

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

Über den Nachweis von *Toxoplasma gondii* im Gewebe mit Hilfe markierter fluoreszierender Antikörper (Methode nach Coons) *

Von

F. DALLENBACH und G. PIEKARSKI

Mit 5 Textabbildungen in 13 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 18. August 1960)

Der mikroskopische Nachweis von *Toxoplasma gondii* im Gewebe bereitet nach allgemeiner Erfahrung große Schwierigkeiten. Obgleich nach den serologischen Untersuchungsergebnissen der Anteil von *Toxoplasma*-Trägern in der Bevölkerung relativ sehr hoch ist, gelingt der Erregernachweis bei der täglichen histopathologischen Diagnostik sehr selten. Theoretisch müßte er häufig als Nebebefund auftreten. Auf jeden Fall wäre jedoch der mikroskopische Nachweis in den Fällen zu erwarten, wo Organe durch die *Toxoplasma*-Infektion verändert worden sind.

Als typisches Krankheitsbild der Erwachsenen-Toxoplasmose gilt heute die cervico-nuchale Lymphadenitis toxoplasmotica mit kleinherdiger Epitheloidzell-Wucherung (PIRINGER-KUCHINKA), die nach den Beobachtungen von SIIM, MAGNUSSON u. a. mit hohem spezifischem Antikörper-Titer einhergeht. Der Erregernachweis war jedoch im histologischen Schnittpräparat nicht möglich; er wird von MARTIN und THALHAMMER als außerordentlich problematisch bezeichnet, da die Abgrenzung gegenüber den gerade im Lymphknoten so häufig anzutreffenden Kerntümmern kaum möglich ist. Dagegen ist einigen Autoren (SIIM 1952, ROTH und PIEKARSKI u. a.) der Erregernachweis im excidierten Lymphknoten durch den Tierversuch gelungen.

Wegen dieser Diskrepanz zwischen charakteristischen histologischen Veränderungen und positivem serologischem Test einerseits und fehlendem morphologischem Erregernachweis im Gewebe andererseits trat der Verdacht auf, daß die Gestalt der Toxoplasmen in den Lymphknoten von der Norm abweichen könnte, und sie deshalb nicht erkennbar wären. Dafür könnten die Angaben von WESTPHAL sprechen, der auf die mögliche Wirkung der Immunkörper auf die Toxoplasmen hinwies und meinte, daß Größe und Gestalt der Parasiten sich unter dem Einfluß des Wirtes erheblich verändern; relative Erhöhung der Immunitätslage des Wirtsorganismus würde eine Reduzierung der Parasitengröße bewirken.

Bekanntlich ist das histologische Bild der Lymphdrüsen-Toxoplasmose gekennzeichnet durch diffuse oder granulomartige Wucherungen epitheloider eosinophiler Reticulum-Zellen in den Marksträngen mit ungewöhnlicher Anhäufung von Granula in den Sekundär-Follikeln sowie in den Epitheloidzell-Herden. Die Deutung eines Teiles dieser Granula im Sinne von Toxoplasmen erschien ROTH

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

und PIEKARSKI berechtigt, weil es ihnen in 2 Fällen, bei denen die frisch entnommenen Lymphknoten für den Tierversuch verwendet werden konnten, gelang, den Erreger zu isolieren. Die betreffenden Patienten wiesen auch serologisch hohe Toxoplasma-Titer auf. Der direkte Nachweis von Toxoplasmen im Gewebe konnte jedoch auch auf diese Weise nicht geführt werden.

Die unbefriedigenden histologischen Befunde führten uns dazu, den Versuch zu unternehmen, mit Hilfe der Fluorescenz-Methode nach COONS die Toxoplasmen im Gewebe darzustellen. Zum erstenmal gelang es GOLDMAN (1957), Toxoplasmen im Peritoneal-Exsudat infizierter Mäuse mit fluoresceïnmarkierten Antikörpern nach dem Vorgehen von COONS und KAPLAN (1950) zu färben. Exsudat-Austriche sowie sedimentiertes Exsudat mit Toxoplasmen wurde mit markierten Antikörpern 1 Std bei 37° C zusammengebracht. Nach dem Auswaschen in physiologischer Kochsalzlösung (10 min) und Waschen in Leitungswasser (5 min) wurden die Präparate getrocknet und in alkalisch gepuffertem Glycerin untersucht. Es kam zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die offenbar spezifisch war. In der Hoffnung, mit Hilfe dieser Methode auch in Gewebsschnitten die Toxoplasmen nachweisen zu können, unternahmen wir die gleichen Versuche, wobei wir eine abgewandelte Methode benutzten.

Material und Methode

1. Tierversuche. Da es uns zunächst nicht gelang, an Toxoplasmose erkrankte menschliche Lymphknoten unfixiert zu erhalten, verwandten wir Organe von 9 Mäusen und 3 Meerschweinchen. Diesen Tieren injizierten wir einmalig eine Aufschwemmung von lebenden Toxoplasmen intraperitoneal. Je 2 Mäuse wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend 24 Std nach der Injektion, getötet. In der Regel starben die Tiere infolge der Toxoplasma-Infektion zwischen dem 4. und dem 5. Tag. Ein Meerschweinchen wurde 3 Monate, die übrigen zwei 1 Jahr nach der Infektion mit Toxoplasmen getötet. Alle 3 Tiere wiesen im Sabin-Feldman-Test Titer zwischen 1:16000 bis 1:64000 auf.

Alle untersuchten Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme tiefgefroren. Wir ließen sie dazu in ein Gefäß mit Petroleum-Benzin (Siedebereich 40–70° C) fallen, das in einem Gemisch von Aceton und Trockeneis auf –70° C abgekühlt war. Nach 2–3 min gelangten die eingefrorenen und abgetrockneten Organe bei –25° C in die Tiefkühltruhe, wo sie längere Zeit aufbewahrt werden können. Die später bei –20° C im Kryostaten hergestellten 5–7 μ dicken Schnitte wurden für 2 Std unter einem Ventilator getrocknet, 10 min in Aceton fixiert und anschließend 15 min in 3mal gewechselter gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,15) gewaschen (0,15 M NaCl, 0,01 M Phosphat). Die Feuchtigkeit in der Umgebung des Schnittes wurde sorgfältig abgewischt und der Schnitt danach in einer feuchten Kammer gefärbt.

