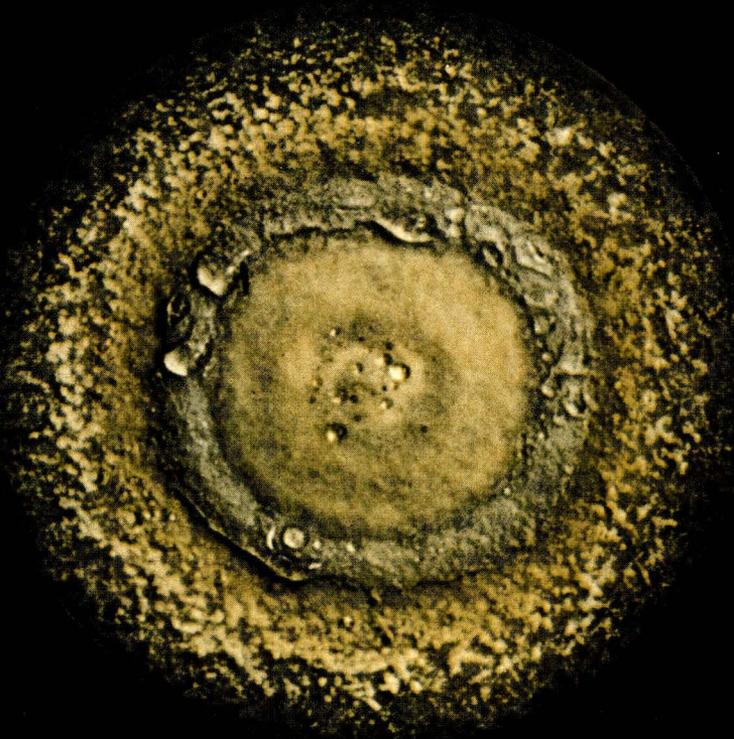


# mykosen

Herausgeber und Schriftleiter: Hans Götz, Essen, Heinz Grimmer, Wiesbaden  
Detlev Hantschke, Essen, Wolf Meinhof, München, Hans Rieth, Hamburg



7/1970

1. Juli

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover  
(Direktor: Prof. Dr. W. BISPING)

## Untersuchungen zum Verhalten von *Cryptococcus neoformans* in Erde

### II. Mitteilung: Langzeituntersuchungen zur Überlebensdauer von *Cryptococcus neoformans* in künstlich infiziertem Sand und in künstlich infizierter Gartenerde unter Außenweltbedingungen\*)

EMILIE WEILAND

Die Überlebensdauer von *Cryptococcus neoformans* (*Cr. n.*) in natürlich belebtem Erdboden ist von großer Bedeutung für die Epidemiologie der Kryptokokkose. Quantitative Untersuchungen zur Überlebensdauer von *Cr. n.* unter Außenweltbedingungen, die nach der uns zugänglichen Literatur bisher nicht vorliegen, wurden mit dem Ziel durchgeführt, zur Klärung der nicht einheitlich beurteilten Rolle von Erde in der Kryptokokkenepidemiologie (Literatur bei BÖHM u. Mitarb., 1969) beizutragen.

Nachdem STAIB (1963) große Widerstandsfähigkeit von *Cr. n.* gegen Austrocknung und hohe Temperaturen und jahrelange Überlebensdauer an sterilem Sand unter Laborbedingungen nachweisen konnte, interessierte, ob unter Bedingungen der Außenwelt (Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen während verschiedener Jahreszeiten) in unsteriler Gartenerde und parallel in nährstoffarmem, ebenfalls unsterilem Sand die gleichen Phänomene beobachtet werden könnten.

Da die Ursache der großen Austrocknungsresistenz in der starken Schleimkapsel von *Cr. n.* vermutet wird (STAIB, 1963), sollte der Einfluß dieses Merkmals auf die Überlebensdauer unter Außenweltbedingungen durch Verwendung eines stark und eines schwach bekapselten Stammes von *Cr. n.* geprüft werden.

