

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

Zur Histochemie der Pneumocystis Carinii

Von
W. OPFERKUCH

Mit 4 Textabbildungen in 7 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 27. Mai 1959)

Die Morphologie der bei Säuglingen vorkommenden Pneumocystosen (interstielle, plasmacelluläre Pneumonie) ist ebenso wie die experimentell bei Ratten zu erzeugende, vergleichbare Lungenerkrankung gut untersucht. Auch die bei dieser Erkrankung in den Lungen feststellbare Pneumocystis Carinii ist sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch in ihren morphologischen Eigenheiten genau durchforscht (PLESS, WESSEL und RICKEN). Die Histochemie des Parasiten ist aber weniger bekannt. Wir haben daher systematische histochemische Untersuchungen angestellt, über die im folgenden berichtet werden soll.

Material und Methode

Als Material benutzten wir in Formalin bzw. Alkohol fixierte Lungen von Ratten, die nach Cortison- und Hostamycinapplikation an einer Pneumocystose erkrankt waren. Außerdem stand uns in Formalin bzw. Alkohol fixiertes Lungengewebe einer 3 Monate alten Frühgeburt, die an einer Pneumocystispneumonie verstorben war (S. 676/58), zur Verfügung.

Methodische Angaben über die in den Tabellen angeführten Färbungen entnehmen wir dem Abschnitt Histochemie von GEDIGK aus dem Biochemischen Taschenbuch von RAUEN und den Angaben von PEARSE.

Ergebnisse

Bei der Beschreibung unserer Befunde wollen wir uns in Anlehnung an die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von WESSEL und RICKEN an deren Nomenklatur halten. Diese reihten wie schon JIROVEC und VANEK die verschiedenen Cystenformen zu einem Entwicklungszyklus aneinander. Dabei unterschieden sie folgende Formen: Aus einer dünnwandigen Cyste mit einem Innenkörperchen und einer wenig dichten, inhomogenen Innensubstanz entstehen die sog. Napf- und Sichelformen, die eine dickere Membran besitzen. Durch Ein- und Abschnüren ihrer Innensubstanz entstehen bis zu 8 Cystenkörperchen. Diese nehmen an Größe und Dichte zu und lassen dann an einem Pol ein Verdichtungs-zentrum erkennen. Nach Platzen der Cystenmembran gelangen sie in Freiheit und werden wieder zu dünnwandigen Cysten mit einem Innenkörperchen. Die Cysten selbst liegen in den Alveolen in einer teils homogenen, teils leicht gekörnten Masse, die wir bei der Besprechung unserer Befunde kurz als Zwischensubstanz bezeichnen wollen.

Da die Untersuchung der Rattenpneumocysten und der menschlichen Säuglinge so gut wie vollkommen identische Befunde ergab, können wir im folgenden auf eine getrennte Darstellung verzichten.

1. Kohlenhydrate. HAMPERL empfahl zur färberischen Darstellung des Parasiten die PAS-Reaktion und wies darauf hin, daß diese durch vorherige Diastasebehandlung der Schnitte nicht beeinflußbar ist. Metachromatische Substanzen glaubten BRUNS und BÖTTGER (1) mit einer Toluidinblaufärbung, die mit Essigsäure differenziert wurde, nachweisen zu können. BAAE hingegen fand keine echte Metachromasie. Ebenso konnte BAAE im Gegensatz zu BRUNS und BÖTTGER (2) keine Eisenbindungsfähigkeit feststellen. BRUNS und BÖTTGER (2) gaben ferner an, daß die PAS-Reaktion nach Acetylierung der Schnitte negativ verlief. BAAE wies schließlich noch darauf hin, daß sich die Schnitte bei bloßem Einbringen in Schiff-sches Reagens schon leicht anfärben.