2. Herstellung der Serumproben. Für die direkte Färbetechnik verwandten wir Menschen- oder Meerschweinchen-Seren mit Sabin-Feldman-Titern von 1:16000 bis 1:64000. Die Meerschweinchen-Seren wurden gesammelt und daraus eine γ -Globulin-Anreicherung nach der Methode von COHN mit kaltem Äthanol vorgenommen. Danach erfolgte die Markierung mit Fluoresceïn-Isothiocyanat (RIGGS) bei 0° C nach der von COONS u. Mitarb. vorgeschriebenen Methode. Markiertes Serum wurde in der Kälte dialysiert und dann 2mal mit Mäuseleberpuder absorbiert (COONS et al 1955). Für die indirekte Färbemethode benutzten wir mit Fluoresceïn-Isothiocyanat markierte Anti-Menschen-Globulin-Seren vom Kaninchen und Anti-Meerschweinchen-Globulin-Serum vom Kaninchen bezogen von der Arnel Products Co., New York City.

3. Färbung der Gewebsschnitte. Die benutzte Technik entsprach im wesentlichen der von COONS (1950, 1956) beschriebenen. Im direkten Verfahren wurden die Schnitte der Meerschweinchen-Organe nur mit Menschen-Serum gefärbt; die der Mäuse mit Menschen- und Meerschweinchen-Serum.

Bei der *direkten Methode* wurde der Gefrierschnitt mit fluoreszierendem Antiserum überschichtet, in der Erwartung, daß dessen Antikörper von den Parasiten gebunden werden. Eine ausreichende Menge markierter Antikörper (bzw. γ -Globulin von Meerschweinchen- oder Menschenserum) wurde auf die Schnitte getropft, so daß sie das ganze Präparat bedeckten. In einer feuchten Kammer prüften wir verschiedene Färbezeiten: $1/2$ — $3/4$ Std erwies sich als am besten geeignet. Danach wurde das benutzte Serum vorsichtig mit einer kleinen Pipette abgesaugt und die Schnitte sorgfältig 15 min in 4mal gewechselter gepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Wir brachten dann einen Tropfen gepufferter Glycerinlösung (1:9) auf die Schnitte und deckten mit einem Deckglas ab.

Bei der *indirekten Methode* wurde das unmarkierte Menschen- oder Meerschweinchen-Antiserum unmittelbar auf die Schnitte gebracht und dann der Ort der Antikörper-Bindung dadurch nachgewiesen, daß man nach gründlichem Waschen den Schnitt mit fluoresceinmarkiertem, vom Kaninchen gewonnenem Antiserum gegen γ -Globulin vom Menschen oder vom Meerschweinchen überschichtet. Ein Tropfen des unmarkierten Menschensersums oder im Falle des Mäusegewebes ein Meerschweinchen Serum mit hohem Antikörper-Titer wurde 45 min bis 1 Std lang bei Zimmertemperatur auf den Schnitt gebracht. Wir nahmen die Reaktion in einer feuchten Kammer vor, um Eindunstung des Serums zu verhindern. Danach wurden die Schnitte abgespült und in 3mal gewechselter gepufferter Salzlösung 15 min gewaschen. Den Objektträger wischten wir in der Umgebung des Schnittes sorgfältig trocken und brachten darauf entweder einen Tropfen von markiertem Kaninchen-Anti-Menschen- γ -Globulin-Serum oder markiertem Kaninchen-Anti-Meerschweinchen- γ -Globulin-Serum unter gleichen Bedingungen wie oben erwähnt. Danach wurde der Objektträger in 4mal gewechselter gepufferter Glycerinlösung unter einem Deckglas eingedeckt.

Die mit Fluorescein gefärbten entsprechenden Schnitte sowie teilweise die Fluorescein-Schnitte selbst wurden zu Vergleichszwecken jeweils mit Hämatoxylin-Eosin, Giemsa und Galloeyanin gefärbt bzw. ungefärbt.

4. Mikroskop. Die Untersuchung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss mit einem Dunkelfeld-Kardioid-Kondensor, Quecksilberhochdrucklampe HBO 200, Ultraviolett-Blaulicht- (BG 12—3 mm dick) und Sperrfilter OG-1 2,5 mm oder Kodak Wratten 2B. Alle Linsen des Mikroskops waren fluoreszenzfrei sowie auch die gewöhnlichen Objektträger.

5. Kontrollen. Folgende Kontrollen dienten zur Sicherung der Spezifität der Reaktion:

a) *Blockade der Färbung durch Vorbehandlung mit unmarkiertem homologem Antiserum.* In der Erwartung, daß das unmarkierte Antiserum sich an die Toxoplasmen bindet, so daß eine nachfolgende Reaktion mit dem fluoresceinmarkierten Antiserum unmöglich wird. Eine solche Bindung mit unmarkiertem Serum tritt nachgewiesenermaßen dann ein, wenn das Serum einen hohen Sabin-Feldman-Titer hat und lange genug (d. h. mindestens 45 min) in Kontakt mit den Toxoplasmen gelassen wird. Trotzdem darf die nachfolgende Reaktion mit markiertem Antiserum nicht länger als 10—15 min dauern, da sonst die Toxoplasmen allmählich eine schwache Fluoreszenz erwerben, wahrscheinlich durch Ersatz der unmarkierten durch markierte Antikörper (Coons 1955, 1956). Mit unmarkiertem normalem Serum gelingt eine Blockade überhaupt nicht.

b) *Färbung mit markiertem normalem Serum mit negativem Titer im Sabin-Feldman-Test.* Dabei kann von vornherein keine Anfärbung der Toxoplasmen erwartet werden.

c) *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ungefärbter Schnitte.* Eine derartige Kontrolle erschien nötig, weil einige Zellen oder Zellbestandteile eine Eigenfluoreszenz zeigen (HAMPERL, SJÖSTRAND), die färberisch vom Gelbgrün des Fluoresceins schwer zu unterscheiden ist. Hyperplastische Lymphknoten von Meerschweinchen z. B. enthalten eosinophile Leukocyten, deren Granula mit BG 12- und OG-Filtern hellgelb aufleuchten. Weiterhin muß die rötlich-gelbe Eigenfluoreszenz der gekörnten lipoiden Pigmente in Leber und Gehirn berücksichtigt werden.

d) *Bei Färbung von normalem Gewebe mit markiertem Serum ist keine Reaktion zu erwarten.*

e) *Spezifische Beseitigung der Antikörper durch Präzipitation mit spezifischem Antigen* (Coons et al. 1942) (Inhibition-Test). Zellfreies, aus Toxoplasmen gewonnenes Antigen wurde dem markierten Antiserum im Verhältnis 2:1 zugesetzt. Die Mischung wurde 1 Std lang bei 37° C stehengelassen, dann zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit zur Färbung der Schnitte benutzt. Nachgewiesenermaßen hatte das markierte Antiserum nach dieser

Vorbehandlung die Fähigkeit verloren, Toxoplasmen anzufärben. Dagegen behielt ein auf gleiche Weise mit einem anderen Protein versetztes Antiserum diese Fähigkeit.

