucopolysacchariden rangieren. Ob sie aus Sphingomyelinen, Cerebrosiden oder Serinen (WOLMAN) bestehen, vermögen wir nicht zu entscheiden. Vermutlich sind es aber phosphorylierte Komplexe, wie sich aus der Gramfärbung schließen läßt.

Die histochemische Spezifität der verwendeten Färbemethoden ergibt sich aus den vorgelegten Untersuchungen. Die Toluidinblaufärbung (Metachromasie) und HALESche Reaktion (Bindung dialysierten Eisens durch schwefelsaure und Carboxylgruppen) ergänzen sich in dem Nachweis stark basophiler Substrate. Es sind das hochmolekulare metachromatische Stoffe (WIAME) mit sauren aber auch schwefelsäurefreien Gruppen und Nucleinsäuren (WISLOCKI und Mitarbeiter, PEARSE, LISON und MUTSAARS, BRUNS). Letztere haben wir in unserem Material leider nicht untersuchen können, halten aber ihre Existenz in der Leibessubstanz der Pneumocysten für sehr wahrscheinlich, besonders nach dem positiven Ausfall der Gramfärbung und auf Grund theoretischer Voraussetzungen (s. Zentrosom). Die Toluidinblaufärbung und HALEsche Reaktion der Pneumocystis Carinii dürften auf stark sauer reagierende Mucopolysaccharide zurückgehen, in erster Linie auf schwefelsäurehaltige Hyaluronsäuren, weniger auf die allgemein veresterten Chondroitinschwefelsäuren.

Das 1,2-Benzpyren-Coffeinfluorochromgemisch hat sich uns schon mehrmals zur Darstellung solcher maskierter Lipidkomplexe bewährt, die sich durch kolloidales Sudan III nicht ausreichend nachweisen lassen (ROMEIS). Es scheint Glykolipide auch quantitativ intensiver anzufärben als das Weinstein säure-Thioningemisch (FEYRTER).

Die PAS-Reaktion ermöglicht keine Auftrennung der Polysaccharide in saure und neutrale Komplexe, die qualitativ erst durch Kontrolluntersuchungen mittels Hyaluronidase, metachromatischer Farbstoffe, der HALEschen Reaktion und der McManus-Cason-Acetylierung Erfolg verspricht. Die Gramfärbung scheint in Gegenwart ribonucleinsäure- und polysaccharidhaltiger Stoffe positiv auszufallen, unter letzteren vermutlich nur bei phosphorylierten zuckerhaltigen Glykolipiden.

Die histotopochemischen Untersuchungen der *Pneumocystis Carinii* machen nun eine morphologische Analyse der Baustoffträger möglich. Die Masse der Pneumocystenmembranen und ihre Verdichtungsfiguren enthalten vornehmlich neutrale Mucopolysaccharide (Chitin?), zu einem geringeren Anteil Glykolipide und selten saure Mucopolysaccharide. Eiweißbausteine sind vermutlich kein tragender Strukturanteil im Hinblick auf die formgebende Grundtextur, sondern eher als Proteide in die Nebenketten der großen KH-Moleküle eingebaut. Die vorzüglich polysaccharidhaltigen Membranen der Pneumocysten entsprechen in ihrer Zusammensetzung als KH-Depot (SCHUMACHER) eher den Hefezellmembranen. Sie gleichen auf keinen Fall jenem Bauplan kontinuierlicher Eiweißfolien und Lipidlamellen im Ektoplasma der meisten Protozoen. Von diesen tragen nur die Flagellaten eine dünne Lage KH unter ihrer Oberfläche. In weiterer Übereinstimmung mit den Hefen zeigt *Pneumocystis Carinii* ein lipidhaltiges Cytoplasma, das sich in vergleichenden Untersuchungen am Paraffinschnitt als Innenring darstellt. Dieser enthält vornehmlich Glykolipide, sehr wahrscheinlich auch Nucleinsäuren. Dieser Zusammensetzung entspricht eine positive Gramfärbung.