Tabelle I

Färbung	Membran	Innenkörperchen	Cystenkörperchen	Zwischensubstanz
PAS-Reaktion	+++	+	+	++
Basophilie ab p_H	4,75	3,52	3,2	3,8
Basophilie nach Ribonuklease ab p_H .	5,03	5,03	4,89	5,03
IEP mit Acridinorange	4,8	3,5	3,0	4,0
Metachromasie mit Toluidinblau . . .	0	0	0	(+)
Metachromasie mit Thionin nach FEYRTER	0	0	0	++
Hale-Reaktion	0	0	0	(+)
Bestsche Carminfärbung	0	0	0	+
Bestsche Carminfärbung nach Diastase.	0	0	0	0
PAS nach Diastase	+++	+	+	++
PAS nach Acetylierung	0	0	0	0
PAS nach Verseifung	+++	+	+	++
Perameisensäure-Schiff-Reaktion . . .	0	0	0	+
Perameisensäure-Schiff nach Bromie- rung	0	0	0	0
PAS nach Pektinase	+++	+	+	++

+++ stark positiv, ++ positiv, + schwach positiv, (+) ganz schwach positiv, ± nicht sicher positiv, 0 negativ.

Die positive PAS-Reaktion der Membran, der schleierartigen Innensubstanz und auch der Innen- und Cystenkörperchen — bei letzteren ist sie nur schwach — weist eine kohlenhydrathaltige Komponente in diesen Anteilen von *Pneumocystis Carinii* nach. Sehr deutlich reagiert auch die Zwischensubstanz. Die in den größeren Bronchien gelegenen Cysten verlieren teilweise die positive PAS-Reaktion der Membranen.

Um die chemische Struktur dieses Kohlenhydratanteils der Pneumocysten näher zu definieren, bestimmten wir zunächst den IEP mit Methylenblau und zur Bestätigung dieser Befunde mit Acridinorange (SCHÜMMELFEDER und STOCK). Dabei konnte der Umladebereich im Gegensatz zu BRUNS und BÖTTGER (2) folgendermaßen festgelegt werden: Die Membranen färben sich ab einem p_H von 4,75, die Innenkörperchen ab p_H 3,52, die Cystenkörperchen ab p_H 3,2 und die Zwischensubstanz ab einem p_H -Wert um 3,8. Diese saure Reaktion der Innen- und Cystenkörperchen sowie der Zwischensubstanz ist wohl auf eine Ribonucleinsäurekomponente zurückzuführen. Behandelt man nämlich die Schnitte vorher

4 Std mit Ribonuklease, so verschiebt sich die Bindungsfähigkeit für das Methylenblau nach dem alkalischen Bereich hin, und zwar ziemlich gleichmäßig für alle Strukturen ab einem p_H um 5,0.

Eine Metachromasie mit Toluidinblau, die ja hauptsächlich durch saure Mucopolysaccharide bedingt sein müßte, haben wir an den Pneumocysten im Gegensatz zu BRUNS und BÖTTGER (2) nicht finden können. Bei der Thionin-Einschlußfärbung nach FEYTER stellt sich besonders schön die Zwischensubstanz dar, die hier eine ausgeprägte Metachromasie erkennen läßt. Die

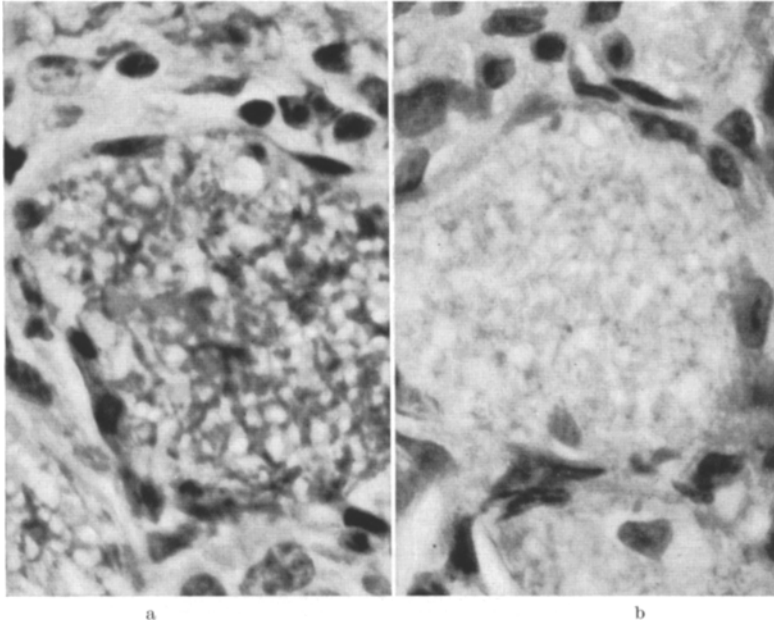


Abb. 1. a PAS-Reaktion. Die Cystennmembranen erscheinen intensiv rot. 1200 \times . b PAS-Reaktion nach Acetylierung. Das Wabenwerk reagiert nicht mehr mit dem Schiffschens Reagens. 1200 \times

Pneumocysten selbst weisen aber auch bei dieser Färbung keine Metachromasie auf.