Ergebnisse

1. Peritoneal-Ausstriche von Mäusen, 1—4 Tage nach der Infektion mit Toxoplasmen: Diese Ausstriche enthalten kurz nach der Färbung sowohl mit der direkten als auch mit der indirekten Methode reichlich kräftig gelbgrün fluoreszierende halbmondförmige Gebilde von ziemlich einheitlicher Größe und Form (s. Abb. 1). Ihre Länge entspricht etwa dem Durchmesser eines roten Blut-

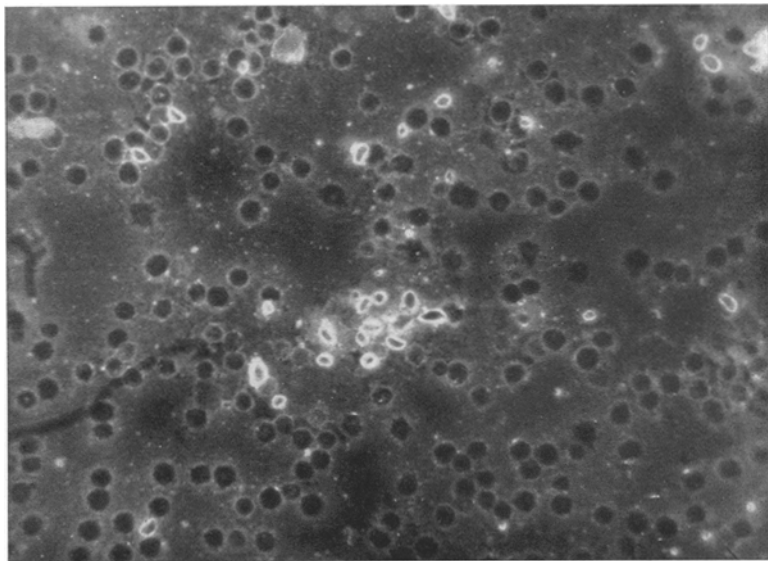


Abb. 1. Peritoneal-Ausstrich von einer i. p. mit Toxoplasmen infizierten Maus. Hell aufleuchtende halbmondförmige Toxoplasmen zwischen „ungefärbten“ Blutkörperchen. Fluoreszenzbild, indirekte Methode. Vergr. 300fach

körperchens. Im Innern dieser Gebilde erkennt man bei genauer Mikrometereinstellung häufig an einer Seite einen schwächer fluoreszierenden und daher dunkler erscheinenden rundlichen Bezirk. Die Fluoreszenz dieser Gebilde ist an ihrer gesamten Peripherie wesentlich stärker als im Zentrum, so daß sie von einem fluoreszierenden Kranz umgeben zu sein scheinen (s. Abb. 2). Dieser „Kranzeffekt“ wird in den mit der indirekten Methode gefärbten Präparaten besonders deutlich. Die halbmondförmigen Gebilde liegen im Ausstrich teilweise einzeln zwischen den roten und weißen Blutkörperchen, größtenteils aber in Haufen mehr oder weniger dicht gedrängt beisammen. Die stärkste Fluoreszenz findet sich immer an den Stellen, an denen die Gebilde so dicht aneinanderliegen, daß ihre jeweiligen Kranzeffekte ineinander übergehen und sich in ihrer Leuchtkraft gegenseitig verstärken (s. Abb. 2b). Außer dieser besteht in den Präparaten keine weitere Fluoreszenz irgendwelcher anderer Strukturen.

Da diese Körperchen morphologisch in Größe, Form und Aussehen vollkommen mit dem aus parasitologischen Untersuchungen bekannten *Toxoplasma gondii* übereinstimmen, glauben wir mit Sicherheit, hier die durch Infektion in die Bauchhöhle eingebrachten *Toxoplasmen* vor uns zu haben. In den nach

GIEMSA gefärbten Peritoneal-Ausstrichen erkennt man außerdem die gleichen Gebilde, die sich hier sehr leicht als Toxoplasmen identifizieren lassen.

Läßt man die gefärbten Präparate einige Wochen liegen, so erscheinen die Toxoplasmen vergrößert und oval oder eiförmig, so als ob sie aufgequollen wären. Ihre Fluoreszenz hat fast noch die gleiche Intensität wie im Frischpräparat, nur der Kranzeffekt ist undeutlicher geworden zugunsten einer nun mehr gleichmäßig über den ganzen Parasiten verteilten Fluoreszenz.

