

M



Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten Bern.
Direktor: Prof. Dr. W. Kolle.

Über den Nachweis und die Form der Negri'schen Körperchen beim Affen, Fuchs und Hamster.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Universität Bern

vorgelegt

von

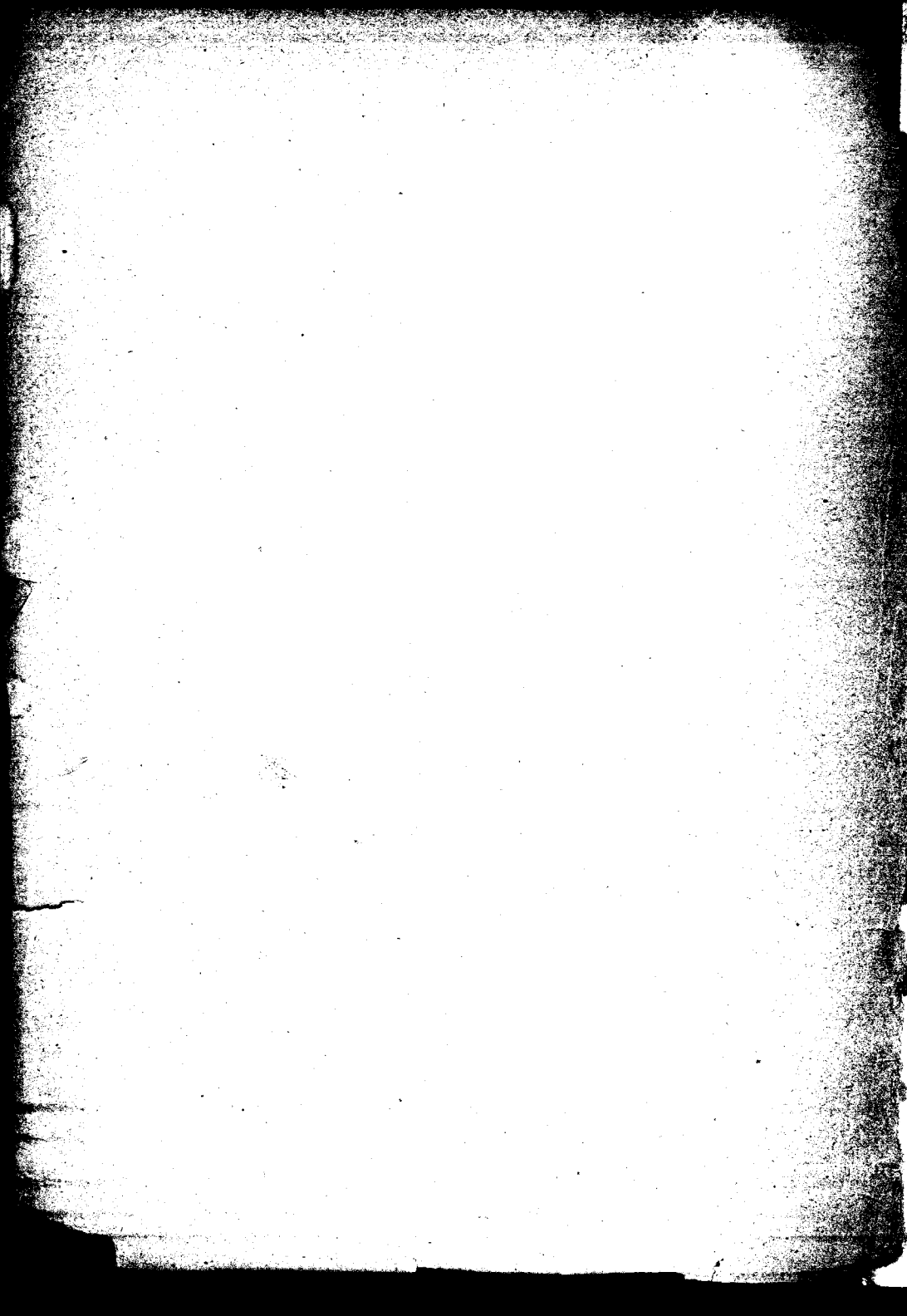
Paul Anselmier,

prakt. Arzt von Genf und Bern.



