

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

## Die Fluorochromierung von *Pneumocystis Carinii*

Von

**W. OPFERKUCH und D. RICKEN**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Dezember 1958)

Wie durch lichtmikroskopische Untersuchungen (VANEK und JIROVEC; JIROVEC und VANEK) und durch elektronenmikroskopische Beobachtungen (WESSEL und RICKEN) gezeigt werden konnte, vermehrt sich *Pneumocystis Carinii* in einem Entwicklungscyclus, der von einer dünnwandigen Cyste mit einem Innenkörperchen und schleierartiger Innensubstanz über die sog. Napf- und Sichelformen (GIESE, PLIESS) zur derbwandigen Cyste mit 8 Cystenkörperchen geht. Nach Platzen der Cystenmembran wachsen letztere wieder zu Cysten mit einem Innenkörperchen heran. Zur farberischen Darstellung des Parasiten eignet sich die von HAMPERL empfohlene PAS-Reaktion. Strukturelle Einzelheiten lassen sich mit der Gram- und mit der Giemsafärbung sowie an Frischpräparaten mit dem Phasenkontrastmikroskop (PLIESS) sichtbar machen. BRUNS und BÖTTGER konnten bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes von *Pneumocystis Carinii* mit den Fluorochromen Berberinsulfat, Neutralrot und Rhodamin B keine elektive Anfärbung des Parasiten erreichen.

Wir versuchten, *Pneumocystis Carinii* mit Hilfe der Fluorochromierung allo- bzw. metachromatisch darzustellen. Dabei gelang uns mit dem Farbstoff Rhodamin B eine elektive Darstellung der verschiedenen Formen von *Pneumocystis Carinii*. Versuche mit Akridinorange, Auramin, Berberinsulfat, Coriphosphin O, Eosin, Euchrysin, Fluorescein-Na, Neutralrot, Primulin, Pyronin, Thioflavin S und Thiazinrot führten dagegen nicht zu brauchbaren Ergebnissen.

### Material und Methode

Als Material verwendeten wir die Organe von Ratten, bei denen durch Resistenzschwächung mit Cortison und gleichzeitiger Behandlung mit Hostamycin eine *Pneumocystispneumonie* erzeugt wurde (RICKEN). Die Tiere wurden auf der Höhe der Erkrankung getötet, ihre Organe sofort in 10%igem Formalin fixiert und Paraffin- und Gefrierschnitte davon angefertigt. Außerdem wurden noch von *Pneumocystis Carinii* befallene Säuglingslungen untersucht.

Wir benutzten eine Fluoreszenzeinrichtung, bestehend aus einem Ortholuxmikroskop (E. Leitz, Wetzlar) mit einer Quecksilberhochstdrucklampe Philips CS 150 als Lichtquelle. Als uv- und blaulichtdurchlässige Filter verwendeten wir an der Lampe Schott BG 12 und als Okularsperrfilter Schott OG 1. Zur Absorption des roten Lichtanteils wurde eine mit einer 10%igen Kupfersulfatlösung gefüllte 10 mm dicke Quarzglasküvette zwischengeschaltet.

Mit dem Farbstoff Rhodamin erzielten wir die besten Ergebnisse bei folgendem Färbevorgang:

1. Entparaffinieren der 5  $\mu$  dicken Schnitte durch Einstellen in Xylol (mindestens 1 Std).
2. Einbringen der Schnitte über die absteigende Alkoholreihe in Aqua dest.
3. Färben 2—5 min in Rhodamin B 1:1000 gelöst in Walpole-Puffer (Pearse) von  $p_H$  0,65.
4. Abtrocknen der Objektträger zwischen 2 Filterpapierstreifen.
5. Einstellen und schwenken der Schnitte in reinem Anilinöl (2—5 min), bis keine Farbwolken mehr abgehen.
6. 1 min in ein Gemisch von Anilin und Xylol 1:3.
7. Einbringen in Xylol und anschließendes Eindecken in das fluoreszenzfreie Einbettungsmittel Eukitt.

Die so behandelten Schnitte behalten ihre Fluoreszenz über Monate unverändert bei.

