zu erwarten gewesen. Wie aber bereits bekannt ist, verbessert Cortison die Überlebensrate nach Ganzkörperbestrahlungen nicht, es kann sogar schädlich wirken³. Auch Prednisolon verlängerte weder die Überlebenszeit unserer sensibilisierten Kaninchen noch die der Kontrollen. Dennoch ist damit eine Beteiligung der Nebennierenrinde am besonders schweren Verlauf der Strahlenkrankheit nach einer immunologischen Vorschädigung nicht völlig auszuschließen.

Unsere Befunde lassen keinen Rückschluß auf die Verhältnisse bei niedrigerer Strahlendosierung oder bei Teilbestrahlungen⁴ zu. Da in der Strahlentherapie vorwiegend Teilbestrahlungen verabreicht

werden, sind die aus diesen Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf die Humanmedizin zu übertragen. Eine Verstärkung der Strahlenkrankheit mit einer erhöhten oder beschleunigten Letalität bei Kranken, die an chronischen Infekten oder anderen immunologischen Komplikationen leiden, ist unseres Wissens bisher nicht bekannt geworden. Dies erscheint aber nach den hier vorliegenden experimentellen Ergebnissen nun durchaus im Bereich des Möglichen zu liegen.

Frl. A. ERNST und Frau R. MÜLLER, geb. BRAUN, sowie Herrn Dr. G. FANFANI möchten wir für die ausdauernde und gewissenhafte Mitarbeit bestens danken.

³ Z. M. BACQ u. P. ALEXANDER, „Grundlagen der Strahlenbiologie“, Thieme-Verlag, Stuttgart 1958.

⁴ M. H. BROWN, Canad. med. Assoc. J. **87**, 1183 [1962].

⁵ S. KOLLER, „Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen“, S. 28, T. Steinkopff, Dresden u. Leipzig 1940.

Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen im Zusammenhang mit der Rickettsiose von *Melolontha* spp.*

Von ALOYSIUS KRIEG

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

(Z. Naturforschg. **19 b**, 487—490 [1964]; eingegangen am 10. Oktober 1963)

By immunofluorescent studies on the rickettsioses of *Melolontha* spp. it was demonstrated that the shell of the accompanying protein crystals is antigenically related to the normal surface antigen of rickettsiae. These findings are in agreement with recent results of HUGER who described on the base of light microscope studies the genesis of crystals within pleomorphic rickettsiae of the genus *Rickettsiella*.

Bei der Lorsch-Seuche des Maikäfers (*Melolontha* spp.) [Erreger: *Rickettsiella melolonthae* (Krieg) Philip] treten, ebenso wie bei der Rickettsiose des Japankäfers (*Popillia japonica* Newm.), im Verlauf der Krankheit sog. Begleitkristalle auf (DUTKY und GOODEN¹, KRIEG^{2,3}). Ähnliche Kristalle beobachtete auch MÜLLER-KÖGLER^{3a} in rickettsiösen Larven von *Tipula paludosa* Meig. [Erreger: *Rickettsiella tipulae* Müller-Kögler]. HUGER⁴ fand, daß die Begleitkristalle bei der *Tipula*-Rickettsiose innerhalb von kristallophoren Gebilden entstehen, die er auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen als Albuminoid-Granula deutete. Solche Albuminoid-Gr-

nula sind in gesunden Fettkörperzellen zahlreich vorhanden, werden aber in *Rickettsiella*-infizierten Zellen allmählich abgebaut. EM-Untersuchungen von Ultradünnschnitten durch den Fettkörper rickettsiöser Maikäfer-Engerlinge zeigten, daß auch hier die Kristalle nicht anders entstehen dürften als bei *Tipula* (KRIEG)⁵.

Die Begleitkristalle von Rickettsiellen sind in Essigsäure und in Ammoniumhydroxyd löslich (KRIEG)³ und können deshalb entgegen der Auffassung von DUTKY⁶ nicht aus Calciumoxalat bestehen. Auch kann es sich bei ihnen nicht um Harnsäurekristalle handeln, da sie keine positive Murexid-Reaktion geben.

