HUMANPATHOGENE PILZE IM TIER- UND PFLANZENREICH

VORTRÄGE DER
5. WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG DER
DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
IN MÜNCHEN
AM 17. UND 18. JULI 1965

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HANS GÖTZ
KLINIKUM ESSEN DER RUHRUNIVERSITÄT BOCHUM

UND

DR. HANS RIETH
HAMBURG

MIT 82 TEXTABBILDUNGEN

1969
GROSSE VERLAG
BERLIN

Hautklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. med. P. JORDAN)

Mykosen als Modellinfektion im Tierexperiment

F. FEGELER und S. NOLTING, Münster

Mit 2 Abbildungen

Für die Überprüfung der Wirksamkeit neuer antimykotisch wirksamer Substanzen stehen bekanntlich 3 Möglichkeiten zur Verfügung. 1. In vitro Versuche. 2. Das Tierexperiment 3. Die klinische Prüfung. Die in vitro Versuche eignen sich vorwiegend als Screeningtest. Das Tierexperiment hat als in vivo Methode bereits klinischen Aussagewert. 3 Modellinfektionen, mit denen wir an der Klinik besondere Erfahrungen gesammelt haben, sollen im folgenden besprochen werden, und zwar die Candidiasis und Cryptococcose bei Mäusen und die Sporotrichose bei Ratten und Mäusen.

1. Experimentelle Candidiasis bei Mäusen

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, daß verschiedene Candidastämme – nicht nur die verschiedenen Candidaarten – eine unterschiedliche Pathogenität für Mäuse aufweisen. Überprüft man somit die Wirksamkeit eines Medikamentes und will einigermaßen gültige absolute Zahlen über die in vivo Wirksamkeit gewinnen, so ist es notwendig, mehrere unterschiedlich pathogene Candidastämme und aus verschiedenen Versuchsreihen den Mittelwert zu verwenden. Im allgemeinen genügt es jedoch, relative Zahlenwerte zu erhalten, insbesondere dann, wenn man die Wirksamkeit mehrerer Medikamente miteinander vergleicht. Aber auch hierbei sollte man die Pathogenität des verwendeten Stammes kennzeichnen, indem man die Keimzahl angibt, die bei einem bestimmten Infektionsmodus – intravenös, intraperitoneal oder subcutan – nach einer bestimmten Zeit letal wirkt oder bestimmte reproduzierbare Erscheinungen, z.B. Candidagranulome, hervorruft. Folgendes Beispiel möge dies demonstrieren.

In einem Vorversuch verwendeten wir 60 etwa 20 g schwere weiße Mäuse. Je 10 Mäuse wurden mit einer Keimzahl von 25 Mill., 50 Mill., 100 Mill., 200 Mill. und 400 Mill. intraperitoneal infiziert. Eine 100%ige Letalität war bei den mit 400 Mill. Keimen infizierten nach 5 Tagen, bei den mit 200 Mill. nach 11 Tagen, bei den mit 100 Mill. Keimen nach 21 Tagen, bei den mit 50 Mill. nach 30 Tagen und bei den mit 25 Mill. infizierten nach 1,5 Monaten zu beobachten (Tab. 1). Die 10 Kontrolltiere überlebten sämtlich die Versuchsdauer. Auf Grund des Ergebnisses dieser Voruntersuchung wurde bei späteren Versuchen eine Zahl von etwa 150 Mill. Hefezellen für die intraperitoneale Inokulation verwendet.

Tabelle 1. *Mittlere Überlebenszeit von Mäusen nach i. p. Inokulation einer unterschiedlichen Keimzahl von Candida albicans*

Anzahl der Hefezellen in Millionen	Mittlere Überlebenszeit in Tagen
400	5
200	11
100	21
50	30
25	45

2. Experimentelle Cryptococcose bei Mäusen

Während Candida albicans nur bedingt pathogen bei Mäusen ist und die Letalität in erheblichem Maße von der infizierten Keimzahl – speziell bei intraperitonealer Inokulation – abhängig ist, ist Cryptococcus neoformans auch bei intraperitonealer Inokulation weitaus pathogener für Mäuse.