Jena.

Verlag von Gustav Fischer.
1908.



Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten Bern.
Direktor: Prof. Dr. W. Koller.

Über den Nachweis und die Form der Negri'schen Körperchen beim Affen, Fuchs und Hamster.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Universität Bern

vorgelegt

von

Paul Anselmier,

prakt. Arzt von Genf und Bern.



Jena.

Verlag von Gustav Fischer.

1908.

Von der Fakultät, auf Antrag des Herrn Prof. Dr. W. Kolle zum
Drucke genehmigt.

Der Dekan der Fakultät:
Prof. Dr. Siegrist.

Im Jahre 1903 machte NEGRI der medizinisch-chirurgischen Gesellschaft zu Pavia Mitteilung von dem Ergebnis seiner Untersuchungen über Veränderungen am Nervensystem bei Lyssa. Er fand in verschiedenen Gehirnteilen von Menschen und Tieren, welche an Wut verstorben waren, vor allem im Ammonshorn, eigenartige Gebilde, die sich bei keiner andern Krankheit nachweisen ließen. Mit Hilfe einer besonderen Färbemethode wies NEGRI runde, in den Ganglienzellen liegende Körperchen von verschiedener Größe nach, die größeren mehr elliptisch bis birnförmig gestaltet. Das Innere dieser Körperchen erwies sich deutlich von vakuolärer Struktur und erhielt oft eine bis zwei größere solcher Vakuolen, umgeben von einem Kranz kleinerer. Um das Ganze war eine deutliche Membran zu sehen. Außer im Ammonshorn waren die Gebilde auch zu finden in den PURKINJE'schen Kleinhirnzellen, in der Rinde, in den Brückenkernen, in der Medulla oblongata, im Ganglion Gasseri und den Spinalganglien. NEGRI verglich die von ihm beschriebenen Körperchen mit gewissen Formen bekannter Protozoen und brachte sie mit den noch unbekannten Erregern der Lyssa in Beziehung.

Die Befunde von NEGRI wurden von anderen Autoren bestätigt und erweitert. VOLPINO, D'AMATO, DADDI, LUZZANI und MACCHI, ABBA und BORMANNs untersuchten eine größere Anzahl von Gehirnen wutverendeter oder unter Wutverdacht verstorbener Tiere. Es kamen ferner auch die Organe von Wutfällen bei Menschen, Kühen, Katzen, Kaninchen zur Untersuchung. In allen Fällen, bei denen die NEGRI'schen Körperchen gefunden wurden, erzeugte die Verimpfung des Materials auf Versuchstiere typische Hundswut. MARZOCCHI konnte die NEGRI'schen Körperchen weder bei Tieren, die mit Tetanustoxin oder Strychnin vergiftet waren, noch in Fällen von Epilepsie oder Gehirnlaes finden. Es gelang ferner VOLPINO durch Färbung nach LAVERAN eine weitere Differenzierung zu erzielen; er konnte eine zarte, blaugefärbte

Membran sichtbar machen, von der eine hyaline strukturlose rotgefärbte Masse eingeschlossen war. In dieser ließen sich schwach rosa oder blau tingierte Gebilde nachweisen. Die Masse enthielt intensiv blaugefärbte punkt-, ring- oder stabförmige Elemente. BERTARELLI untersuchte die Beziehungen zwischen Infektiosität und morphologischem Verhalten der NEGRI-Körper bei Wutgehirnen. Das Ammonshorn wutkranker Hunde, das der Austrocknung, Hitze oder Verwesung ausgesetzt war, enthielt selbst bei erloschener Infektiosität die NEGRI'schen Körperchen in nur wenig veränderter Form. BOHNE prüfte die NEGRI-Körper auf ihre diagnostische Verwendbarkeit und zwar unter Anwendung einer von HENKE und ZELLER angegebenen Methode an mehr als 200 Gehirnen.

Er verfuhr zur Herstellung und Färbung der Schnitte folgendermaßen:

Herausschneiden einer $\frac{1}{2}$ mm dicken Scheibe aus der Mitte des Ammonshorns.