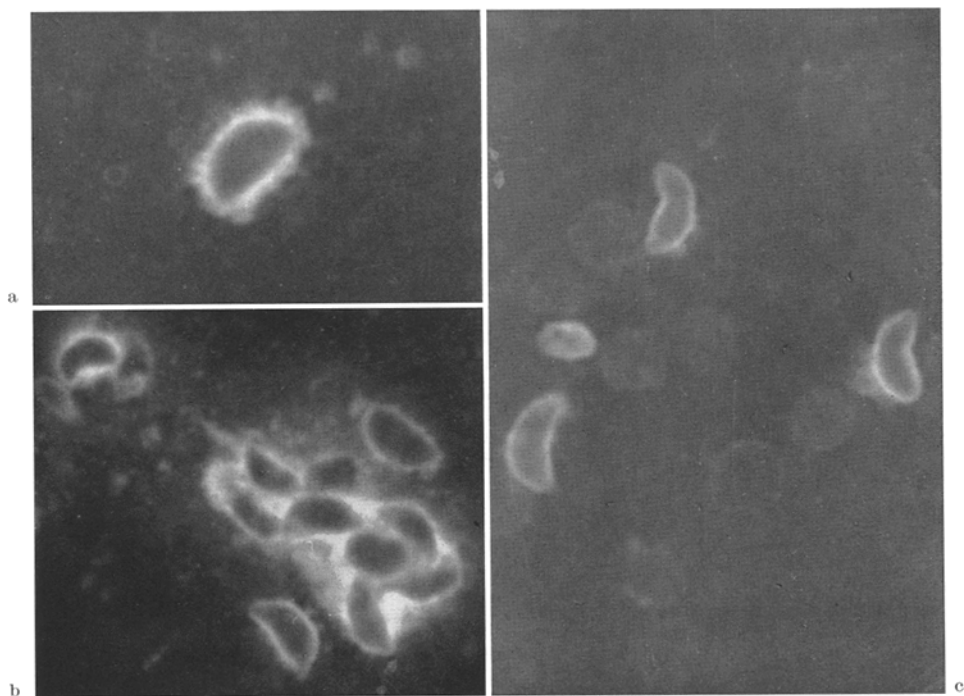


Abb. 2a—c. Peritoneal-Ausstrich von einer Maus. Einzelne (a u. c) und Gruppen (b) von Toxoplasmen mit „Kranzeffekt“ (vgl. Text). Fluoreszenzbilder, nach der indirekten Methode. Vergr. 1200fach

2. Gewebsschnitte. Die exakte fluoreszenzmikroskopische Beurteilung von Größe und Form der Toxoplasmen im Gewebsschnitt bereitet mehr Schwierigkeiten als im Ausstrich, da sie nicht frei, sondern fixiert und eingengt zwischen Gewebs- und Entzündungszellen liegen; außerdem ist eine exakte Lokalisation fluoreszierender Punkte in mehr als 5μ dicken Schnitten durch die Streuung des Fluoreszenzlichtes erschwert.

a) Akutes Stadium (Mäuse, 1.—4. Tag nach der Infektion). In den ersten Stadien nach der peritonealen Infektion lassen sich kräftig fluoreszierende Toxoplasmen vor allem im mesenterialen Fettgewebe, unter der Serosa des Darms und unter der Leberkapsel nachweisen, dann auch in Milz, mesenterialen Lymphknoten und im Lebergewebe selbst.

In *Milz* und *Lymphknoten* liegen im Frühstadium der Infektion (1.—2. Tag) die meisten Toxoplasmen einzeln in den Rindenbezirken, und zwar innerhalb von Makrophagen. Die Mehrzahl von ihnen ist annähernd halbmondförmig und halb

so groß wie ein rotes Blutkörperchen. Sowohl die intra- als auch die extracellulär gelegenen Parasiten zeigen eine kräftige Fluoreszenz, wobei wiederum die Randzone am hellsten aufleuchtet und offenbar der noch gut erhaltenen Zellmembran entspricht (Abb. 3a und b). Sie sind also den in den Ausstrichen gefundenen Toxoplasmen in Form, Größe und Fluoreszenzstärke weitgehend vergleichbar. Eine Fluoreszenz anderer Zellen oder Gewebsbestandteile ist nicht vorhanden. Am 3. und 4. Tag nach der Infektion sind die Parasiten sehr viel zahlreicher,

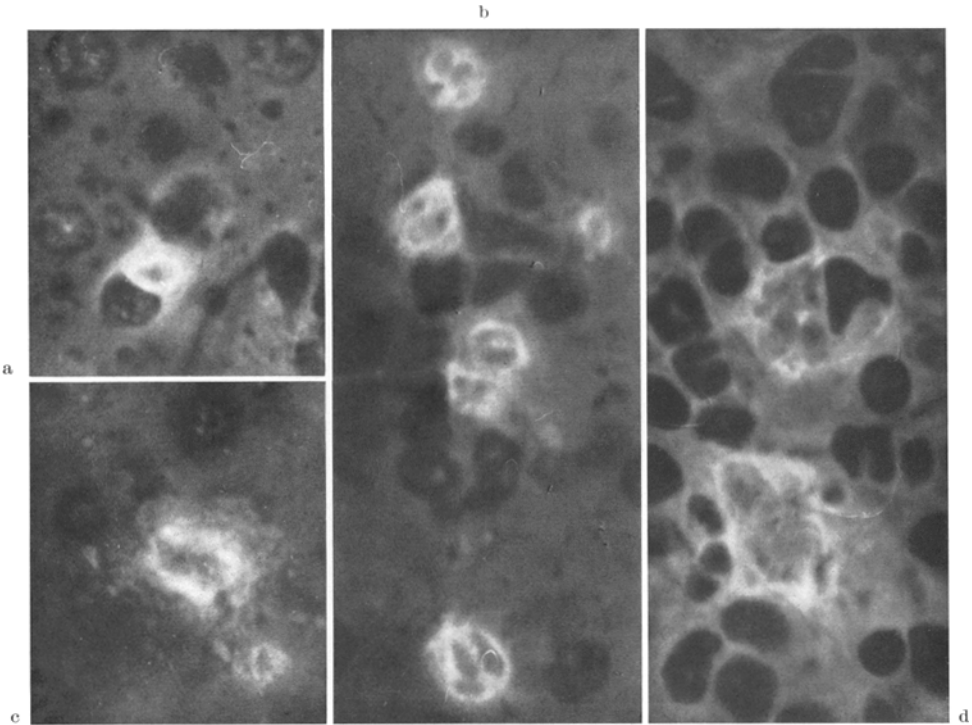


Abb. 3 a—c. Leber einer Maus. a 1 Tag nach der Infektion. Scharf begrenztes intracelluläres Toxoplasma mit hell aufleuchtender intakter Hülle. b 2 Tage nach der Infektion. Gruppen von intra- und extracellulären Toxoplasmen. c 4 Tage nach der Infektion. Verwischte Kontur von zugrunde gehenden Toxoplasmen mit teilweise feinkörniger Fluoreszenz in der Umgebung. d Milz einer Maus, 4 Tage nach der Infektion. Intracellulär „verdaute“ Toxoplasmen mit diffuser Fluoreszenz. Fluoreszenzbilder nach der indirekten Methode. Vergr. 1000fach