Bei den Voruntersuchungen für die experimentelle Cryptococcose verwendeten wir 70 Mäuse. Je 10 wurden intraperitoneal mit 0,6, 1,2, 2,5, 5,0, 10,0 und 50,0 Mill. Zellen inokuliert. Die untere Grenze der Überlebenszeit der Tiere lag zwischen 10 und 13

Tabelle 2. *Mittlere Überlebenszeit von Mäusen nach i. p. Inokulation einer unterschiedlichen Keimzahl von Cryptococcus noeformans*

Anzahl der Hefezellen in Millionen	Mittlere Überlebenszeit in Tagen
50	8
10	16
5	18
2,5	17
1,2	17
0,6	18

Tagen. 18–20 Tage nach der Impfung waren die meisten Tiere eingegangen. 2–4 Tiere jeder Gruppe überlebten länger, jedoch nur wenige 28 Tage. Ein deutlicher Unterschied der Überlebenszeit im Mittel von der inokulierten Keimmenge war nur beim Vergleich der niedrigen Infektionsdosen (bis 10 Mill. Keime) und der höchsten (50 Mill. Keime) zu erkennen (Tab. 2). Die Überlebenszeit der einzelnen Tiere einer Gruppe schwankte jedoch erheblich, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß nicht die gesamte Keimmenge streng intraperitoneal, sondern ein Teil subcutan injiziert wurde. Nach Beobachtungen anderer Autoren (LEZINE, ZIMMERMANN und SCORVA) sowie auch eigenen, verläuft die subcutane Infektion mit Cryptococcus neoformans nicht letal. Für unsere experimentellen Versuche verwendeten wir auf Grund dieser Vorversuche 5 Mill. Keime intraperitoneal.

3. Experimentelle Sporotrichose bei Ratten und Mäusen

Während man bei Candida albicans und Cryptococcus neoformans eine relativ genau dosierte Anzahl von Hefezellen inokulieren kann, ist dies bei der Sporotrichose praktisch nicht möglich, da sich die Sporen schlecht

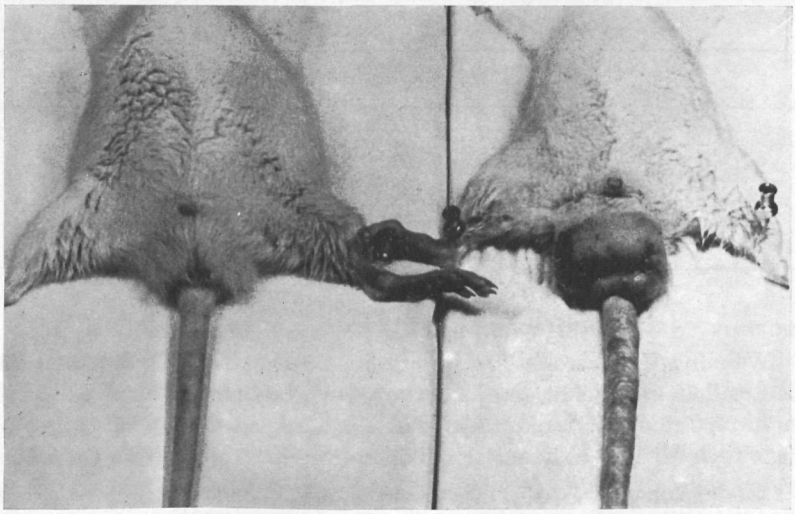

Abb. 1. Hodenschwellung und perlschnurartige Verdickung des Schwanzes bei einer mit Sporotrichon schenckii i. p. infizierten Ratte (re.). Li. Kontrolltier

von den Mycelfäden isolieren lassen. Auch bei der Hefephase gelingt dies nicht immer, ganz abgesehen davon, daß aus Läsionen bei menschlicher Sporotrichose der Erreger auf Kulturen nahezu immer in der Mycelphase wächst. Wir verwendeten daher für unsere experimentellen Versuche folgendes Verfahren: 3–4 Tage alte Sporotrichonkulturen in 2 %iger Traubenzuckerbouillon wurden im Ultra-Tourrax zerkleinert. Im Anschluß daran wurde die feine Suspension von Sporen und zerkleinerten Mycelfäden bei 1000 Umdrehungen 20 Minuten zentrifugiert. Der Bodensatz diente als Ausgangskonzentration für Verdünnungsreihen. Je 4 etwa 60–80 g schwere weiße Ratten und je 4 etwa 20 g schwere weiße Mäuse wurden mit 0,5 bzw. 0,2 ml einer möglichst konzentrierten, einer 20 %igen und einer 4 %igen Aufschwemmung des Bodensatzes in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal infiziert.