Die Fluorochromierung von *Pneumocystis Carinii* gelingt auch an Gefrierschnitten. Hier beträgt die Färbezeit  $\frac{1}{2}$ —1 min; anschließend werden die Schnitte in Aqua dest. gebracht, auf Objektträger aufgezogen und wie bei der Färbung von Paraffinschnitten weiterbehandelt.

### Ergebnisse

Die Prüfung der Eigenfluoreszenz unserer Schnittpräparate ergab eine schwache grünliche Fluoreszenz der Membranen und Innenstrukturen von *Pneumocystis Carinii*.

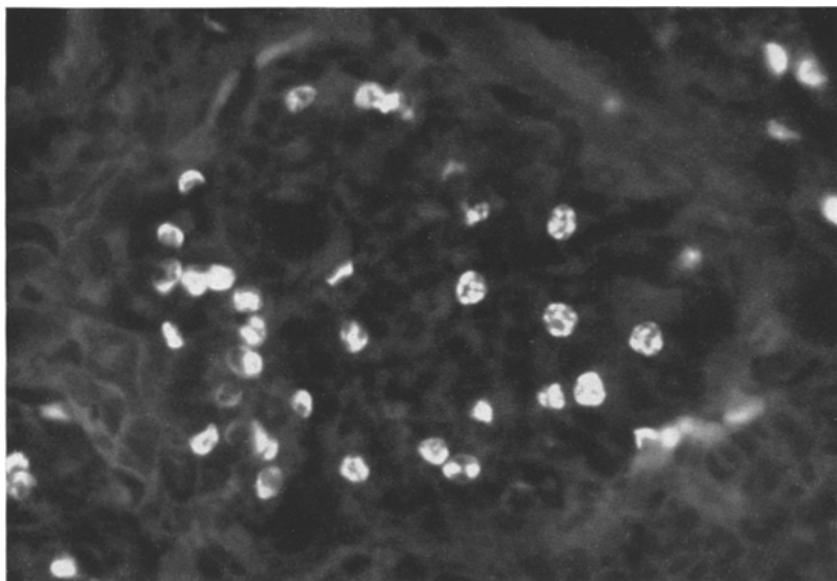


Abb. 1. Rattenpneumocystose. Mit Pneumocystenwaben angefüllte Alveole. Mehrere Cysten mit hell fluoreszierender sichel- und napfförmiger Innensubstanz. Die dünnwandigen Cysten sind als schwach fluoreszierendes Wabenwerk zu erkennen. Rhodamin B 1:1000,  $pH$  0,65. Vergr. 1600  $\times$

Bei der Fluorochromierung der Pneumocysten mit Rhodamin B bei  $pH$  0,65 kam es zu einer Darstellung der Cysten mit einem Innenkörperchen sowie zu einer gleichzeitigen, elektiven Anfärbung der Napf- und Sichelformen und der Cysten mit mehreren Cystenkörperchen. Im einzelnen war folgendes zu sehen (s. Abb. 1 und 2):

Bei den Cysten mit einem Innenkörperchen färben sich die dünnen Cystenmembranen, das unscharf begrenzte Innenkörperchen und eine schleierartige Innensubstanz schwach grünlich. Diese Cysten bilden den Hauptbestandteil des Wabenwerkes. Außerdem sieht man unterschiedlich viele Cysten, die eine dicke, scharf konturierte Membran und eine napf-, sichel- oder netzartige, dichte Innensubstanz besitzen. Sowohl Membran als auch Innensubstanz fluorescieren orangerot. Es handelt sich um die sog. Napf- und Sichelformen von GIESE und PLIESS. Neben der Innensubstanz enthalten manche dieser Cysten 2—3 scharf umgrenzte, etwa  $1 \mu$  große, runde und orangerot fluoreszierende Cystenkörperchen. Weiters erkennt man orangerot fluoreszierende, dickerwandige Cysten mit mehreren Cystenkörperchen, deren Zahl bis 8 ansteigt. Eine strukturelle Unterscheidung in reife und unreife Cystenkörperchen, wie sie

von WESSEL und RICKEN auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen beschrieben wurde, ist nicht möglich, da ihre Eigenstruktur durch die intensive