mehr gleichmäßig über das Milz- und Lymphknotengewebe verteilt und lassen sich jetzt auch freiliegend innerhalb der Sinusoide zum Teil in großen Ansammlungen auffinden. Im Gegensatz zu ihrer scharfen Kontur noch am 1. und 2. Tag nach der Infektion erscheinen die Zellgrenzen bzw. die hell aufleuchtenden Randzonen der Parasiten jetzt verwischt und von körniger Beschaffenheit (s. Abb. 3c); sie bilden mit ihrer direkten Umgebung eine breite, nicht mehr ganz so intensiv fluoreszierende Zone, die teilweise über die Zellgrenze des die Parasiten beherbergenden Makrophagen hinaus bis in Zwischengewebe reicht (s. Abb. 3d). Nur einzelne der Parasiten sind jetzt an ihrer Halbmondform deutlich erkennbar, im übrigen sieht man im Bereich der fluoreszierenden Parasitenhaufen schuppenförmige, 1—2 μ große Bröckel, die um so zahlreicher sind, je ausgeprägter die

umgebende entzündliche Zellreaktion, Nekrose und Exsudation des Gewebes ist. In der *Leber* lassen sich am 1. und 2. Tag nach der Infektion nur einzelne, am 3. und 4. Tag aber Haufen von Toxoplasmen nachweisen (s. Abb. 4 b), und zwar immer sowohl freiliegend in den Sinusoiden als auch innerhalb von Leberzellen (s. Abb. 3 a). Vereinzelte oder Gruppen von Toxoplasmen liegen auch im Lumen der Pfortaderäste. Die Form der Parasiten ist am 1. und 2. Tag noch gut erkenn-

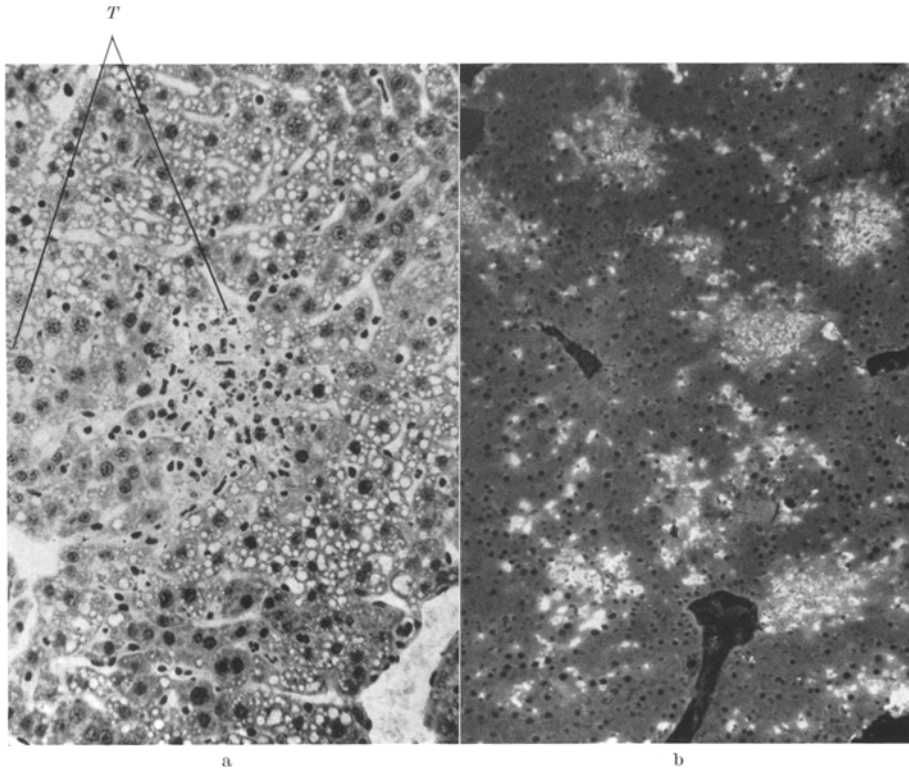


Abb. 4 a u. b. Leber einer Maus, 3 Tage nach der Infektion. a Nekroseherd mit eben sichtbaren punktförmigen Toxoplasmen (T). Hämatoxylin-Eosin. Vergr. 260fach. b Gleiche Leber wie a. Zahlreiche Nekroseherde mit hellaufleuchtenden Toxoplasmen. Fluoreszenzbild. Färbung nach indirekter Methode. Vergr. 240fach

bar, während am 3. und 4. Tag die Konturen, analog zu den in der Milz gesehenen Formen, größtenteils verwischt sind. Auch im fibrinös-eitrigen *Peritonealbelag* lassen sich am 3. und 4. Tag nach der Infektion schuppenförmige fluoreszierende Bröckel nachweisen; dabei fluoresciert häufig sogar die zwischen den zahlreichen Bröckeln gelegene eiweißreiche Flüssigkeit mit (s. Abb. 5 a).

Die im *mesenterialen Fettgewebe* nachgewiesenen Toxoplasmen liegen vom 1. bis 4. Tag nach der Infektion sowohl frei im Zwischengewebe als auch in den Mesenterialgefäßen und zeigen das gleiche Verhalten wie die Parasiten in Milz, Lymphknoten und Leber.

Auf mit Giemsa, Hämatoxylin-Eosin und Gallocyanin gefärbten *Vergleichsschnitten* lassen sich die Toxoplasmen an ihrer Form, Größe und Lagerung bei genauem Suchen wiederfinden; sie färben sich mit H.-E. rot, mit Gallocyanin und

mit Giemsa blau an. Sie sind jedoch oft schwer von Zelltrümmern abzugrenzen (s. Abb. 4a und 5c).

Die cervicalen Lymphknoten, Herzmuskel, Lungen, Nieren, Nebennieren und das Gehirn aller Versuchstiere waren frei von Toxoplasmen oder entzündlichen Veränderungen.

b) *Chronisches Stadium* (Meerschweinchen, 3 Monate bis 1 Jahr nach der Infektion). Trotz hohem Sabin-Feldman-Titer der Versuchstiere und generali-