Das von allen Untersuchern angegebene Glänzen der grampositiven Substanz (s. neuerdings auch FINGERLAND und VORTEL) führen wir auf den histochemisch nachgewiesenen Lipidgehalt des Cytoplasmas zurück.

Der glykolipid- und ribonucleotidhaltige Innenring der Pneumocysten erscheint nur in Paraffinschnitten. Vermutlich entsteht er nach Vergleichen an Gefrierschnitten durch Verdichtung des Cytoplasmas der Parasiten, könnte also ein Kunstprodukt sein. Nach dieser Auffassung ist der als Wabe bezeichnete Innenraum der lebensfrischen Pneumocyste nicht als optisch leer anzusprechen. Wir haben die Vorstellung, daß *Pneumocystis Carinii* neben einem Kern (pos. Feulgen-Reaktion) ein lipid-nucleoproteidhaltiges Cytoplasma besitzt, das von

einer echten, sehr wahrscheinlich chitinhaltigen Membran umgeben wird. Der Parasit hätte also pflanzlichen Charakter. Für diese Ansicht läßt sich noch ein letzter, beweiskräftiger Analogieschluß anführen. KLIGMAN und BALDRIDGE haben in Vergleichsuntersuchungen ähnliche Schrumpfungsvorgänge bei *Histoplasma capsulatum* nachweisen können, also bei einem Pilz, der in Paraffinschnitten eine breite Membran (Kapsel) mit optisch leerem Innenraum zeigt und dieser Figuration auch seinen Namen verdankt, im lebensfrischen Zustand aber ein völlig homogenes Cytoplasma besitzt.

Die vorliegenden histotopochemischen Untersuchungen weisen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auf den pflanzlichen Charakter der *Pneumocystis Carinii* hin. Als Pilz darf aber *Pneumocystis Carinii* nach unserer Kenntnis nicht zu den Candidaformen gerechnet werden (BAUCH und LADSTÄTTER). Die rein deskriptive Bezeichnung der *Pneumocystis Carinii* als *Saccharomyces octosporus* (GIESE) scheint nichts zu präjudizieren. Wir stimmen daher der Ansicht von GIESE zu, zumal inzwischen auch CSILLAG und Mitarbeiter die Identität von *Pneumocystis Carinii* und *Saccharomyces* bakteriologisch erwiesen zu haben scheinen.

Zusammenfassung.

1. Die hohe Letalität der sog. interstitiellen plasmacellulären Pneumonie der Säuglinge richtet naturgemäß die volle Aufmerksamkeit der Kliniker und Morphologen auf Frühdiagnose und mögliche Infektionsverhütung. Für den Morphologen steht eine möglichst umfassende Untersuchung des Erregers, der *Pneumocystis Carinii*, im Mittelpunkt. Es ist an Hand histotopochemischer Befunde versucht worden, die systematische Stellung der Pneumocysten besonders im Hinblick auf die Alternative Protozoen oder Hefe festzulegen.

2. Die Pneumocysten lassen sich nach morphologischen Gesichtspunkten nicht bei den Coccidien einordnen. Auch als primitive Haplosporidien fehlen ihnen charakteristische Merkmale, zumal dieser inhomogenen Gruppe fraglicher Protozoen auch Pilze angehören.

3. Die Entwicklung der Pneumocyste erfolgt extracellulär. Intracelluläre Lagerung kommt wahrscheinlich durch Phagocytose zustande. Im Gewebsbild scheint eine reaktive, den Protozoen eigene Epithelproliferation der Wirtszellen zu fehlen. Die relativ seltenen Mehrfachstadien können keine Merozoiten sein, die bei der nachweislich starken intrapulmonalen Vermehrung der Pneumocysten häufiger sein müßten. Die Mehrfachstadien sind sicher keine Mikrogametocyten, da eine sexuelle Differenzierung der Pneumocysten vermißt wird. Es könnte sich nur um Sporen handeln, die unter ungünstigen Lebensbedingungen auftreten.