#### Eigene Untersuchungen

Für die folgenden Untersuchungen wurden die *Cr. n.*-Stämme 43 a und 6 verwendet, die beide aus Taubenkot isoliert worden waren. Bei *Cr. n.* 43 a handelt es sich um den nahezu unbekapselten Stamm, bei *Cr. n.* 6 um den stark bekapselten. Die Anzucht von *Cr. n.* 43 a erfolgte auf Negersaat-Kreatinin-Antibiotika-Diphenyl (NKAD)-Agar, die Anzucht von *Cr. n.* 6 dagegen zur besonderen Stimulierung der Kapselbildung auf kreatininhaltigem Assimilationsagar (BÖHM, 1967).

Als Substrat, dem die *Cr. n.*-Stämme zugemischt wurden, dienten humusreiche Gartenerde aus einer Gärtnerei und zum anderen Sand aus Heidelandschaft.

Insgesamt wurden acht Versuchsgruppen angesetzt. In der ersten Gruppe wurden der Gartenerde eine Million *Cr. n.*-Zellen des Stammes 43 a je Gramm zugemischt; in der zweiten Gruppe wurden der Erde 100 000 *Cr. n.*-Zellen des gleichen Stammes je Gramm zugemischt. Die dritte Gruppe bestand aus einem Gemisch von Erde und einer Million *Cr. n.*-Zellen des Stammes 6 je Gramm. Die vierte Gruppe entsprach im Ansatz der dritten und enthielt abweichend nur 100 000 *Cr. n.*-Zellen von Stamm 6 je Gramm. Die fünfte bis achte Gruppe unterschieden sich von den ersten vier Gruppen lediglich im Substrat. Anstelle von Erde wurde hier Sand verwendet.

Da eine direkte Zumischung der frischen Kryptokokkenkultur zu Erde bzw. Sand aufgrund der Klebrigkeit der Sproßpilze keine homogene Verteilung innerhalb der Proben ergeben hätte, wurden die von den oben angegebenen Nährböden mit Hilfe eines Spatels abgenommenen Kryptokokken mit sterilem Seesand im Mörser innig vermischt und über 72 Stunden lang im Brutschrank an die Seesandkörner angetrocknet. Nach Feststellung des Gehalts an vermehrungsfähigen Kryptokokken in diesem Gemisch unter Anwendung des weiter unten beschriebenen Verfahrens erfolgte die Einstellung eines Sproßpilzgehalts von rund 1000 Millionen bzw. 100 Millionen Keimen/g durch Ver-

\*) Die Untersuchungen wurden dankenswerterweise durch Mittel des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten gefördert.

dünnen mit sterilem Seesand. Anschließend wurden trockene Erd- und Heidesandproben mit den an Seesand angetrockneten Sproßpilzen in Kunststoffflaschen intensiv durch ungefähr vier Minuten dauerndes, kräftiges Schütteln gemischt. Zu 990 g Erde bzw. Heidesand wurden jeweils 10 g des angetrocknete Kryptokokken enthaltenden Seesandes zugewogen. Als Versuchsgefäße für die Probengemische dienten Blumentöpfe, die in einem bodenlosen nach oben durch ein Drahtgitter abgedeckten Kasten in einem Gartengelände untergebracht wurden. Für jede Versuchsgruppe wurden 12 Töpfe eingesetzt und im Boden der Versuchsanlage eingesenkt.

Rückzuchtungsversuche wurden erstmals unmittelbar nach dem Ansatz der Gemische durchgeführt. Sie dienten der Kontrolle, ob die berechnete *Cr.n.*-Menge mit den Nachweismethoden erfaßt würde. Die 2. Kontrolle erfolgte zehn Tage nach Beginn der Untersuchungen. Weitere Kontrollen folgten nach ein, zwei, drei, vier, sechs, acht, zehn, zwölf und achtzehn Monaten.