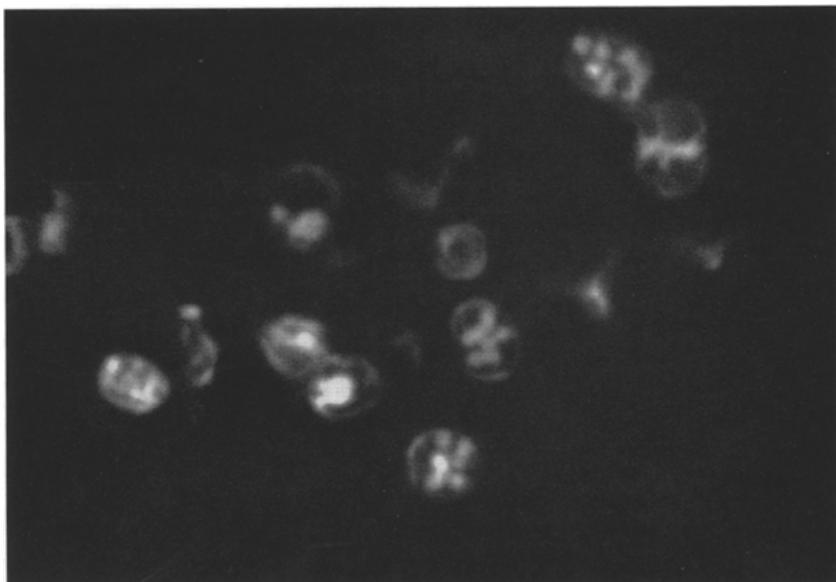


Abb. 2. Rattenpneumocystose. Cysten mit mehreren Cystenkörperchen. Cystenkörperchen mit Cystenmembran hell fluoreszierend. Rhodamin B 1:1000, pH 0,65. Vergr. 3000 ×

Fluoreszenz überstrahlt wird. Man kann jedoch beobachten, daß die Größe der Cystenkörperchen schwankt und mit ihr auch zeitweise die Art ihrer Fluoreszenz.

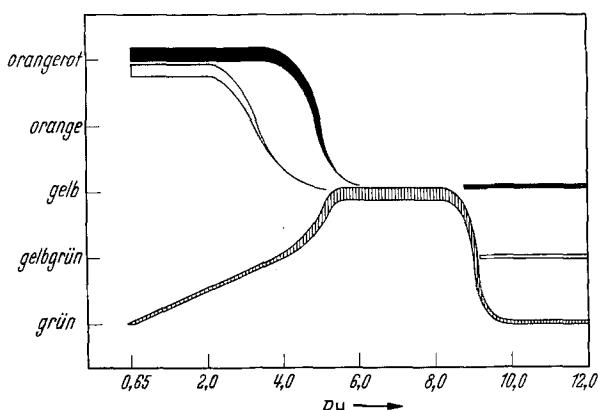


Abb. 3. Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbe und -intensität (Fluoreszenzintensität wird durch die Dicke der Kurven angezeigt) der verschiedenen Pneumocystisstrukturen.

■ Cysten mit mehreren Cystenkörperchen; □ Napf- und Sichelform; ▨ dünnewandige Cysten mit einem Innenkörperchen

pH 3,0. Die dünnewandigen Cysten mit einem Innenkörperchen ändern nun ihre Fluoreszenzfarbe ins Gelb-Grünliche.

pH 4,0 und 5,0. Sämtliche Pneumocystenformen zeigen eine Fluoreszenzänderung von Grün bzw. Orangerot ins Gelbliche.

Sie zeigt manchmal sogar einen gelb-grünlichen Farbton. Dieser Übergang in eine mehr grünliche Fluoreszenz ist gut bei Cystenkörperchen zu sehen, die nach Platzen der Cystenmembran frei zwischen den Cysten liegen.