Die Prüfung der Bindungsfähigkeit von dialysierbarem Eisen an die Schwefelsäure- und Carboxylgruppen der sauren Mucopolysaccharide mit der Methode nach HALE ergibt keine Reaktion mit den Pneumocysten. Lediglich die Zwischensubstanz ist stellenweise positiv.

Glykogen ist mit der Bestschen Carminfärbung in der Zwischensubstanz in den Rattenlungen nachzuweisen; die Pneumocysten selbst sind frei von Glykogen. In der Säuglingslunge ist dagegen auch die Zwischensubstanz glykogenfrei. Die Spezifität der Bestschen Färbung wurde durch Kontrollen mit diastasebehandelten Schnitten gesichert. Ein durchaus entsprechender Befund läßt sich auch bei der PAS-Färbung nach Diastasebehandlung erheben.

Werden die reaktionsfähigen Hydroxyl- und Aminogruppen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid für die Oxydation blockiert, so lassen die Schnitte keinerlei Reaktion mit dem Schiffschens Reagens erkennen (s. Abb. 1). Werden dann die eingeführten Acetylgruppen durch schwaches Alkali wieder abgetrennt.

was aber nur an den Hydroxylgruppen gelingt, so zeigen die Strukturen die gleiche intensive PAS-Reaktion wie vor der Acetylierung. Dieser Befund spricht dafür, daß die PAS-Färbung in diesem Falle nicht an reaktionsfähige Amino-
gruppen gebunden ist.

Ungesättigte Carbonsäuren können durch Oxydation der Äthylengruppen zu Aldehyden mit Hilfe der Perameisensäure an Pneumocysten nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Zwischensubstanz färbt sich leicht an. Wird Brom an derartige ungesättigte Kohlenstoffatome angelagert, so sind diese durch die Perameisensäure nicht mehr angreifbar, und die Leukofuchsinreaktion verläuft dann negativ. Dementsprechend ergibt sich auch an der Zwischensubstanz ein negativer Ausfall der Perameisensäure-Schiff-Reaktion.

Eine Vorbehandlung der Schnitte mit Pektinase führt zu keiner Abschwächung der nachfolgenden PAS-Reaktion. Pektine als Bausteine von *Pneumocystis Carinii* können also ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß saure Mucopolysaccharide am Aufbau der Pneumocysten nicht beteiligt sind, ebenso wenig wie Glykogen. Das Vorhandensein von Glykolipiden ist wenig wahrscheinlich. Wir glauben daher, die PAS-positiven Substanzen als neutrale Glyko- bzw. Mucoproteide ansprechen zu dürfen.

2. Nucleinsäuren. SANDRITTER (2) konnte in den Pneumocysten durch Messung der UV-Absorption bei 265 und 280 m μ einen Nucleinsäureeiweißkomplex nachweisen. BAAR beobachtete eine Verschiebung des IEP nach der alkalischen Seite hin nach Behandlung der Schnitte mit Ribonuclease. Eine positive Feulgenreaktion fanden PLIESS, BRUNS (1) sowie JIROVEC und VANEK. HERZBERG, HERZBERG-KREMMER und MAY berichten von „feinsten feulgenpositiven Punkten in den Waben, nicht aber in den Teilparasiten der großen Cysten“. Gegenteilige Befunde erzielten HAMPERL und KÄHLER.

Tabelle 2

Färbung	Membran	Innen- körperchen	Cysten- körperchen	Zwischen- substanz
Gallocyanin-Chromalaun	0	++	++	0
Gallocyanin nach Ribonuklease	0	(+)	+	0
Methylgrün-Pyronin	\pm	(+)	++	0
Methylgrün-Pyronin nach Ribonuklease	\pm	(+)	+	0
Feulgen	0	(+)	(+)	0
Schiffsches Reagens	(+)	(+)	+	0