Reines Azeton (bei 37° 30—45 Minuten).

Einlegen in flüssiges Paraffin von 55° Schmelzpunkt (bei 60° zirka eine Stunde lang).

Schneiden von 6 μ dicken Schnitten.

Diese mit kaltem Wasser, dem etwas Gummilösung zugesetzt ist, auf den Objektträger bringen.

Antrocknenlassen auf dem Paraffinofen.

Entfernung des Paraffins.

Färbung $\frac{1}{2}$ bis 4 Minuten in der MANN'schen Farblösung.

Kurzes Abspülen in Wasser.

Kurzes Abspülen in absolutem Alkohol.

15 bis 20 Sekunden in Alkohol absolutus + Natronlauge.

Abspülen in Alkohol absolutus.

Abspülen in Wasser.

Wasser + Essigsäure 2 Minuten lang.

Schnelle Entwässerung.

Einbettung in Kanadabalsam.

Es gelang BOHNE, mit Hilfe dieser Methode schon 3 Stunden nach Empfang des Materials Schnitte zu untersuchen und die Diagnose innerhalb so kurzer Zeit zu stellen, wie sie bei keinem bisherigen Verfahren möglich war. Nach BOHNE finden sich die NEGRI'schen Körperchen im Ammonshorn am häufigsten in der Gegend, in welcher die Schichten der großen Ganglienzellen vom Ammonshorn und der Fimbriae zusammenstoßen. Die NEGRI'schen Körperchen waren oft sehr klein, ließen sich aber stets erkennen am besonderen Farbenton und an der intrazellulären Lage. Die vakuoläre Struktur hält BOHNE für die kleinen Formen nicht für charakteristisch, da er sie auch bei Kernkörperchen beobachten konnte. Er fand NEGRI'sche Körper von runder, ovaler, spindelförmiger Gestalt; ferner dreieckige, elliptische und birnförmige. Er konnte die von NEGRI und VOLPINO erhobenen Befunde über Einschlüsse der NEGRI'schen

Körperchen bestätigen. Die Kontrollversuche BOUTE'S umfassen die Gehirne von 50 normalen Hunden, bei denen niemals NEGRI'sche Körperchen nachgewiesen werden konnten. Die NEGRI-Körper sind also als spezifisch für Lyssa anzusehen. BOUTE macht mit Recht darauf aufmerksam, wie wichtig für sanitätspolizeiliche Maßnahmen und die Behandlung der Gebissenen die rasche Diagnosenstellung auf Wut durch positiven Nachweis der NEGRI-Körper gegenüber dem Tierversuch, der mindestens zirka 14 Tage dauert, ist.

Nach NEGRI u. a. treten die NEGRI-Körper bei sehr infektiösem Virus bereits am 10. und 11. Tage der Krankheit auf, während für gewöhnlich etwa der 13.—15. Tag als frühester Zeitpunkt anzunehmen ist. Betreffend der Natur der NEGRI-Körper hält der Entdecker das ganze Körperchen für das Protozoon, während VOLPINO erst den von NEGRI als Kern des Parasiten bezeichneten Teil für den Parasiten selbst ansieht, das ganze Körperchen dagegen für eine Reaktionserscheinung von seiten der Ganglienzellen.

Die NEGRI-Körperchen als die Wutparasiten zu erklären, ist indessen so lange verfrüht, als man nicht im Stande ist, ihr Fehlen in den Organteilen, die infektiös sind, wie z. B. im Rückenmark und im Speichel zu erklären und den Widerspruch zwischen ihrer Größe und der durch SCHÜDDER nachgewiesenen Filtrierbarkeit des Wutgiftes durch bakteriendichte Filter. Der letzte Punkt ist übrigens von verschiedenen Autoren (BERTARELLI, VOLPINO u. a.) diskutiert worden. Nach den Untersuchungen von HELLER ist der Lyssaerreger keinesfalls unter den Bakterien zu vermuten, da sich der Lyssaerreger morphologisch anders verhält als Bakterien. HELLER kommt zu der Überzeugung, daß ein Protozoon wahrscheinlich für die Entstehung der Tollwut haftbar zu machen ist, der verschiedene Entwicklungszyklen durchmacht. FROSCHE ist der Ansicht, daß auch für andere Infektionskrankheiten eine vielleicht weittragende Perspektive eröffnet wäre, wenn es bewiesen wäre, daß die NEGRI-Körper Protozoen sind.