Bei den anderen von uns untersuchten pH-Werten fanden wir folgendes fluoreszenzoptisches Verhalten, das in Abb. 3 grafisch versinnbildlicht ist:

pH 1,5 und 2,5. Es tritt keine Änderung der Fluoreszenzfarbe auf.

$p_H$  6,0. Die Napf- und Sichelformen sowie die Cysten mit mehreren Cystenkörperchen sind wegen ihrer abgeschwächten Fluorescenz nicht mehr gut zu erkennen.

$p_H$  7,0 und 8,0. Lediglich die Cystenmembranen treten durch ihre intensive Gelbfluorescenz hervor; die Innenstrukturen färben sich nicht mehr an.

$p_H$  9,0 bis 12,5. Die derbwandigen Cysten erscheinen bei guter Differenzierung ihrer Strukturen jetzt wieder in gelber Farbe. Die Napf- und Sichelformen sind wegen ihrer schwachen gelbgrünen Fluorescenz nur undeutlich zu erkennen. Hingegen färben sich die Cysten mit einem Innenkörperchen leuchtend grün an.

In den teilweise schwach, teilweise mittelgradig durch eine zellige Infiltration verbreiterten Alveolarsepten und ihren Lymph- und Blutgefäßen waren Pneumocysten nicht festzustellen. Auch in den von uns untersuchten Organen Gehirn, Herz, Leber, Milz, Nebenniere, Niere, Pankreas und tracheobronchiale Lymphknoten konnten wir keine Formen von *Pneumocystis Carinii* finden.

Besonders in den pneumocystenarmen sowie in den Randabschnitten der stärker mit Pneumocysten befallenen Lungengebiete sieht man reichlich polygonale oder abgerundete Zellen mit einem relativ großen Kern. Diese Zellen sind insofern von Interesse, als sie ein teils feinkörniges, teils schaumiges und großvakuoläres Cytoplasma besitzen, das besonders beim Zerfall dieser Zellen eine gewisse Ähnlichkeit mit Pneumocystisstrukturen aufweist. Sie unterscheiden sich aber von letzteren dadurch, daß ihr Cytoplasma in allen  $p_H$ -Bereichen grün fluoresciert.

Bei den vergleichenden fluorescenzmikroskopischen Untersuchungen von Säuglingslungen mit *Pneumocystispneumonie* erhielten wir analoge Ergebnisse. Unterschiede bestanden lediglich darin, daß in den Rattenlungen Napf- und Sichelformen und Cysten mit mehreren Cystenkörperchen zahlreicher auftraten.

### Diskussion

Der Vorteil der Fluorochromierung von *Pneumocystis Carinii* mit dem Farbstoff Rhodamin B ist darin zu sehen, daß bei günstig gewähltem  $p_H$ -Bereich die verschiedenen Formen bzw. Entwicklungsstadien des Erregers gleichzeitig beobachtet werden können und elektiv dargestellt sind. Es bereitet so keine Schwierigkeiten, die verschiedenen Formen zu dem eingangs erwähnten Entwicklungszyklus aneinanderzureihen.

Eine elektive Darstellung der Pneumocysten gelang mit dem Farbstoff *Rhodamin B* nur, wenn mit Anilinöl entwässert und differenziert wurde. Bei dem Fluorochrom Rhodamin B handelt es sich um einen Xanthenfarbstoff, der vornehmlich elektroneutral ist und molekular vorliegt. Lediglich in stark saurer Lösung zeigt er eine geringe Dissoziationsneigung und besitzt dann schwach basische Eigenschaften (STRUGGER). Wegen seines elektroneutralen Verhaltens besitzt Rhodamin B (Zusammenstellung der Literatur bei HARMS) eine starke Lipoidlöslichkeit, doch ist es sicher in der Lage, auch andere chemische Strukturen anzufärben. Entfernt man nun in Anlehnung an das Verfahren von SCHÜMMELFEDER, KROGH und EBSCHNER den nicht salzartig gebundenen Farbstoff durch Einstellen in 99%igen Äthanol oder Isopropylalkohol, um den in Xylol aufgehellten und in Eukitt eingedeckten Schnitt anschließend zu untersuchen, so sieht man, daß der Farbstoff aus allen Gewebsanteilen, einschließlich der Pneumocysten, bis auf einen allgemein verbleibenden Grünton eluiert wurde. Ein gleiches Ergebnis erzielt man auch bei der Acetondifferenzierung. Bei der Darstellung der Pneumocysten mit Rhodamin B und anschließender Anilin-