Die Untersuchung von Proben auf den Gehalt an vermehrungsfähigen Kryptokokken wurde auf folgende Weise vorgenommen: Aus jeder Versuchsgruppe wurden während der ersten beiden Prüfungen je zwei Töpfe, bei den folgenden je ein Topf untersucht, wobei aber zwei Proben entnommen wurden. Bei der Probengewinnung wurden Anteile von der Oberfläche, der Mitte und der Tiefe der Töpfe in einem sterilen Mörser vermischt. Unter Verwendung eines Grammes dieser Gemische wurde mit einer Antibiotika enthaltenden physiologischen NaCl-Lösung (BÖHM und Mitarb., 1967) eine Verdünnung von 1 : 10 hergestellt. Anschließend wurde dieser Ansatz drei Stunden in einem Schüttelapparat gemischt. Nach kurzfristigem Absitzenlassen der groben Bestandteile wurde vom Überstand eine geometrische Verdünnungsreihe angesetzt, die anfangs bis zur Verdünnung  $10^{-10}$  geführt wurde, später bis zu  $10^{-5}$  beziehungsweise  $10^{-3}$ . Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,2 ml auf zwei NKAD-Agarplatten ausgespatelt. Parallel wurden Antibiotika-Diphenyl-haltige Bierwürze mit 0,2 ml jeder Verdünnung beimpft und zusätzlich zwei Labormäuse (Stamm NMRI/Han) mit je 0,5 ml jeder Verdünnung intraperitoneal infiziert.

Die weitere Bearbeitung der Kulturen und die Auswertung des Tierversuchs, erfolgte in der von BÖHM und Mitarb. (1967) angegebenen Art.

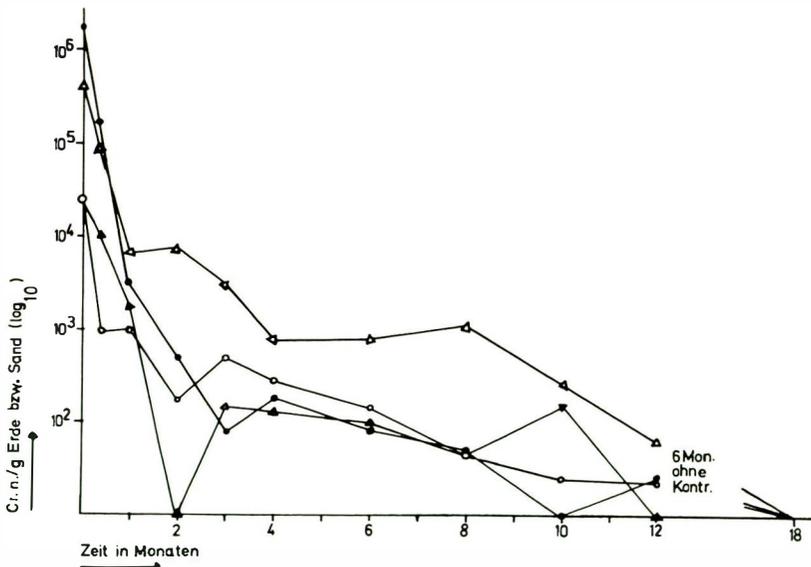


Abb. 1: Überlebensdauer von *Cr. n. 6* in Erde und Sand

- △ ——— △ Cr. n. 6 in Erde mit Anfangsgehalt an Cr. n. von ca. 1 Mill./g
- ——— ○ Cr. n. 6 in Erde mit Anfangsgehalt an Cr. n. von ca. 100 000/g
- ——— ● Cr. n. 6 in Sand mit Anfangsgehalt an Cr. n. von ca. 1 Mill./g
- ▲ ——— ▲ Cr. n. 6 in Sand mit Anfangsgehalt an Cr. n. von ca. 100 000/g

**Ergebnisse**

Die Erstkontrolle der *Cr. n.*-Sand bzw. *Cr. n.*-Erdgemische, die unmittelbar im Anschluß an die Herstellung erfolgte, ergab, daß der *Cr. n.*-Gehalt in der vorgesehenen Größenordnung nachweisbar war.