Das Vorkommen der NEGRI-Körper bei Impfung mit Straßenvirus ist die Regel. Angaben über das Vorkommen derselben bei Virus fixe sind jedoch spärlich, wahrscheinlich deshalb, weil sie bei den nach Impfung mit diesem Virus eingegangenen Tieren sehr klein und schwer erkennbar sind, wie schon die Untersuchungen von NEGRI gezeigt haben.

Die NEGRI-Körper sind bis jetzt außer beim Menschen bei folgenden Tieren nachgewiesen: Hund, Katze, Rind, Pferd, Kuh, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Gans.

Meine eigenen auf Veranlassung von Herrn Professor KOLLE unternommenen Untersuchungen bezweckten, die NEGRI'schen Körperchen

bei einigen für Hundswut empfänglichen Tieren nachzuweisen, bei denen sie bisher nicht gefunden sind.

Die Präparate wurden folgendermaßen hergestellt:

1. Entnahme des Ammonshorns:

Vollständige Herausnahme des Gehirns.

Anlegen eines immer tiefer dringenden Längsschnittes auf dem hintern dorsalen Abschnitt der Hemisphäre mittelst eines ganz schmalen Skalpells, bis die Rundung des Ammonshorns sichtbar wird.

Vollständige Isolierung des Ammonshorns von den übrigen Hirnteilen.

Anlegen von 2 mm dicken Querscheiben desselben am besten mittels einer kurzen spitzen Schere.

2. Entnahme des Rückenmarkes:

Durchschneiden der Spinalnerven mit demselben schmalen Skalpell. Durchschneiden der Rückenmarkshäute der Länge nach mit schmalen gebogenem Skalpell.

Emporheben des Markes mit einer flachen Sonde, Abschneiden von 2—3 mm langen Stücken desselben mit der kurzen spitzen Schere. Hierauf:

Härtung der Stücke in reinem Azeton im Brutschrank eine Stunde lang.

Übertragung derselben unmittelbar in flüssiges Paraffin vom Schmelzpunkt 55° im Paraffinofen bei 58—59° mindestens 1½ Stunden. Einbettung in Paraffin.

Schneiden von 5 µ dünnen Schnitten.

Überbringen der Schnitte in Wasser von Zimmertemperatur. Direkte Aufnahme der Schnitte auf Objektträger, die gereinigt und mindestens eine halbe Stunde lang bei 200—300° gegläht wurden.

Das überschüssige Wasser abtropfen lassen. Legen der Objektträger oben auf den Paraffinofen, wo die Schnitte schon nach 7 bis 10 Minuten festkleben, ohne Anwendung von Gummi oder Eiweiß. Hierauf:

Behandlung der Schnitte nach O. LENTZ (Berlin).

Einbringen in Xylol (bis zur Lösung des Paraffins).

Einbringen in Alkohol absolutus (bis zur Entfernung des Xylols).

Färbung in Eosinlösung eine Minute lang. (Eosin extra Höchst 0,5; 60 proz. Äthylalkohol 100,0).

Abspülen im Wasserglas.

Färben in Methylenblau. Eine Minute lang (gesättigte alkoholische

Lösung von Methylenblau Höchst 30,0; 0,01 proz. Kalilauge 100,0).

Abspülen im Wasserglas.

Abtrocknen durch vorsichtiges Aufdrücken auf Fließpapier.

Differenzieren in alkalischem Alkohol, bis nur noch schwache Eosinfärbung erkenntlich ist. (Alkohol absolutus 30,0, 1 proz. Lösung von Natr. caustic. in Alk. abs. 5 Tropfen.)

Differenzieren in saurem Alkohol, bis das Blau noch gerade schwach erkenntlich ist. (Alk. abs. 30,0; 50 proz. Essigsäure 1 Tropfen.)

Abspülen in Alkohol absolutus.

Xylol, Kanadabalsam, Deckglas Ölimmersion.