* IV. Mitteilung der in dieser Zeitschrift erschienenen Untersuchungen zur Pathologie der Rickettsiose von *Melolontha* spec.

¹ S. R. DUTKY u. E. L. GOODEN, J. Bacteriol. **63**, 743 [1952].

² A. KRIEG, Z. Naturforschg. **10 b**, 34 [1955].

³ A. KRIEG, Z. Naturforschg. **13 b**, 374 [1958].

^{3a} E. MÜLLER-KÖGLER, Naturwissenschaften **45**, 248 [1958].

⁴ A. HUGER, J. Insect Pathol. **1**, 60 [1959].

⁵ A. KRIEG, Z. Naturforschg. **15 b**, 31 [1960].

⁶ S. R. DUTKY, Adv. Appl. Microbiol. **1**, 175 [1959].

Uratkristalle sind zwar normalerweise in Fettkörperzellen älterer Maikäfer-Engerlinge vorhanden, sie verschwinden aber in den rickettsiösen Partien desselben. Die Begleitkristalle bestehen im wesentlichen aus Proteinen, da sie nach Hydrolyse positive Aminosäure-Reaktionen zeigen (KRIEG)³. Der qualitative Vergleich des Aminosäurespektrums von Albuminoid und Begleitkristallen ließ im Sinne der Interpretation von HUGER an eine Kristallogenese durch proteinturnover in Albuminoid-Granula denken (KRIEG)⁷.

Unbefriedigend an einer solchen Ableitung der Begleitkristalle von Albuminoid-Granula war jedoch von Anfang an die Tatsache, daß sowohl HUGER⁴ als auch KRIEG⁵ auf Grund ihrer Beobachtungen noch eine zweite Entstehungsweise der Kristallbildung annehmen mußten, und zwar überall dort, wo Kristallbildung ohne gleichzeitige Anwesenheit von Albuminoid-Granula vorkam, wie z. B. in anderen Geweben als dem Fettkörper von *Tipula paludosa* (HUGER) und in den Albuminoid-freien NR-bodies der Fettkörperzellen von *Melolontha* spp. (KRIEG). Inzwischen konnte HUGER⁸ auf Grund vergleichender lichtmikroskopischer Studien am Entwicklungszyklus der Rickettsiellen von *Tipula paludosa*, *Melolontha* spp. und *Serica brunnea* L. feststellen, daß diese Erreger nicht nur in einem sog. Standard-Typ auftreten, der von Kurzstäbchen (ca. 200·600 m μ) repräsentiert wird (vgl. KRIEG)², sondern daß auch Pleomorphie häufig vorkommt. Außerdem beschrieb er, daß Begleitkristalle innerhalb von pleomorphen Rickettsiellen entstehen können. Demnach wären also die kristallophoren Gebilde nicht mehr als pathologisch veränderte Albuminoid-Granula anzusprechen, sondern als (degenerative?) Entwicklungsstadien von Rickettsiellen. Ist dieser Sachverhalt richtig, so ist eine enge immunologische Verwandtschaft zwischen den kristallophoren Gebilden und der Standardform der Rickettsiellen anzunehmen. Dies soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Material und Methodik

1. Herstellung des diagnostischen Serums *

Aus dem Fettkörper rickettsiöser Engerlinge (*Melolontha* spp.) isolierte „Standard“-Rickettsien dienten als Antigen. Die Zelldichte betrug nach Auszählung in

der HELBER-Kammer mit Hilfe des Phasenkontrast-Mikroskops ca. 10¹⁰ Rickettsien/Milliliter.

Das aus Kaninchen gewonnene Antiserum (Immunisierungsdosis: 3·2 ml i.v.) wurde zur Entfernung Rickettsien-unspezifischer Antikörper mit einem Fettkörper-Homogenat aus gesunden Maikäfer-Engerlingen abgesättigt. Nach 6 Stdn. bei 37 °C und nochmals 24 Stdn. bei 4 °C wurde der Adsorbat-Komplex vom Serum abzentrifugiert. 0,002% Merthiolat waren als Desinfektionsmittel zugesetzt worden. Der Rickettsien-Agglutinationstiter des so gewonnenen diagnostischen Kaninchen-Serums betrug 10⁻³.