Die sowohl Ribo- als auch Desoxyribonucleinsäure darstellende Gallocyanin-Chromalaunfärbung [EINARSON, SANDRITTER (1)] führt zu einer deutlichen Blaufärbung der Innen- und Cystenkörperchen. Vor allem bei den größeren Cystenkörperchen ist die Färbung an einem Pol etwas kräftiger. Die Innensubstanz der Napfformen zeigt nur eine schwache Anfärbbarkeit. Die Cystenmembranen sind völlig ungefärbt, in der Zwischensubstanz dagegen sieht man vereinzelt gefärbte Körnchen liegen. Behandelt man die Schnitte vorher 8 Std mit Ribonuclease, so ist die Färbung der Innen- und Cystenkörperchen nicht mehr so intensiv. Dafür treten sie ebenso wie die Verdichtungszentren deutlicher hervor, da sich nun die Zwischensubstanz nicht mehr anfärbt. Eine Anfärbung der Napfformen ist nicht mehr zu erkennen (s. Abb. 2).

Bei der Methylgrün-Pyroninfärbung in der Modifikation nach KURNICK zeigt das ganze Wabenwerk eine leichte Reaktion mit dem Pyronin. Diese Färbung ändert sich nach 8stündiger Ribonukleasebehandlung nicht, so daß sie wohl nicht als positiver Nachweis von Ribonucleinsäure angesehen werden kann, sondern als unspezifisch zu deuten ist. Das gleiche gilt auch für die Innen- und Cystenkörperchen. Methylgrün, mit dem die Desoxyribonucleinsäuren angefärbt werden, läßt bei den reifen Cystenkörperchen eine leichte Reaktion erkennen.

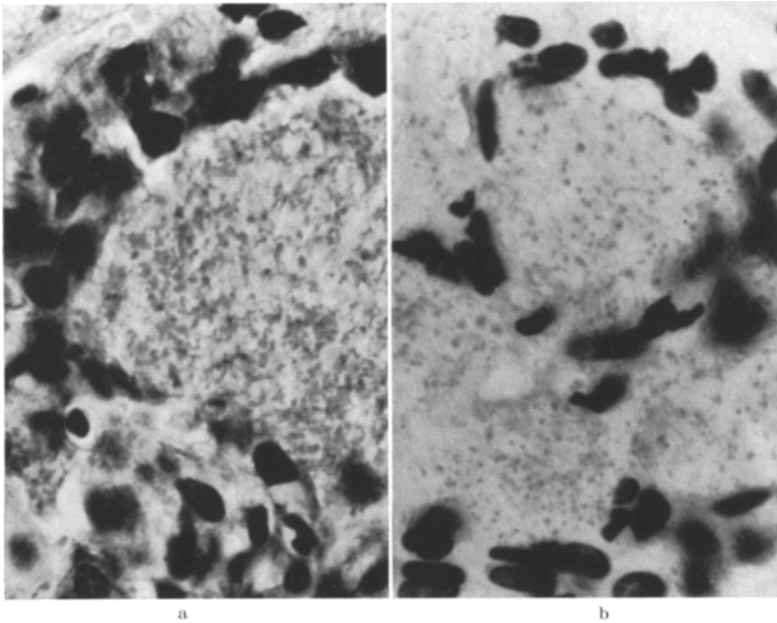


Abb. 2. a Gallocyanin-Chromalaufärbung. Die Napfformen, die Innen- und Cystenkörperchen, sowie Anteile der Zwischensubstanz sind positiv. 1200 \times . b Gallocyanin-Chromalaufärbung nach 8stündiger Ribonukleasebehandlung. Die Verdichtungszentren der Cystenkörperchen zeigen noch eine deutliche Anfärbung. 1200 \times

Die Feulgenfärbung zeigt, jedoch nur bei kürzeren Hydrolysezeiten, eine ganz schwache Anfärbung der Innen- und Cystenkörperchen. Lediglich die Verdichtungszentren sind hin und wieder stärker angefärbt. Ob auch die Napfformen positiv sind, ist bei der blassen Anfärbung nicht zu entscheiden. Bringt man die Schnitte ohne Hydrolyse in das Schiffsche Reagens, so färben sich die Membranen ganz schwach, die Innenkörperchen etwas stärker und die Cystenkörperchen deutlich an. Die Intensität ist annähernd gleich wie nach Hydrolyse bzw. bei der Feulgenfärbung. Diese ist also offenbar auf freie reaktionsfähige Carboxylgruppen zurückzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß durch den positiven Ausfall der Gallocyanin-Chromalaufärbung die Anwesenheit von Nucleinsäuren nachgewiesen wird, und zwar hauptsächlich von Ribonucleinsäuren, wie die starke Abschwächung der Reaktion nach Ribonukleasebehandlung zeigt. Ob die dabei noch vorhandene Anfärbung der Verdichtungszentren auf Desoxyribonucleinsäuren zurückzuführen ist oder nur durch eine zu schwache Ribonukleasebehandlung bedingt ist, ist nicht zu entscheiden. Auch der schwach positive