Dieses Verfahren von O. LENTZ gibt ausgezeichnete Resultate. Jedoch ist darauf zu achten, daß die Temperatur des Paraffinofens 59° nicht übersteigt, da sonst die Stücke zu hart werden. Was speziell die Färbung anbelangt, so darf hier nicht schematisch verfahren werden, sondern es empfiehlt sich, während der Differenzierung von Zeit zu Zeit den Objektträger herauszunehmen und unter dem Mikroskop mit schwacher Vergrößerung zu prüfen, ob der richtige Grad der Differenzierung erreicht ist. Dies ist der Fall, wenn in den blaßblau gefärbten Ganglienzellen die NEGRI'schen Körperchen schon mit schwacher Vergrößerung als rote Pünktchen zu erkennen sind. Oft ist das Eosin schwer aus dem Schnitt zu entfernen. In diesem Fall färbt man den Schnitt noch einmal im Blau eine Minute lang und differenziert von neuem. Will man die Innenkörper gut erkennen, so beizt man das Präparat nach O. LENTZ nach der Färbung im Blau noch eine Minute lang mit LUGOL'scher Lösung, dann Abspülen in Wasser, Differenzierung in Methylalkohol, bis das Präparat ganz rot wird, Abspülen in Wasser, Nachfärben im Blau eine halbe Minute lang. Dann erst Differenzierung wie oben.

Die zu untersuchenden Tiere wurden zum Teil mit frischem Straßenvirus, zum Teil mit Passagenvirus infiziert. Von allen diesen werden hier nur diejenigen herausgegriffen, die mit Sicherheit an den Symptomen der paralytischen Hundswut starben. Die übrigen erkrankten nicht typisch oder gingen an einer interkurrenten Krankheit zugrunde.

1. Untersuchung eines Affen.

Ein großer *Macacus rhesus* wird mit frischem Straßenvirus geimpft. Im Anfang der Inkubationszeit zeigt er ein unverändertes Wesen. Im Gesicht scheint er etwas blaß zu werden. In der zweiten Woche fängt er dagegen an, sich in der Haltung zu verändern. Er bekommt nämlich Anfälle von Wut, wird bissig, hat starke Speichelsekretion und herunterhängenden Unterkiefer. Er sitzt zusammengekniet da, den Kopf auf die Brust gesenkt, in trauriger Stimmung. Während er vorher lebendig im Käfig herumging und sich auf die Stange setzte, ist er jetzt ruhig am Boden des Käfigs und blickt nicht auf beim Namensruf. Nach acht Tagen nimmt er keine Nahrung mehr zu sich und zeigt beginnende Lähmung in den Beinen und Armen, nimmt immer mehr eine liegende Stellung ein, in welcher er nach 14 Tagen nach all-

mählichem Erlöschen der Atembewegungen stirbt. Die am gleichen Tage vorgenommene Sektion ergibt nichts auffallendes. Sie zeigt den gewöhnlichen Befund eines Hundswutkadavers. Das Ammons-Horn wird nach der beschriebenen Methode sofort untersucht. Mit schwacher Vergrößerung wird die in die Fimbrie übergehende Partie der großen Randganglienzellschicht eingestellt. Mit Leichtigkeit erkennt man die NEGRI'schen Körperchen in sehr großer Zahl als kleine rote Pünktchen in den blaßblauen Ganglienzellen. Mit der Ölimmersion sieht man sodann typische NEGRI-Körper von karmoisin bis rosaroter Färbung (im Gegensatz zu der mehr zinnoberroten Farbe der Blutkörperchen) meist intrazellulär, daneben aber auch extrazellulär gelegene, mit deutlicher Innenkörperbildung. Die Form der NEGRI-Körper ist meist rundlich, doch findet man alle möglichen Formen, darunter auch ganz lange, fast stabförmige. Der Zellkern fast aller Ganglienzellen ist intakt. Die Negrikörper sind in der Ein- oder Mehrzahl in den Ganglienzellen eingeschlossen, an manchen Stellen sogar 4 rundliche nebeneinander in derselben Zelle. Interessante Bildungen weist die Innenstruktur dieser Körperchen auf (siehe Abbildung). Man sieht Ringe, Halbringe, Bogen, Punkte, die oft rosettenförmig gruppiert sind. Vereinzelt sieht man eine C-Figur, die bei genauer Betrachtung noch aus einzelnen Segmenten resp. Punkten zu bestehen scheint. Oder man erkennt einen kleineren Innenkörper, umgeben von einem größeren halbmondförmigen. Ein anderes Bild zeigt einen randständigen Innenkörper, welchen drei andere bogenartig umstehen. Daneben beobachtet man auch solche Innenkörperchen, wie sie die Abbildungen von O. LENTZ aufweisen. In den größeren Innenkörpern beim Affen kann man ferner deutlich hellere und dunklere Partien unterscheiden. Gerade diese beim Affen beobachteten Formen machen es viel mehr als die bei irgend einer anderen Tierart beobachteten wahrscheinlich, daß die Körperchen NEGRI's keine Zelldegenerationsprodukte, sondern Formen der Parasiten sind.