Am 8. Tage nach der Infektion waren die Hoden der infizierten Tiere im Vergleich zu den kontrollierten deutlich gerötet und stark geschwollen. Vom 10. Tage an traten perlschnurartige Verdickungen der Schwänze, teilweise auch knotige Verdickungen der Pfoten aller an Sporotrichose erkrankten Tiere auf (Abb. 1 und 2).

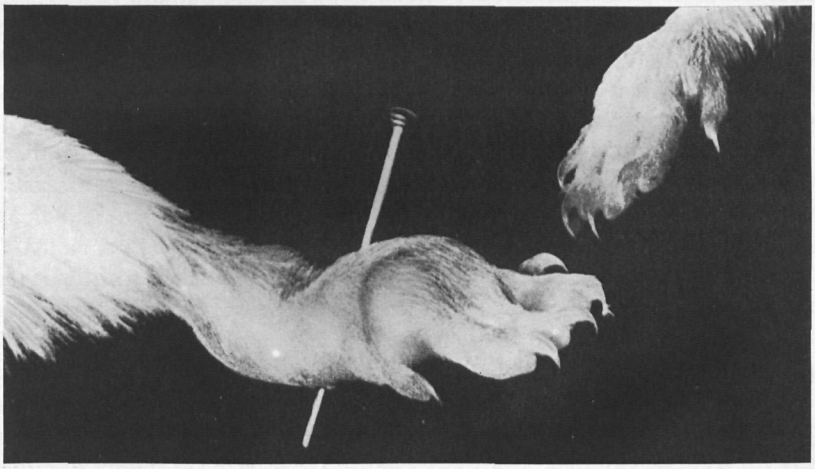

Abb. 2. Knotige Verdickung der Pfote

Sämtliche infizierten Ratten überlebten die Versuchsdauer von 60 Tagen. Die mittlere Überlebenszeit der mit konzentrierter, 20 %iger und 4 %iger Sporotrichonsuspension infizierten Mäuse war annähernd gleich. Dagegen ergaben sich starke Schwankungen in der Überlebenszeit der einzelnen Tiere. Während die Infektionen in den beiden erstgenannten Versuchsgruppen innerhalb eines Zeitraumes von 43 Tagen einen letalen Ausgang zur Folge hatten, betrug dieser Zeitraum in dem letzten Kollektiv nur 21 Tage. Dieses Ergebnis rechtfertigte die Verwendung der 4 %igen

Sporotrichonsuspension zur Erzeugung der experimentellen Mäusesporotrichose.

Bei der Verimpfung von Hodengewebe der infizierten Tiere auf Grütz-Agar wuchs an sämtlichen Impfstellen Sporotrichon schenckii. Ebenso überimpften wir bei der experimentellen Candidiasis Nierengewebe und bei der experimentellen Cryptococcose Hirngewebe, um nachzuweisen, daß tatsächlich eine Infektion erfolgt war und die Mäuse nicht auf andere Weise interkurrent eingegangen waren.

Zusammenfassung

Bei der Modellinfektion für die Überprüfung der Wirkung bestimmter Pharmaka sind gewisse Voraussetzungen zu beachten und Voruntersuchungen durchzuführen. Hierzu gehört besonders die Ermittlung der für die Inokulation geeignetsten Keimzahl, die eine gute Beurteilung des Behandlungseffektes ermöglicht. Sie ist für verschiedene Pilzstämme unterschiedlich. Geeignete Methoden für die Erzeugung einer Candidiasis, Cryptococcose und Sporotrichose bei Mäusen bzw. bei Mäusen und Ratten werden besprochen.

Prof. Dr. F. Fegeler, Oberarzt
Dr. S. Nolting
Hautklinik der Westfäl.
Wilhelms-Universität
44 Münster, v.-Esmarch-Str. 56