Bei beiden unterschiedlich bekapselten *Cr. n.*-Stämmen erfolgte rapide Abnahme der Zahl vermehrungsfähiger Kryptokokken von einigen Millionen bzw. 100 000en auf Werte um 1000/g bereits innerhalb der ersten beiden Beobachtungsmonate (vgl. **Abb. 1 und 2**). Die Anzahl der vermehrungsfähigen Kryptokokken war bei *Cr. n.* 6 unabhängig von der zugemischten Zellzahl und dem verwendeten Ausgangsmaterial nach zwölfmonatiger Versuchsdauer auf unter 100 Zellen pro Gramm Probe gesunken. Der Verlauf der Abnahme der Zellzahlen ist in **Abbildung 1** dargestellt. Die Kryptokokkenzahlen sind auf der Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Versuchsdauer in Monaten angegeben. Die Anzahl der in den Kurven aufgetragenen Symbole entspricht der Anzahl der durchgeführten Untersuchungen.

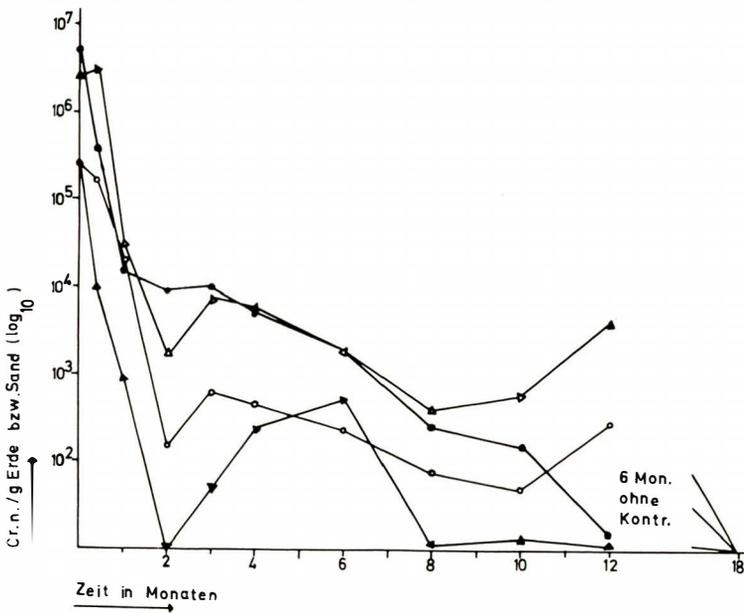


Abb. 2: Überlebensdauer von *Cr. n.* 43 a in Erde und Sand

- △ ——— △ Cr. n. 43 a in Erde mit Anfangsgehalt an *Cr. n.* von ca. 1 Mill./g
- ——— ○ Cr. n. 43 a in Erde mit Anfangsgehalt an *Cr. n.* von ca. 100 000/g
- ——— ● Cr. n. 43 a in Sand mit Anfangsgehalt an *Cr. n.* von ca. 1 Mill./g
- ▲ ——— ▲ Cr. n. 43 a in Sand mit Anfangsgehalt an *Cr. n.* von ca. 100 000/g

Bei *Cr. n.* 43 a (vgl. **Abb. 2**) verminderte sich die Menge an vermehrungsfähigen Kryptokokken in Sand innerhalb der ersten zwölf Beobachtungsmonate ebenfalls auf unter 100 Zellen je Gramm Material. In Erde dagegen lagen die *Cr. n.*-Zellzahlen bei den ein Jahr nach Versuchsbeginn durchgeführten Rückzuchtungsversuchen bei ungefähr 300 (Versuchsgruppe mit Anfangsgehalt an *Cr. n.* von 100 000/g) bzw. bei 3000 (Anfangsgehalt an *Cr. n.* eine Million/g) pro Gramm Probe und übertrafen damit die zwei Monate zuvor festgestellten Werte.