Es werden noch einige Rückenmarksquerschnitte untersucht mit negativem Erfolg.

2. Untersuchung eines Fuchses.

Ein männlicher Fuchs (*Vulpes vulgaris*) mit älterem Straßenvirus intracerebral geimpft. Während der Inkubation zeigt er nichts auffallendes. Allmählich wird er ruhig, läuft nicht mehr hin und her, legt sich nieder und verweigert vom neunten Tag an die Nahrung, nachdem er zuletzt noch etwas Stroh gefressen hatte. Die Beine werden

gelähmt, das Tier reagiert nicht mehr auf Anruf. Es liegt mit ausgestreckten Extremitäten da, die Atembewegungen werden immer kleiner, bis am 14. Tage nach der Impfung der Exitus erfolgt. Die Sektion zeigt keinen besonderen Befund. Im Magen findet man etwas Stroh nebst anderen Speiseresten. Das Ammonshorn wird sofort und genau wie beim Affen untersucht. Man erkennt zahlreiche NEGRI-Körper intrazellulär gelegen, mit Innenkörpern. Das Ganze schmiegt sich in einigen Zellen dem Zellkern an, welcher deutlich erhalten ist. Die NEGRI-Körper sind rosa gefärbt. Die Innenkörperbildung ist nicht sehr schön vorhanden, aber deutlich erkennbar.

Das Rückenmark wurde nicht untersucht.

3. Untersuchung von zwei Hamstern.

Hamster I (*Cricetus frumentarius*) wird mit Passagenvirus intracerebral geimpft. Anfangs zeigen sich keine Symptome, beim Klopfen auf den Käfig hebt er sich auf die Hinterbeine. Bald ist diese Position nicht mehr möglich, das Tier fällt auf die Seite, wenn es sich bücken will. Man beobachtet hier und da einen Gähnkrampf. Die Nahrung wird verweigert, die Lähmung der Beine wird vollkommen, das Tier liegt am Boden des Käfigs. Die Atmung wird immer kleiner, bis sie am 10. Tage ganz erlischt, das Tier ist tot. Die Sektion ergibt nichts besonderes. Es wird wie oben untersucht und man findet typische NEGRI-Körper mit blau gefärbten Innenkörperchen mäßig zahlreich, meist kleinere Formen. Das ganze NEGRI-Körperchen ist meist von einem schmalen hellen Hof umgeben.

Hamster II (*Cricetus frumentarius*) wird mit frischem Straßenvirus intrazerebral geimpft. Er verhält sich gleich wie der vorige während der ganzen Krankheit und stirbt nach 22 Tagen ebenfalls an den deutlichen Symptomen der paralytischen Wut. Die Sektion ergibt nichts besonderes. An der oben erwähnten Stelle im Ammonshorn sieht man überaus zahlreiche NEGRI-Körper, darunter sehr große, mit deutlichen Innenkörpern. Diese zeigen keine Besonderheiten.