Ausfall der Feulgenreaktion läßt unserer Meinung nach keine sicheren Schlüsse auf das Vorhandensein von Desoxyribonucleinsäuren zu, da derselbe Färbefeffekt ja schon ohne Hydrolyse eintritt. Andererseits genügen aber die Befunde nicht, um die Anwesenheit von Desoxyribonucleinsäuren sicher ausschließen zu können. Bei dieser Sachlage können die verschiedenen Angaben in der Literatur (s. oben) nicht wunder nehmen.

3. Eiweiß. BAAR und BRUNS (2) fanden eine positive Tetrazoniumreaktion. BAAR gab weiter an, daß nach Benzoylierung die Reaktion nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Er führte dies auf das Vorhandensein von Nuclearchromatin zurück, das gegen die Benzoylierung sehr widerstandsfähig sein soll.

Tabelle 3

Färbung	Membran	Innenkörperchen	Cystenkörperchen	Zwischensubstanz
Tetrazonium-Reaktion	+++	+++	+++	++
Tetrazonium-Reaktion nach Benzoylierung	0	0	0	0
Alloxan-Schiff	(+)	0	0	0
Ninhydrin-Schiff	++	(+)	(+)	0
Fastgreen	+++	+	+	±
Chèvremont-Frédéric	(+)	0	0	0
Barnett-Seligman	(+)	0	0	0
Barnett-Seligman nach Thioglykolsäure	+	0	0	0

Der Nachweis von Tyrosin, Tryptophan und Histidin mit der Tetrazoniumreaktion fällt an Cystenmembran, Innen- und Cystenkörperchen und an der Zwischensubstanz stark positiv aus. Selbst bei verschiedenen Benzoylierungszeiten ist jedoch die Tetrazoniumreaktion vollständig blockiert, was die Pneumocysten anlangt (s. Abb. 3). Wir können also darin die Befunde BAARS nicht bestätigen. Aminogruppen können in gleicher Weise, sowohl mit der Alloxan- und Ninhydrin-Schiff-Reaktion und mit der Fastgreen-Färbung vor allem in der Membran, aber nur in geringem Umfang in den Innen- und Cystenkörperchen nachgewiesen werden. Bei der Fastgreen-Färbung sind außerdem die Cysten mit einer ganz schwach positiven, also eiweißhaltigen, Innensubstanz ausgefüllt.

Disulfid und Sulfhydrylgruppen können mit der Reaktion von CHÈVREMONT und FRÉDÉRIC in den Membranen und der Zwischensubstanz nachgewiesen werden. In den Cysten färbt sich die Innensubstanz ganz leicht an. Diese Befunde bestätigen sich mit der Barnett-Seligman-Färbung bei vorheriger Behandlung der Schnitte mit Thioglykolsäure.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in allen Strukturen der Pneumocysten Eiweißanteile nachzuweisen sind, in den Membranen außer den cyclischen Aminosäuren noch Disulfid und Sulfhydrylgruppen.

4. Lipide. BRUNS und BÖTTGER (2) wiesen mit einer positiven Coffein-Benzpyren-Fluorochromierung maskierte Lipide an Pneumocystis Carinii nach. Sie fanden eine schwach positive Färbung mit Sudan III und Nilblausulfat.