2. Immunofluoreszenz-Technik

Hierbei wird der fluorochromatisch markierte Antikörper auf ein mikroskopisches Antigen-Präparat aufgebracht und dort spezifisch gebunden. Der fluoreszierende Antikörper lagert sich als Mikropräzipitat am Orte der spezifischen Bindung ab. Nach Entfernung des überschüssigen Antiserums ist der Antigen-Antikörper-Komplex im Fluoreszenz-Mikroskop darstellbar.

Bei unseren Versuchen wurde nicht wie bei der Originalmethode von COONS und KAPLAN⁹ das Immun- γ -Globulin mit einem anodischen Fluorochrom-Radikal wie z. B. Fluorescein-isothiocyanat direkt gekoppelt (one step method), sondern eine indirekte Methode (WELLER und COONS¹⁰) angewandt. Zur Verwendung kam ein Schaf-Antiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin, welches mit Fluorescein konjugiert war **. Dieser Weg wurde gewählt, um die Reindarstellung des Anti-Rickettsien- γ -Globulins sowie die Synthese und Kopplung des Fluorescein-Isothiocyanats zu umgehen. Gleichzeitig entfiel die umständliche Reinigung der γ -Globulin-Fluorochrom-Konjugate.

Bei der Ausführung der Technik wurden Ausstriche rickettsiösen Materials bei 25 °C etwa 30 min getrocknet, dann 15 min in Aceton fixiert und anschließend wieder 30 min getrocknet. Die Kontrollausstriche erhielten eine Behandlung mit Kaninchen-Normal-Serum (durch Punktion aus der Ohrvene vor der Immunisierung als „Serum-Kontrolle“ entnommen) und die übrigen eine solche mit Anti-Rickettsien-Kaninchenserum 35 min in einer feuchten Kammer bei 25 °C. Nach 15 bis 30 min Waschen in Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden alle Objektträger mit konjugiertem Anti-Kaninchenglobulin-Schafserum behandelt (30 min bei 25 °C) und schließlich nochmals 15 bis 30 min in Phosphatpuffer gewaschen. Die Einbettung der Präparate erfolgte in Glycerin-Phosphatpuffer-Gemisch (7 : 3). — Daten der optischen Geräte: Zeiss-Fluoreszenzeinrichtung für Durchlichtanregung mit Standard-Mikroskop (vgl. KRIEG)¹¹; als UV-Quelle: Quecksilber-Hochdruckbrenner Osram HBO 200; Erreger-Filter: Schott UG 2 + BG 12; Sperrfilter: Schott GG 4 + OG 4; Optik: Kondensor mit Apertur-Irisblende max. 1,3; Objektiv:

⁷ A. KRIEG, J. Insect Pathol. **1**, 35 [1959].

⁸ A. HUGER, Naturwissenschaften **49**, 358 [1962].

* Vgl. A. KRIEG, Naturwissenschaften **42**, 609 [1955].

⁹ A. H. COONS u. M. H. KAPLAN, J. exp. Medicine **91**, 1 [1950].

¹⁰ T. H. WELLER u. A. H. COONS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **86**, 789 [1954].

** Progressive Laboratories, Baltimore, USA.

¹¹ A. KRIEG, Z. wiss. Mikroskop. **62**, 256 [1955].

Achromat 100/Öl-Immersion mit Apertur-Irisblende 0,8 bis 1,3; Okular: 8-fach. Als Immersionsmittel zwischen Kondensor und Objektträger als auch zwischen Objektträger und Objektiv diente Paraffinöl.