Bei beiden Hamstern wird eine größere Zahl von Rückenmarksstücken untersucht und in denselben typische NEGRI-Körper gefunden von karmoisinroter Färbung, intrazellulärer Lagerung und mit Innenkörpern versehen. Schon auf Kaninchenrückenmarksschnitten hatte ich vereinzelte NEGRI-verdächtige Gebilde entdeckt. Da ich im Ammonshorn von Hamstern sehr schöne NEGRI'sche Körperchen sah, so hoffte ich im Rückenmark derselben die NEGRI-Körper auch deutlicher zu

Gesicht zu bekommen. Es wurden nun statt Querschnitten Längs- und Schrägschnitte angelegt, sodaß gleichsam eine große Zahl von Querschnitten zugleich überblickt werden konnte und es traten die NEGRI-Körper wirklich in der Mehrzahl auf und zwar fanden sich vorwiegend kleine und mittelgroße, aber auch vereinzelt große. Es ließ sich ferner deutlich beobachten, daß die Körperchen in einer Reihe senkrecht im Rückenmarkslängsschnitt übereinanderstehender Ganglienzellen enthalten waren. Es wurden 2 mm-lange Markstücke aus verschiedenen Segmenten entnommen, mit dem Mikrotommesser der Länge nach geschnitten, bis die graue Substanz in Gestalt eines oder zweier dunklen Längsstreifen auf dem Schnitt zum Vorschein kam.

Diese Untersuchungen liefern weitere Beweise für die Annahme, daß das NEGRI'sche Körperchen als etwas für *Lyssa* ganz spezifisches anzusehen ist. Die auffallend stark differenzierten und großen blauen Innenkörperchen, die beim Affen vorhanden waren, lassen vermuten daß es sich hier um eine Art Sporulation handelt, und daß die NEGRI-Körperchen nur eine Entwicklungsstufe des *Lyssa*-erregers darstellen. Gerade diese beim Affen erhaltenen Bilder machen die Annahme sehr unwahrscheinlich, daß die NEGRI'schen Körperchen Zellveränderungen sind. Das wird einleuchtend, wenn man mit den NEGRI-Körperchen des an Tollwut verendeten Affen z. B. die bei Hühnerpest von F. V. KLEINE und von STANDEUSS bei Staupe gefundenen Körperchen vergleicht. Bei diesen letzten beiden hat man ohne weiteres den Eindruck, daß sie etwas ganz anderes darstellen, als die NEGRI'schen Körper bei Wut. Sie ähneln vielmehr den Zelleinschlüssen, die bei Vaccine gefunden sind. (von PROVAZEK).

Bis jetzt hat man die NEGRI'schen Körperchen im Rückenmark vergeblich gesucht, trotzdem dieses sehr infektiös ist. Es mag wohl Zufall sein, daß dieselben bei den obigen Untersuchungen gerade beim Hamster entdeckt wurden. Jedenfalls sind dieselben im Rückenmark nicht sehr zahlreich. Vielleicht enthält dasselbe vorwiegend unsichtbar kleine Formen, die dem Rückenmark seine hohe Infektiosität verleihen.

Aus den vorgenommenen Untersuchungen kann ich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die NEGRI'schen Körperchen kommen außer bei den Tieren, wo sie bis jetzt gefunden wurden, noch vor im Ammonshorn von Affen, Füchsen und Hamstern, bei Hamstern auch außerdem noch im Dorsalmark.

2. Das Vorkommen der NEGRI-Körperchen hat diagnostischen Wert, indem der positive Nachweis derselben die Diagnose auf Tollwut bei den genannten Tieren sicherstellt.

3. Auch bei Affen, Füchsen und Hamstern lassen sich die NEGRI'schen Körperchen nach den bisher angewendeten Methoden färben. Die besten Resultate gibt aber die Färbungsmethode von O. LENTZ und sie hat den Vorteil, daß sie nur sehr kurze Zeit (höchstens drei Stunden) in Anspruch nimmt. Die LENTZ'sche Methode zeigt Differenzierungen und Strukturverhältnisse an NEGRI-Körperchen, wie sie mit keiner anderen bisher dargestellt worden sind.

4. Der Nachweis der NEGRI'schen Körperchen bei diesen Tieren hat großen Wert für die frühzeitige Einleitung der antirabischen Schutzimpfung der Gebissenen und für die sanitärpolizeilichen Maßnahmen.



16151