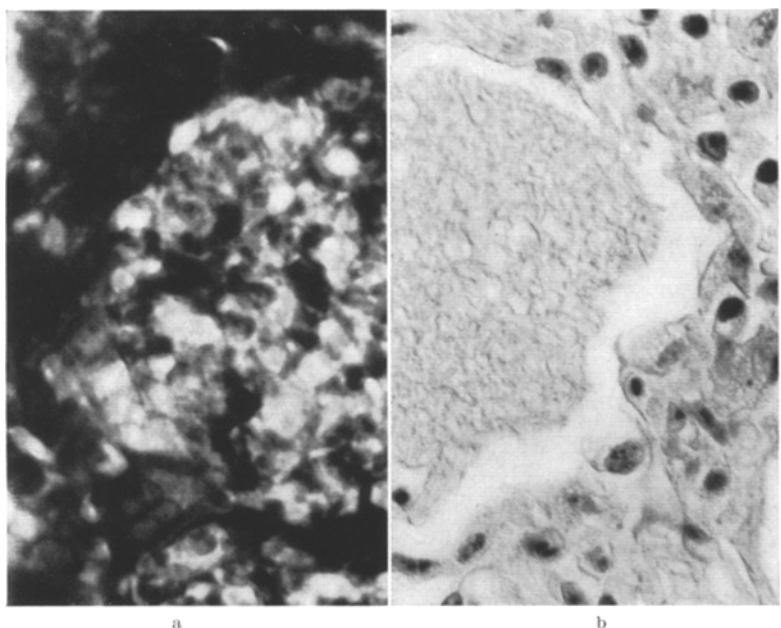


Abb. 3. a Tetrazonium-Reaktion. Alle Strukturen der Pneumocysten sowie die Zwischensubstanz sind positiv. 1200 \times . b Tetrazonium-Reaktion nach 16stündiger Benzoylierung. Nur mehr die Kerne der Zellen des Alveolarseptums sind positiv. 1200 \times

Tabelle 4

Färbung	Membran	Innenkörperchen	Cystenkörperchen	Zwischensubstanz
Sudan	0	0	0	+
Sudanschwarz	\pm	0	0	++
Luxol fast blue	0	0	0	++
Feulgensche Plasmalreaktion	0	0	0	(+)
Ölrot 0	0	0	0	+
Nilblausuflut	0	0	0	+
Perameisensäure-Schiff-Reaktion . . .	0	0	0	+
Thioninfärbung nach FEYRTER	0	0	0	++
Coffein-Benzpyren-Fluorochromierung .	0	0	0	+

Bei der Sudanfärbung sind nur in der Zwischensubstanz vereinzelt kleine Fetttröpfchen zu sehen. Sowohl an Gefrier- als auch an Paraffinschnitten lassen sich mit der Sudanschwarzfärbung eine Blaufärbung der Zwischensubstanz und eine fragliche der Cystenmembranen erkennen. Alle übrigen Lipidfärbungen bestätigen diese Befunde. Mit der Coffein-Benzpyrenmethode konnte im Gegensatz zu BRUNS und BÖTTGER (2) eine Anfärbung der Pneumocysten nicht erreicht werden.

Es kann also gesagt werden, daß lediglich in der Zwischensubstanz Lipide mit Sicherheit nachzuweisen sind.

Diskussion

Überblickt man die Ergebnisse, so kann man die chemische Struktur von *Pneumocystis Carinii* etwa folgendermaßen definieren: Die Membran besteht aus neutralen Glyko- bzw. Mucoproteiden, wobei die Eiweißkomponente außer den cyclischen Aminogruppen noch Disulfid- und Sulfhydrylgruppen enthält. Die Innenkörperchen setzen sich aus neutralen Mucoproteiden zusammen; daneben enthalten sie aber auch geringe Mengen Ribonucleinsäure. Das gleiche gilt für die Napfformen und Cystenkörperchen. Hier ist allerdings der Ribonucleinsäuregehalt größer. Ob in den Verdichtungscentren der Cystenkörperchen daneben noch Desoxyribonucleinsäuren vorkommen, konnte weder sicher nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

Die Napfformen und die Cystenkörperchen sind bei Anilindifferenzierung grampositiv; ein ähnliches Verhalten zeigen sie auch bei der Rhodamin B-Fluorochromierung (OPFERKUCH und RICKEN). Ein chemisches Substrat für dieses Verhalten kann nicht angegeben werden, wie ja überhaupt die Chemie der Gram-Färbung noch sehr umstritten ist. Die Erklärung dieses Verhaltens wird keineswegs dadurch erleichtert, daß diese Formen nur bei Anilindifferenzierung den Gram-Farbstoff binden können. Eine von PEARSE für manche Strukturen angegebene Parallelität zwischen nach Anilindifferenzierung grampositiven Substanzen und positivem Ausfall der Tetrazoniumreaktion nach 16stündiger Benzoylierung konnte hier nicht beobachtet werden.