Achtzehn Monate nach Beginn der Untersuchungen wiesen die *Cr. n.*-Sand- bzw. *Cr. n.*-Erdgemische keine vermehrungsfähigen Kryptokokken mehr auf.

Während der ersten zwölf Beobachtungsmonate (Mai 1968 bis Mai 1969) herrschten folgende Witterungsbedingungen\*):

Die Durchschnittstemperaturen lagen bei 16° C im Mai und bei 22° C im Juni und Juli, bei 23° C im August.

Die höchsten Werte lagen bei 29,9° C. Die tiefste Durchschnittstemperatur herrschte mit 0,6° C im Dezember. Der tiefste Wert in Erdbodennähe (Februar 69) betrug -17,9° C. Insgesamt wurden im Winter 1968/69 104 Frosttage mit einem Temperatur-Minimum unter 0° C registriert.

Die durchschnittliche Niederschlagshöhe pro Beobachtungsmonat bewegte sich innerhalb des ersten Jahres zwischen 15,2 und 86,1 mm. Im 2. Beobachtungsjahr wurden extremere Klimaverhältnisse nachgewiesen. Es wurden Temperaturen bis zu 33° C gemessen, die Anzahl der Sommertage mit 25° C und mehr übertraf das langjährige Mittel. Die Niederschlagshöhe lag im Juni mit 106 mm ungewöhnlich hoch.

### Besprechung

Nach der bisher mit Nachdruck vertretenen Ansicht (EMMONS, 1955 und 1960; AJELLO, 1958) wird in Erde der primäre Standort von *Cr. n.* in der Natur gesehen. Von hier soll es sekundär, z. B. durch Windbewegung von an Erde angetrockneten Kryptokokkenzellen zur Besiedlung von Taubenkot kommen, der als optimaler Nährboden für *Cr. n.* angesehen wird. Trotz dieser Vorstellungen, die sich auf zahlreiche Isolierungen von *Cr. n.* aus Erde stützen (Literaturangaben siehe bei BÖHM und Mitarb., 1969), liegen bisher keine quantitativen Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit von *Cr. n.* unter Außenweltbedingungen in natürlich belebter Erde vor.

Aufschlüsse darüber, ob es sich bei *Cr. n.* um einen Erdbodensaprophyten handelt, der sich unter natürlichen Bedingungen der Außenwelt vermehren kann, sind nur aus quantitativen Untersuchungen zu gewinnen.

Über qualitative Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Cr. n.* in Erde und Sand wird verschiedentlich berichtet. So wies STAIB (1963) noch nach 480 Tagen lebensfähige Kryptokokken in künstlich infiziertem Sand und künstlich infizierter Erde nach, die im Anschluß an die Infektion mit Kryptokokken im Labor aufbewahrt wurden. Die Reisolierung aus Erde gelang jedoch nur in Proben, die vor der Infektion mit *Cr. n.* sterilisiert worden waren. Im sonnengetrockneten Flußsand betrug die Überlebensdauer von *Cr. n.* nach SEELIGER und STAIB (1966) über drei Jahre. SMITH u. Mitarb. (1964) wiesen in experimentell mit *Cr. n.* infizierter, zuvor sterilisierter Erde nach einjähriger Aufbewahrung des Kryptokokken-Erdgemisches bei Zimmertemperatur noch mäusepathogene Kryptokokken nach.

SWATEK und Mitarbeiter (1967) konnten *Cr. n.* über zwei Jahre aus natürlich infizierten Erdproben isolieren. McDONOUGH und Mitarb. (1966) hatten *Cr. n.* drei Jahre lang regelmäßig im Staub eines Wegrandes nachgewiesen, der in der Nähe von Taubenschlägen lag.