3. Herstellung von Test-Antigenen für Absättigungsversuche

Hierzu wurde die Gradienten-Zentrifugation nach BRAKKE¹² herangezogen. Als Ausgangsmaterial diente wiederum ein Fettkörper-Homogenat rickettsiöser Engerlinge. Die nach Vorreinigung als Sediment erhaltene Mischung von Rickettsien und Kristallen wurde in 0,250-m. wäßriger Saccharose-Lösung resuspendiert und im Zentrifugenröhrchen einem Saccharose-Dichtegradienten überschichtet. Dieser hatte sich im Verlaufe von 24 Stdn. aus überlagerten Schichten von 0,335-m.; 0,636-m.; 0,975-m. und 1,111-m. Saccharose in wäßriger Lösung gebildet. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei etwa $10 \cdot 10^3$ g, erfolgte eine saubere Trennung der Fraktionen. Die Kristallfraktion erzeugte ein scharfes Band im oberen Teil des 0,335-m.-Bereiches, während die partiell entwässerte Rickettsien-Fraktion infolge ihrer höheren spezifischen Dichte im mittleren Teil des 0,636-m.-Bereiches ein zweites Band in der Höhe ca. 13 mm vom ersten entfernt bildete. Durch vorsichtiges Abpipettieren ließen sich „Standard“-Rickettsien (= Test-Antigen A) und Begleitkristalle (= Test-Antigen B) getrennt gewinnen. Die Absättigung des diagnostischen Serums erfolgte 6 Stdn. bei 37 °C und nochmals 24 Stdn. bei 4 °Celsius.

Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zu allen anderen cytologischen Methoden gestattet allein die Immunofluoreszenz-Technik eine direkte Aussage darüber, welche Gebilde (infolge spezifischer Fluorochromierung) als Rickettsien angesprochen werden können und welche infolge mangelnder Fluoreszenz eine rickettsienfremde Antigenstruktur aufweisen.

Diese Methode wurde zunächst auf Ausstrich-Präparaten von Hämolymphe und Fettkörper rickettsiöser Engerlinge von *Melolontha* spp. angewendet. Das Ergebnis wird durch 2 Abbildungen belegt. Während in den Kontroll-Ausstrichen (die mit Normal-Serum behandelt worden waren) keine immunologische Mikropräzipitation erfolgte, war dies bei den mit diagnostischem (Anti-Rickettsien-)Serum behandelten Ausstrichen der Fall. In ihnen trat eine spezifische Fluoreszenz auf, und zwar sowohl an den „Standard“-Rickettsien (Abb. 1) als auch an den die Kristalle einschließenden kristallophoren Gebilden

(Abb. 2). Die weißblaue Eigenfluoreszenz des Ausstrichmaterials war sehr gering und daher die Umrisse rickettsienfremder Strukturen im Fluoreszenzmikroskop bei Anwendung entsprechender Sperrfilter kaum zu erkennen. Sie ließ sich deutlich von der kräftigen spezifischen Gelb-grün-Fluoreszenz der markierten Antikörper unterscheiden. Andere Ge-

Abb. 1. Mikropräzipitation von Fluorescein-konjugierten Antirickettsien-Antikörpern an „Standard“-Rickettsien. Ausstrich. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Abb.-Maßstab 640 : 1.

Abb. 2. Mikropräzipitat von Fluorescein-konjugierten Antirickettsien-Antikörpern an kristallophoren Gebilden (darin dunkel der Kristall); opt. Querschnitt. Ausstrich. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Abb.-Maßstab 640 : 1.

bilde aus dem Fettkörper (Zellkerne, Albuminoide, Urate, Mitochondrien, Fettvakuolen, Zellmembranen) zeigten keine spezifische Fluoreszenz.

Um dem Einwand zu entgehen, daß die beobachtete serologische Verwandtschaft zwischen „Standard“-Rickettsien und Kristallhülle durch die Verwendung eines polyvalenten Serums * vorgetäuscht sein könnte, wurden Absättigungsversuche angesetzt.

des Ausgangsantigens mitinjiziert wurden oder daß möglicherweise eine Rickettsien-bedingte Kristallbildung im Anschluß an die Injektion in den Zellgeweben des Versuchskaninchens erfolgte.