Tabelle 5

	Nachgewiesene Substanzen	Zur Darstellung geeignete Färbungen
Dünnwandige Membranen	Mucoproteide +++ Lipoproteide ±	PAS-Reaktion +++
Dickwandige Membranen	Mucoproteide +++ Lipoproteide ±	PAS-Reaktion +++ Levatidi +++ Gridley +++ Rhodamin B +
Innenkörperchen	Mucoproteide + Ribonucleinsäure ++	Gallocyanin ++ Giemsa ++ PAS-Reaktion +
Napfformen	Mucoproteide + Ribonucleinsäure ++	Gram +++ Rhodamin B +++ Gallocyanin ++
Cystenkörperchen	Mucoproteide + Ribonucleinsäure +++ Desoxyribonucleinsäure + ?	Gallocyanin +++ Gram +++ Giemsa +++ Rhodamin B ++

Im Hinblick auf die chemischen Strukturelemente der einzelnen Formen des Parasiten muß man die von HAMPERL empfohlene PAS-Reaktion als die beste Nachweismethode für *Pneumocystis Carinii* bezeichnen. Sie allein erfaßt Strukturen in allen Cystenformen (s. Tabelle 5). Außerdem hat sie noch den Vorzug, daß sie die Parasiten in einer vom übrigen Gewebe deutlich verschiedenen Farbe erscheinen läßt. Strukturelle Einzelheiten kann man dagegen mit dieser Färbung nicht gut darstellen. Die Silberimprägnation nach LEVADITI, die Gram- und die

Giemsa-Färbung zeigen wohl sehr schön gewisse Formen von *Pneumocystis Carinii*, aber gerade die viel häufigeren dünnwandigen Cysten mit einem Innenkörperchen werden dabei nicht erfaßt. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, enthalten die durch die PAS-Reaktion nicht erfaßten Strukturen — Napfformen, Innen- und Cystenkörperchen — reichlich Nucleinsäuren. Wir benutzten deshalb Gallo-cyanin-Chromalaun an Stelle von Coelestinblau und Mayers-Hämalaun als Gegenfärbung (Methodik: Schnitte von 70%igem Alkohol 10 min in Perjodsäure, 70%igem Alkohol, 1 min reduzierende Flüssigkeit, 70%igem Alkohol, 15 min Schiffssches

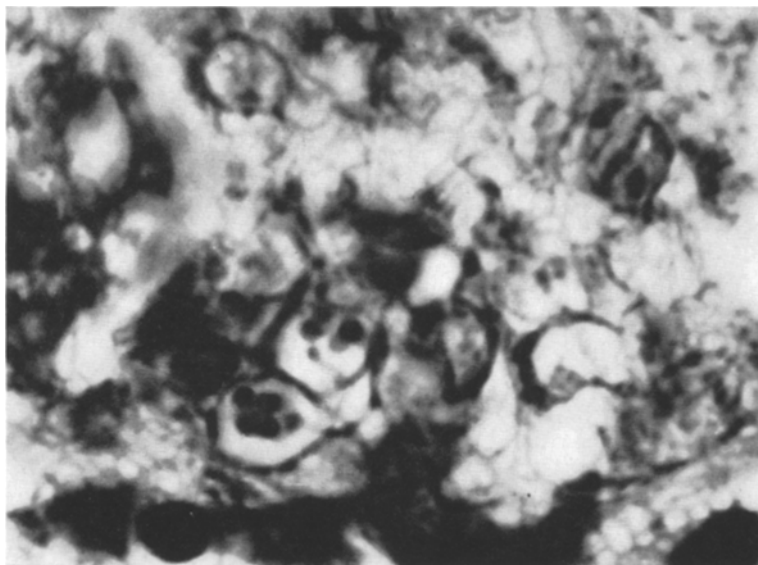


Abb. 4. PAS-Reaktion mit Gallo-cyanin-Chromalaungegenfärbung. Die Membranen sind intensiv rot, die Innen- und Cystenkörperchen tief blau. Ca. 3400 \times

Reagens, 20 min wässern, 6—10 Std Gallo-cyanin-Chromalaun, in Wasser abspülen, aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, in Eukitt eindecken). Die Cystenmembranen erscheinen bei dieser Färbung intensiv rot, die Innen- und Cystenkörperchen dagegen blau (s. Abb. 4). Es handelt sich hiermit um eine Färbung, bei der alle strukturellen Einzelheiten des Parasiten zur Darstellung kommen.