4. Pneumocysten sind gegenüber Protozoen grampositiv und gegen Autolyse resistent. Morphologisch lassen sich Sprossungsvorgänge nachweisen.

5. Die Auswertung verschiedener Fluoro- und Diachromierungen hat folgende neue Befunde ergeben. a) Die Kerne der Pneumocysten ähneln weitgehend denen der Hefezellen. Während der Interphase läßt sich ein intranucleär gelegenes, wohl einem Zentrosom entsprechendes Gebilde nachweisen, das sich in der Mitose vom Kern trennt und grampositiv wird. Diese Kerndissoziation ist eine partielle. Sie imponiert aber als totale Dissoziation, weil der beide Kernanteile verbindende Plasmastrang färberisch nicht vom übrigen Cytoplasma abgrenzbar ist. b) Die Pneumocysten besitzen eine echte Zellmembran, deren Aufbau der Hefezellmembran entspricht. Sie besteht histochemisch überwiegend aus Kohlenhydraten, nämlich neutralen Mucopolysacchariden, die als Chitin angesprochen werden. Ein verschwindend geringer Anteil stellt saure Mucopolysaccharide dar. c) Dem entspricht ein schwach saurer Umladebereich der Membranen. Die elektrostatisch erfaßbaren Eiweiße der Membran liegen offenbar in den Seitenketten großmolekularer Kohlenhydratkomplexe. d) Die Waben der Pneumocystis Carinii enthalten Glykolipide. Der optisch leer erscheinende Wabeninhalt kommt wie bei *Histoplasma capsulatum* durch Schrumpfung und Entfettung des Cytoplasmas zustande, ist also ein Kunstprodukt. Die verdichteten Glykolipide liegen der Chitinmembran als glänzender Innenring an. Dieser kann auch Kernbestandteile (Ribonucleotide) enthalten die sich nach GRAM anfärben lassen.

6. *Pneumocystis Carinii* gehört nach vergleichenden Untersuchungen nicht zu den Candidapilzen. Er darf als *Saccharomyces* angesprochen werden und ist demnach den *Saccharomycoidae* anzugliedern.

Literatur.

- ARAGAO, H.: Brasil. Med. **271**, 81 (1913). — BAUCH, R., u. L. LADSTÄTTER: Klin. Wschr. **1953**, 900. — BERG, N. O.: A histological study of masked lipids. Acta path. scand. (Københ.) Suppl. **90** (1951). — BETHE, A.: Biol. generalis (Wien) **2**, 537 (1926). — BEUTHE, D.: Zbl. Path. (im Druck). — BRUNS, G.: Zbl. Path. **91**, 168 (1954). — Zbl. Path. (im Druck). — BRUNS, G., u. D. BÖTTGER: Acta histochem. **1**, 25 (1954). — CSILLAG, A., L. BRANDSTEIN, W. FABER u. J. MASCO: Orv. Hetil. (ung.) **47**, 1303 (1953). — DICKMAN, H.: Beitr. path. Anat. **114**, 48 (1954). — DÖFLEIN-REICHENOW: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena 1949. — DRAWERT, H.: Flora (Jena) **34**, 159 (1940). — FEYRTER, F.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **27**, 519 (1931). — FINGERNLAD, A., u. V. VORTEL: Schweiz. Z. Path. u. Bakter. **17**, 201 (1954). — GIESE, W.: Verh. dtsch. path. Ges. **1952**, 284. — Mschr. Kinderheilk. **101**, 147 (1953). — GLEISS, J.: Kinderärztl. Prax. **21**, 89 (1953). — GOMORI, G.: Amer. J. Clin. Path. **22**, 277 (1952). — HALE, C.W.: Nature (Lond.) **157**, 802 (1946). — HAMPERL, H.: Klin. Wschr. **1952**, 820. — HERZBERG, K., HERZBERG-KREMMER u. G. MAY: Klin. Wschr. **1952**, 822. — Arch. exper. vet. Med. **6**, 78 (1953). — HÖFLER, K.: Mikroskopie (Wien) Sonderbd **1**, 46