¹² M. K. BRAKKE, J. Amer. chem. Soc. 73, 1847 [1951].

* Polyvalenz des Serums könnte entweder dadurch entstanden sein, daß geringe Mengen sehr kleiner Kristalle oder Trümmer von solchen gewissermaßen als Verunreinigung

Im ersten Teilversuch wurde das gegen Test-Antigen A („Standard“-Rickettsien) abgesättigte Serum im Immunofluoreszenz-Test an Ausstrichen des Testantigens B (Kristalle) geprüft und im Gegenversuch das gegen B abgesättigte Serum an Ausstrichen des Testantigens A. — Während alle Ausstriche, die mit (hinsichtlich Antigen A bzw. B) abgesättigten Seren behandelt worden waren, im UV-Strahlengang nicht fluoreszierten, zeigten die vergleichsweise mit dem normalen diagnostischen Serum behandelten Ausstriche der Antigene eine fast ebenso kräftige Fluoreszenz, wie sie bei den Hämolymphe-Ausstrichen beobachtet worden waren (s. o.). Durch den Vergleichsversuch mit reinem Antigen B als Ausstrichmaterial wurde außerdem demonstriert, daß im Gewebeausstrich nicht etwa eine Immunofluoreszenz der Kristallhülle durch Anlagerung von fluoreszierenden Rickettsien vorgetäuscht wurde.

Das Ergebnis des Absättigungsversuches bestätigt nochmals, daß Rickettsien und kristallophore Gebilde im wesentlichen homologe Antigen-Komponenten besitzen. Dieses Ergebnis spricht für einen ontogenetischen Zusammenhang zwischen Kristallen und „Standard“-Rickettsien und stützt experimentell die von HUGER⁸ beschriebene Ableitung der Begleitkristalle von pleomorphen Rickettsien.

Das Auftreten von alkali-löslichen Kristallen innerhalb von insektenpathogenen Mikroorganismen ist nicht neu. So enthalten u. a. der für *Melolontha* spp. pathogene *Bacillus popilliae* Dutky und auch der *Bacillus thuringiensis* Berliner solche Kristalle. Sie

entstehen dort normalerweise ebenfalls anläßlich einer morphologischen Umwandlung, und zwar bei der Sporulation als parasporale Körper innerhalb des Sporangiums. Im Falle von *B. thuringiensis* fungiert das Hydrolyseprodukt der parasporalen Kristalle nachgewiesenermaßen als Toxin. Es drängt sich deshalb die Frage auf, ob nicht etwa auch die Begleitkristalle der Rickettsien eine toxische Wirkung besitzen können, und zwar besonders deshalb, weil der Kristall-bildende Genus *Rickettsiella* im Gegensatz zu vielen anderen Rickettsien ausgesprochen fatale Infektionen in seinen Insektenwirten hervorruft. Verschiedene artifizielle Hydrolyseprodukte von Rickettsien-Kristallen wurden bereits auf toxische Wirkung geprüft, jedoch leider ohne Erfolg (vgl. KRIEG)⁷. Ebenfalls negativ fielen vergleichende Toxizitätsprüfungen mit Alkali-Extrakten von *B. popilliae*-Sporangien aus (KRIEG, unveröffentlicht). Weitere Versuche müssen klären, ob die artifizielle Hydrolyse in diesen Fällen nicht zu grob war und eine Inaktivierung bewirkte. Für diese Möglichkeit könnten Beobachtungen aus der *B. thuringiensis*-Forschung sprechen, wonach man durch enzymatische Hydrolyse weit wirkungsvollere Wirkstofflösungen erhält als bei Anwendung der robusten Alkali-Hydrolyse.

Für die Überlassung kranker und gesunder Engerlinge von *Melolontha* spp. aus Freiland-Material bin ich Herrn Dr. O. F. NIKLAS vom hiesigen Institut zu Dank verpflichtet. — Für ihre Mithilfe bei den Versuchen danke ich Frau G. NEUMANN. — Die Arbeit wurde durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.