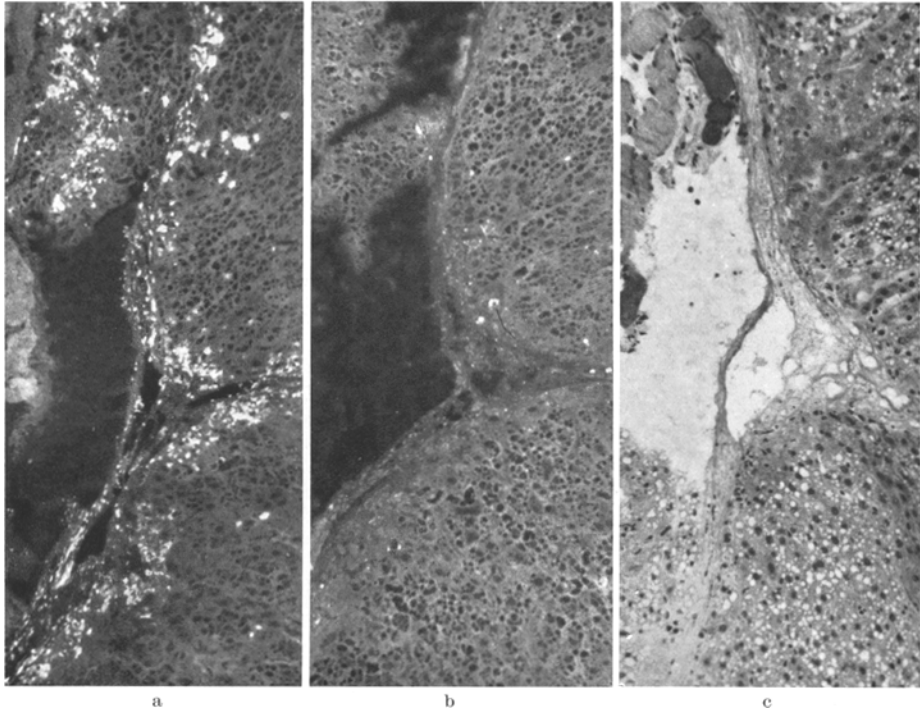


Abb. 5a—c. Leber einer Maus, 3 Tage nach der Infektion. a Deutliche grüne Fluoreszenz der Toxoplasmen im Bereich der Leberkapsel. Färbung mit direkter Methode. b Gleiche Stelle. Färbung mit direkter Methode nach Antikörper-Absorption (Inhibition-Test, Kontrolle Nr. 5): Verlust der Fluoreszenz. Auflenuchten nur vereinzelter eosinophiler Zellen (gelbe Fluoreszenz). c Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes Vergleichspräparat. Kleinste eben sichtbare Toxoplasmen im Bereich der Kapsel und des bedeckenden Exsudats. Vergr. 220fach

sierter Lymphadenopathie bei der Obduktion lassen sich fluoreszenzmikroskopisch in keinem Gewebe intakte Toxoplasmen nachweisen. Dagegen enthält die *Leber* kleine, unscharf begrenzte, aus Histiocyten und Fibroblasten zusammengesetzte Herdchen, die mit markiertem Antiserum schwach fluorescieren. Diese Fluoreszenz hat sich an Kontrollschnitten als spezifisch für Toxoplasmen erwiesen. Den „tingiblen Körperchen“ der Paraffinschnitte vergleichbare Gebilde lassen sich fluoreszenzmikroskopisch nicht anfärben. Mit H.-E. gefärbte Vergleichsschnitte zeigen auch keine der menschlichen Lymphknotenveränderung ähnliche umschriebene Reticulumzellhyperplasie, wohl aber reichliche Anhäufungen von eosinophilen Zellen.

Gehirn, Lungen, Herzmuskel, Nieren, Nebennieren, Lymphknoten, Darm und Knochenmark sind frei von toxoplasmosespezifischen fluorescierenden Strukturen.

Zwischen der Intensität der Fluoreszenz und der Titerhöhe des benutzten Toxoplasma-Antiserums besteht eine deutliche quantitative Beziehung: Je höher der Antikörpertiter des im Verhältnis 1:2 mit Kochsalzlösung verdünnten Serums, desto stärker leuchten die gefärbten Toxoplasmen auf. Wir vermochten diese Beziehung zwar nicht wie MELLORS photometrisch zu objektivieren, sie konnte aber immer wieder eindeutig festgestellt werden.

c) *Kontrollen.* Die Resultate der 5 verschiedenen Kontrolluntersuchungen zeigen, daß die hier nachgewiesene Fluoreszenz spezifisch für Toxoplasmen ist:

1. Wenn das Gewebe mit unmarkiertem Antiserum vorbehandelt wird, ist die nachfolgende Fluoreszenz-Reaktion negativ.

2. Die Toxoplasmen werden durch markiertes Serum mit negativem Sabin-Feldman-Test nicht angefärbt.

3. Eine Eigenfluoreszenz bestand in unseren Schnitten nicht, abgesehen von einer blauweißen, durch die pathologischen Gewebsveränderungen bedingten Fluoreszenz der akut degenerierenden Leberzellen im Bereich der größeren fokalen Nekrosen sowie einer rötlichgelben Fluoreszenz von Lipoidkörnchen in Leber, Milz und Gehirn. Beide unterscheiden sich jedoch so deutlich von der Fluoreszenz der Toxoplasmen, daß eine Verwechslung ausgeschlossen ist.

4. Normales Gewebe fluoresciert nicht mit markiertem Antiserum.

5. Durch Zusatz eines spezifischen Antigens konnte die Färbefähigkeit des markierten Antiserums verhindert werden (s. Abb. 5b).

Besprechung

Die histologische Untersuchung experimentell mit Toxoplasmen infizierter Laboratoriumstiere mit Hilfe markierter fluoreszierender Antikörper führte sowohl mit der direkten als auch mit der indirekten Methode zu eindeutig positiven Resultaten. Dabei ist die Herstellung von Gefrierschnitten im Kryostaten der von GOLDMAN (1959) vorgeschlagenen Anfertigung von Paraffinschnitten vorzuziehen, da die Antigennatur der Parasiten im tiefgefrorenen Nativschnitt besser erhalten bleibt. Von allen untersuchten Organen waren die Parasiten jedoch nur in Milz, Leber, Lymphknoten, Mesenterien und Serosa nachweisbar. Der Befall gerade dieser Organe erklärt sich aus der intraperitonealen Infektion der Versuchstiere, durch die das gesamte Peritoneum von Toxoplasmen primär befallen wird. Der Nachweis von Parasiten auch in Blutgefäßen spricht in Bestätigung früherer diesbezüglicher Untersuchungen dafür, daß der weitere *Transport der Erreger* teils durch aktives Eindringen in das Organparenchym, teils durch Verschleppung auf dem Blutweg erfolgt.