(1949). — HOTCHKISS, R.D.: Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948). — JIROVEC, O., u. J. VANEK: Zbl. Path. (im Druck). — KLIGMAN, A.M., and G.D. BALDRIDGE: Arch. of Path. **51**, 567 (1951). — KÜSTER, F.W., A. THIEL u. K. FISCHBECK: Logarithmische Rechentafeln. Berlin 1947. — LILLIE, K.D.: Anat. Rec. **53**, 611 (1949). — LINDGREN, C.C.: The yeast cell, its genetics and cytology. Saint Louis 1949. — LINNEWEH, F.: Kinderärztl. Prax. **21**, 89 (1953). — LISON, L., and W. MUTSAARS: Quart. J. Microsc. Sci. **91**, 309 (1950). — LORKE, D.: Klin. Wschr. **1953**, 824. — McMANUS, J.F.A., and J.E. CASON: Arch. of Biochem. a. Biophysics **34**, 293 (1951). — MERLIN, O.: Zit. nach R. MÜLLER. — MICHAELIS, L.: Biochem. Z. **234**, 139 (1931). — MÜLLER, R.: Medizinische Mikrobiologie, S. 82. München-Berlin 1950. — NICOLET, G.M., and L.A. SHINN: J. Amer. Chem. Soc. **61**, 1615 (1939). — J. of Biol. Chem. **142**, 139 (1942). — PEARSE, A.G.E.: J. Clin. Path. **2**, 81 (1949). — PETERSEN, U.: Münch. med. Wschr. **1953**, 1252. — PISCHINGER, A.: Z. Zellforsch. **3**, 169 (1926). — PLIESS, A.: Frankf. Z. Path. **64**, 185 (1953). — RIPPEL-BALDES: Grundriß der Mikrobiologie, S. 83. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952. — ROMEIS, B.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **16**, 525 (1929). — SCHABINSKI, G., u. P. SKOBEL: Persönliche Mitteilung. — SCHUMACHER, J.: Zbl. Bakter. I Orig. **107**, 161 (1928). — SCHUSSNIG, B.: Handbuch der Protophytenkunde, Bd. I. Jena 1953. — SHINN, L.A., and B.H. NICOLET: J. of Biol. Chem. **138**, 91 (1941). — SIMON, H.: Naturwiss. **1953**, 625. — STEVENSON, A.C.: Quart. J. Microsc. Sci. **61**, 187 (1915). — STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949. — VANEK, J.: Čas. lék. česk. **90**, 1121 (1951). — Zbl. Path. **90**, 424 (1953). — VANEK, J., u. O. JIROVEC: Zbl. Bakter. I Orig. **158**, 180 (1952). — VANEK, J. u. J. LUKES: Ann. Pädiatr. **180**, 1 (1953). — WENYON, O.M.: Protozoology, S. 1079. London 1926. — WIAME, J.M.: J. Amer. Chem. Soc. **69**, 3146 (1947). — J. of Biol. Chem. **178**, 14 (1949). — WISLOCKI, G.W., H. BUNTING and E.W. DEMPSEY: Amer. J. Anat. **81**, 1 (1947). — WOLMAN, N.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 583 (1950). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel 1947. — WUNDERLICH, Ch.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1736. — YASUZUMI, G.: Z. Zellforsch. **27**, 267 (1938). — ZEIGER, K.: Z. Zellforsch. **10**, 481 (1930).

Dozent Dr. GÜNTHER BRUNS, Pathologisches Institut der Universität Jena.