Die Anzahl der vorhandenen mehrkernigen Cysten möchten wir, wie ja schon JIROVEC und VANEK, auf die Reaktionslage des betreffenden Organismus zurückführen: So kann man bei Ratten, die mit hohen Cortisondosen stark geschwächt wurden, viele dieser Formen finden; in Säuglingslungen kommen sie dagegen viel seltener vor.

Zusammenfassung

Pneumocystis Carinii enthält vorwiegend neutrale Mucoproteide. Daneben kommen in den Innen- und vor allem in den Cystenkörperchen noch Nucleinsäuren vor. Lipide waren nur in der Zwischensubstanz sicher nachzuweisen. Es besteht eine völlige Übereinstimmung der Befunde bei Pneumocysten in Säuglings- und Rattenlungen. Als neue Methode zur Darstellung des Parasiten wird eine PAS-Reaktion mit Gallo-cyanin-Chromalaun-Gegenfärbung angegeben.

Summary

The *Pneumocystis carinii* chiefly contains neutral mucoproteins. Nucleic acids are present as well, being found in the inclusion-bodies, and above all in the cysts. Lipids are definitely demonstrable only in the intervening substance. A complete similarity exists between the findings of pneumocytes in the infant lung, and in the rat lung. A new method for demonstrating the parasites is a PAS-reaction with gallocyanin-chromalaun counter stain.

Literatur

BAAR, H. S.: Interstitial, plasmacellular pneumonia due to *Pneumocystis Carinii*. *J. clin. Path.* **8**, 19 (1955). — BRUNS, G.: (1) Zur Morphologie der *Pneumocystis Carinii*. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **91**, 168 (1954). — (2) Die Membranhülle der *Pneumocystis Carinii*. *Naturwiss.* **42**, 610 (1955). — BRUNS, G., u. D. BÖTTGER: (1) Die Toluidinblaufärbung der *Pneumocystis Carinii*. *Acta histochem. (Jena)* **1**, 25 (1954). — (2) Ein Beitrag zur Histotopochemie der *Pneumocystis Carinii*. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 278 (1955). — EINARSON, L.: On the theory of gallocyanin-chromalaunstaining and its application for quantitative estimation of basophila. *Acta path. microbiol. scand.* **28**, 82 (1951). — GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **30**, 1057 (1952). — HAMPERL, H.: Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstitiellen, plasmacellulären Pneumonie. *Klin. Wschr.* **30**, 820 (1952). — HERZBERG, K., H. HERZBERG-KREMMER u. G. MAY: Weitere Untersuchungen über *Pneumocystis Carinii* bei Säuglingspneumocystosen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **160**, 661 (1953/54). — JIROVEC, O., u. J. VANEK: Zur Morphologie der *Pneumocystis Carinii* und zur Pathogenese der Pneumocystispneumonie. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **92**, 424 (1954). — KAHLER, J.: Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstitiellen (nicht luischen) Säuglingspneumonie. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **37**, 285 (1954). — KURNICK, N. B.: Histological staining with methylgreen-pyronin. *Stain Technol.* **27**, 233 (1952). — OFFERKUCH, W., u. D. RICKEN: Die Fluorochromierung von *Pneumocystis Carinii*. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 132 (1959). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: Churchill 1953. — PLIESS, G.: Die *Pneumocystis Carinii* und ihre Bedeutung bei der interstitiellen, plasmazellulären Säuglingspneumonie. *Frankfurt. Z. Path.* **64**, 184 (1953). — RAUEN, H. M.: *Biochemisches Taschenbuch*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — SANDRITTER, W.: (1) Eine quantitative färberische histochemische Bestimmungsmethode der Nukleinsäuren im Gewebe. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 30 (1952). — (2) Diskussionsbemerkung. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **37**, 285 (1954). — SCHÜMMELFEDER, N., u. K. F. STOCK: Die Bestimmung des Umladebereiches von Gewebeelementen mit dem Fluorochrom Akridinorange. *Naturwiss.* **42**, 442 (1955). — WESSEL, W., u. D. RICKEN: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *Pneumocystis Carinii*. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 545 (1958).

Dr. W. OFFERKUCH, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstraße 5