Als positive Kontrolle zur Darstellung der Toxoplasmen dienten die Ausstriche von Peritonealexsudat infizierter Mäuse, in denen insbesondere die Randpartien der Parasiten nach Art einer Corona hell aufleuchteten. Diese Erscheinung, die in den Schnitten wiederkehrte, dürfte besonders bemerkenswert sein, weil sie auf den *Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion* hinweist. Offenbar spielt dabei die Zelloberfläche eine bevorzugte Rolle. Eine gewisse Bestätigung dafür bieten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von LUDVIK (gemeinsam mit PIEKARSKI) an mit Antikörpern behandelten Toxoplasmen, bei denen neben einer Quellung der Zellmembran deutlich erkennbare Niederschläge von ultrafeinen Granula zu beobachten waren. Es erscheint uns berechtigt, in

den fluoreszenzmikroskopischen Befunden eine Parallele zu den morphologischen Beobachtungen zu sehen. GOLDMAN (1957) weist bei seinen Untersuchungsergebnissen besonders auf eine oder mehrere fluoreszierende fadenartige Strukturen hin, die vom spitzen Ende der Toxoplasmen ausgehen; er konnte aber die Natur dieser Fäden nicht ergründen. Auf Grund der Untersuchungen von LUDVIK wissen wir, daß sich am spitzen Pol der Toxoplasmen das sog. Conoid mit den Toxonemata befindet. Dieser Apparat hat wahrscheinlich die Aufgabe, dem Parasiten das Eindringen in die Wirtszelle zu ermöglichen. Er macht im Leben deutlich erkennbare wie tastende Bewegungen und haftet sich auch mit diesem Pol an Wirtszellen an. Wahrscheinlich stellen die fluoreszierenden Fäden, die wir in unseren acetontfixierten Präparaten nicht beobachten konnten, ein erstarrtes Sekret dar, das die Toxoplasmen unter Umständen kurz vor dem Absterben ausstoßen. Als solches hätte dieses Material antigenen Charakter, woraus sich auch die Bindung von markierten Antikörpern unschwer erklären ließe (vgl. entsprechende Antigen-Antikörper-Reaktionen bei *Trichinella spiralis*, JACKSON 1959).

Auffallend war es, daß der Parasiten-Nachweis bei chronisch infizierten Meerschweinchen mit hohem SFT-Titer nur im Lebergewebe gelang, während Gehirn, Milz oder Lymphknoten negativ blieben. Diese Erscheinung war uns vorerst unerklärlich, weil gerade diese Organe allgemein von Toxoplasmen bevorzugt aufgesucht werden. Eine mögliche Erklärung könnte einmal darin gesucht werden, daß die Toxoplasmen von den sie beherbergenden Wirtszellen im Laufe der Zeit nach und nach zerstört wurden; dafür könnten z. B. die Abb. 3c, d sprechen sowie auch die in diesem Stadium histologisch immer wieder zu findenden Trümmer, die teils Reste von Toxoplasmen, teils Reste der nach ihrer Zerstörung ebenfalls zugrunde gehenden Wirtszellen sein könnten. Daß man bei der Lymphadenopathia toxoplasmotica histologisch nur äußerst selten intakte Toxoplasmen auffinden kann, steht also mit den bisherigen fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen im chronischen Stadium in Parallele. Der immer noch hohe Titer im Sabin-Feldman-Test könnte vielleicht damit erklärt werden, daß nach Zugrundegehen der Wirtszelle das Toxin frei in die Umgebung diffundieren und die in diesem Stadium in der Leber beobachtete diffuse Fluoreszenz in Umgebung dieser Zellen erklären könnte (s. Abb. 3d). In Lymphknoten und Milz fehlte jegliche Fluoreszenz; hier müßte also das Antigen bereits ganz abgebaut worden sein.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Parasiten bei den serologisch hoch positiven Tieren bereits durch die eigenen Antikörper soweit „abgedeckt“ und damit neutralisiert waren, daß die markierten Antikörper (direkt oder indirekt) nicht mehr von den Toxoplasmen gebunden werden konnten. Wenn diese Erklärung nicht richtig sein sollte, wäre es wahrscheinlich möglich, mit Hilfe von markiertem Antikomplement nach der von KLEIN und BURKHOLDER angegebenen Methode doch noch zu einer Anfärbung der Parasiten zu gelangen. Erwähnt sei, daß Toxoplasmen in den genannten Organen zweifellos vorhanden gewesen sein müssen, weil die Überimpfung einer Organsuspension zur Infektion von Meerschweinchen führte. Für die Berechtigung unserer Deutung spricht vielleicht auch die Tatsache, daß der für diese Untersuchungen benutzte Toxoplasma-Stamm — er wurde aus einem menschlichen Lymphknoten isoliert — sehr geringe Virulenz für Meerschweinchen besaß. Es wäre also sicher lohnend, unsere Ergebnisse mit der Methode von KLEIN und BURKHOLDER zu überprüfen.

Außerdem könnte theoretisch die Möglichkeit bestehen, daß die Toxoplasmen enthaltenden Gewebszellen bei über 5μ dicken Schnitten nicht angeschnitten wurden und die Antikörper keinen Kontakt mit den von der intakten Zelle umgebenen Parasiten bekommen konnten. Die zu erwartende Zahl der Toxoplasmen dürfte ohnehin im chronischen Stadium weit unter der des akuten Stadiums liegen. Immerhin müßte man aber erwarten, daß doch hier und dort einmal eine einzelne Toxoplasmen einschließende Zelle angeschnitten sein müßte.