differenzierung dürfte somit die Bindung des Farbstoffes an die Gewebsstrukturen nur eine sehr lockere sein. Die Löslichkeit des Farbstoffes in Anilin ist aber nicht groß genug, um das an die *Pneumocystis*-strukturen gebundene Rhodamin B aus dieser Bindung zu verdrängen. Warum man gerade bzw. nur mit Rhodamin B eine elektive Fluorochromierung von *Pneumocystis Carinii* erreichen kann, bleibt unklar, da weder die chemische Zusammensetzung der *Pneumocystis*-strukturen noch der Bindungsmechanismus dieses Farbstoffes bekannt sind.

Unsere Befunde unterscheiden sich von den Ergebnissen von BRUNS und BÖTTGER insofern, als wir die besten Resultate bei einem  $p_H$  von 0,65—3,0 erzielen konnten. BRUNS und BÖTTGER hingegen geben an, daß eine schwache Fluorochromierung der Cystenkörperchen erst ab einem  $p_H$  von 3,6 auftritt.

Mit den anderen verwendeten Farbstoffen war es uns in keinem Falle möglich, eine elektive Anfärbung der *Pneumocystis*-strukturen zu erreichen.

Die gleiche Art der Fluorochromierung und die strukturelle Übereinstimmung der bei der *Pneumocystispneumonie* des Säuglings gefundenen und der in den Lungen unserer Ratten auftretenden Cystenformen macht es wahrscheinlich, daß es sich in beiden Fällen um den gleichen Erreger handelt.

### Zusammenfassung

Eine elektive Anfärbung der verschiedenen Formen von *Pneumocystis Carinii* wurde mit Rhodamin B erreicht. Die Färbung kann sowohl an Gefrier- als auch an Paraffinschnitten durchgeführt werden. Zwischen den in den Lungen von resistanzgeschwächten Versuchsratten auftretenden *Pneumocysten* und den *Pneumocysten* der Säuglingspneumocystose konnten keine Unterschiede festgestellt werden. *Pneumocystis Carinii* konnte nur in den Lungen der Versuchstiere, jedoch nicht in ihren anderen Organen gefunden werden.

### Summary

The different forms of *pneumocystis Carinii* were selectively stained with Rhodamin B. Both frozen and paraffin sections were used to equal advantage. No differences could be demonstrated between the *pneumocystis* organisms that appear in the lungs of experimental rats with impaired resistance, and those organisms of infantile pneumocystosis. The *pneumocystis Carinii* were found only in the lungs of the rats, not in the other organs.

### Literatur

Siehe PLIESS, G.: Das mikroskopische Verhalten von Alveolarzellen und von *Pneumocystis Carinii* bei der interstitiellen, plasmacellulären Säuglingspneumonie. Frankfurt. Z. Path. 68, 153 (1957).

Außerdem: HARMS, H.: Handbuch der Farbstoffe für Mikroskopie. Hannover: Staufen-Verlag 1958. — PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London: Churchill 1953. — RICKEN, D.: Histologische Untersuchungen bei experimenteller *Pneumocystis*-Pneumonie. Virchows Arch. path. Anat. 331, 713 (1958). — SCHÜMMELFEDER, N., R. E. KROGH u. K. J. EBSCHNER: Färbungsanalysen zur Akrinorange-Fluorochromierung. Histochem. 1, 1 (1958). — STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover: M. u. H. Schaper 1949. — Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949. — WESSEL, W., u. D. RICKEN: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *Pneumocystis Carinii*. Virchows Arch. path. Anat. 331, 545 (1958).

Dr. med. WOLFGANG OPPERKUCH,  
Pathologisches Institut der Universität, Bonn-Venusberg