Schlußfolgerung

Toxoplasmen lassen sich in Gewebsschnitten mit der Coons-Methode eindeutig und spezifisch darstellen. Das gilt offenbar für alle Stadien der Erkrankung, in denen die Parasiten noch als Antigene wirksam sind. Die Darstellung der Toxoplasmen mit der Coons-Methode zeigt darüber hinaus deutlich, daß der Titerhöhe im Sabin-Feldman-Test eine spezifische Bedeutung zukommt. Die Coons-Methode erscheint zur genaueren histopathologischen Untersuchung der menschlichen Toxoplasmose sehr geeignet, insbesondere zur weiteren Aufklärung der Lymphadenopathia toxoplasmotica¹, der Infektionswege im menschlichen und tierischen Organismus und der Abklärung von Krankheiten, bei denen bis heute der Nachweis einer Toxoplasmainfektion nur serologisch geführt werden konnte.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der direkten und indirekten Fluoreszenzmethode nach COONS gelang es, Toxoplasmen in Milz, Lymphknoten und Leber von intraperitoneal infizierten Mäusen und Meerschweinchen spezifisch anzufärben. Am kräftigsten leuchtete die Zelloberfläche der Parasiten auf, die als Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion anzusehen ist. Während die Toxoplasmen im akuten Stadium der Infektion intakt intra- oder extracellulär nachweisbar waren, hatten sie im chronischen Stadium ihre scharfe Begrenzung verloren und waren nur noch an der für Toxoplasmen spezifischen Fluoreszenz erkennbar, und zwar nur noch im Lebergewebe. Die Stärke der Fluoreszenz war abhängig von der Höhe des nach SABIN-FELDMAN gemessenen Titters der zur Färbung benutzten Sera: Je höher der Titer, desto kräftiger die Fluoreszenz der Toxoplasmen. Ihre Darstellung mit dieser Methode zeigt, daß dem Sabin-Feldman-Test bei der Antikörpermessung der Toxoplasmose eine spezifische Bedeutung zukommt.

Summary

Using the Coons fluorescein labelled antibody technic (direct and indirect methods), toxoplasma can be specifically stained in the spleen, lymph nodes, and liver of experimentally infected mice and guinea pigs. The outer cellmembran of the organisms fluoresces most intensely, indicating probably the site of antigen-antibody reaction. In the acute stages of infection the organisms are demonstrable intact intra- and extracellularly. In the chronic stages they lose the quality of giving a sharply demarcated staining and may be recognized only in the liver, and only by the presence of the specific fluorescence. The intensity of the

¹ Anmerkung bei der Korrektur: In Weiterführung dieser Untersuchungen gelang es uns inzwischen, in Schnitten von menschlichen Lymphknoten bei einer Lymphadenitis toxoplasmotica einwandfreie, streng lokalisierte, spezifische Fluoreszenz festzustellen; die Kontrollen erwiesen sich sämtlich als negativ. Damit dürfte sich die Verwendung von fluoresceinmarkiertem Antiserum auch zum Nachweis von Toxoplasmen in menschlichem Gewebe eignen.

fluorescence is dependent on the titer of the serum used for staining, as measured by the Sabin-Feldman test. The higher the titer the more brilliant the fluorescence. The demonstration of toxoplasma with the Coons technic confirms the opinion that the Sabin-Feldman test has specific significance in evaluating the titer of antibody against toxoplasma.

Literatur

- COONS, A. H.: Histochemistry with labelled antibody. *Int. Rev. Cytol.* **5**, 1 (1956).
- , H. J. CREECH, R. N. JONES and E. BERLINER: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* **45**, 1959 (1942).
- , and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. *J. exp. Med.* **91**, 1 (1950).
- , E. H. LEDUC and J. CONNOLLY: Studies on antibody production. *J. exp. Med.* **102**, 49 (1955).
- DEUTSCH, A. F.: Separation of antibody-active proteins from various animal sera by ethanol fractionation technics. *Meth. med. Res.* **5**, 284 (1952).
- GOLDMAN, M.: Staining toxoplasma gondii with fluorescein labelled antibody. *J. exp. Med.* **105**, 549 (1957).
- , and R. K. CARVER: Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. *Amer. J. clin. Path.* **32**, 159 (1959).
- HAMPERL, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **292**, 1 (1934).
- JACKSON, G. J.: Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis*-infections. *J. infect. Dis.* **105**, 97 (1959).
- KLEIN, P. G., u. P. M. BURKHOLDER: Ein Verfahren zur fluoreszenzoptischen Darstellung der Komplementbindung und seine Anwendung zur histo-immunologischen Untersuchung der experimentellen Nierenanaphylaxis. *Dtsch. med. Wschr.* **84**, 2001 (1959).
- — Studies on the antigenic properties of complement. *J. exp. Med.* **111**, 93 (1950).
- LUDVÍK, J.: Arbeitsgemeinschaft. Nordrh.-Westf. Pathologen, Tagg. am 16. 7. 1960.
- MAGNUSSON, J. H., and F. WAHLGREN: Human toxoplasmosis. An account of twelve cases in Sweden. *Acta path. microbiol. scand.* **25**, 215 (1948).
- MARTIN, I. A., A. PIRINGER-KUCHINKA u. O. THALHAMMER: Bericht über Untersuchungen bei einer bestimmten Form von Lymphadenitis. *Zbl. allg. path. Anat.* **97**, 507 (1958).
- MELLORS, R. C.: Histochemical demonstration of antibody localization in tissues with special reference to the antigenic components of kidney and lung. *Lab. Invest.* **4**, 69 (1955).
- PIRINGER-KUCHINKA, A., I. MARTIN u. O. THALHAMMER: Über die vorzüglich cervico-nuchale Lymphadenitis mit kleinherdiger Epitheloidzellwucherung. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 522 (1958).
- RIGGS, J. L., J. SEIWALD, J. H. BURKHALTER, C. M. DOWNS and T. G. METCALF: Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Amer. J. Path.* **34**, 1081 (1958).
- ROTH, F., u. G. PIEKARSKI: Über die Lymphknoten-Toxoplasmose der Erwachsenen. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 181 (1959).
- SHIM, J. C.: Studies on acquired toxoplasmosis: II. Report of a case with pathological changes in a lymph node removed at biopsy. *Acta path. microbiol. scand.* **30**, 104 (1952).
- edited by; Human toxoplasmosis. Proceedings of the conference on clinical aspects and diagnostics problems of toxoplasmosis at VIII. Internat. Congr. of Ped. 1956. Copenhagen: Munksgaard 1960.
- SJÖSTRAND, F.: Über die Eigenfluoreszenz tierischer Gewebe mit besonderer Berücksichtigung der Säugetiere. Stockholm: Norstedt-Söner 1944.
- WESTPHAL, A.: Entwicklung und Formvariabilität von *Toxoplasma gondii*, einem intrazellulären Parasiten des Menschen. *Verh. Dtsch. Zoologen*, S. 159. 1950.

Dr. F. DALLENBACH, Pathologisches Institut der Universität Bonn am Rhein-Venusberg
 Prof. Dr. G. PIEKARSKI, Hygiene-Institut der Universität, Med.-parasitol. Abt.
 Bonn am Rhein-Venusberg