Mit Ausnahme der zuletzt zitierten Untersuchung, in der vermutlich der jahrelange *Cr. n.*-Nachweis durch Reinfektion des Geländes mit *Cr. n.*-haltigem Taubenkot erfolgte, wurden alle Untersuchungen an im Labor aufbewahrten trockenen Proben durchgeführt, wo *Cr. n.* aufgrund seiner Austrocknungsresistenz jahrlang überlebensfähig blieb. Der Einfluß verschiedener, wechselnder Witterungsfaktoren, insbesondere der Feuchtigkeit, blieb unberücksichtigt. Die zudem an sterilisierten Erd- oder Sandproben erhobenen Befunde sind für die Klärung der oben ausgeführten epidemiologischen Fragestellung von eingeschränkter Bedeutung, da in einem natürlich belebten Milieu völlig andere Verhält-

\*)) entnommen aus den Monatstabellen für Klimahauptstationen des Deutschen Wetterdienstes der Station Hannover-Flughafen

nisse herrschen. Hier ist der Sproßpilz den Einflüssen tierischer und pflanzlicher Mikroorganismen ausgesetzt, die ihn z. B. durch ihre Stoffwechselprodukte schädigen können oder mit ihm um die Nährstoffe konkurrieren.

Nachdem BÖHM und Mitarbeiter (1969) innerhalb des nachgewiesenermaßen mit *Cr. n.* infizierten Stadtgebietes von Hannover (BÖHM und Mitarb., 1967) zwar in 6 von 50 Erdproben aus Gegenden mit Taubenbesiedlung, dagegen in keiner von 120 Proben aus Gegenden ohne Taubenbesiedlung *Cr. n.* isoliert hatten, wurde bereits vermutet, daß zumindest unter den hiesigen Verhältnissen *Cr. n.* praktisch nicht als primärer Erdbodensaprophyt anzusehen ist. Der Verlauf der künstlichen Kryptokokkeninfektionen in natürlich belebter Erde und Sand unter Außenweltbedingungen unterstützt diese Vermutung. Wahrscheinlich erfolgte die Abtötung der Kryptokokken unter dem Einfluß der Witterungsveränderungen. Bereits LITTMAN und SCHNEIERSON (1959) vermuteten, daß der Gehalt an lebensfähigen Kryptokokken in Taubenkot in der Außenwelt durch Witterungseinflüsse vermindert wird. Nach den Untersuchungen von STAIB (1963) beruht die besondere Widerstandsfähigkeit von *Cr. n.* auf seiner Austrocknungsresistenz, die ihn z. B. dazu befähigt, auch hohe Temperaturen (100° C) zu tolerieren, während in feuchtem Milieu gehaltene Kryptokokken sehr schnell abstarben.

Wahrscheinlich bewirkte der ständige Einfluß wechselnder Witterungsfaktoren, insbesondere der ständige Wechsel zwischen trockenen und feuchten Perioden, möglicherweise im Zusammenhang mit der Wirksamkeit der in natürlich belebten Erd- und Sandproben vorhandenen Bodenflora und -fauna die beobachtete Verminderung der Zahl der dem Sand und der Erde zugemischten Kryptokokken. Die während der Versuchsdauer nachgewiesenen tiefen Temperaturen werden wahrscheinlich ohne besondere Bedeutung für die Überlebensdauer von *Cr. n.* gewesen sein, da nach CRAMER und MIX (1957) *Cr. n.*-Kulturen bei -18° C über 5 Jahre lebensfähig blieben.

Die Verwendung unterschiedlich bekapselter *Cr. n.*-Stämme wirkte sich nicht auf die Überlebensdauer der Kryptokokken aus, wie aufgrund der Untersuchungen von STAIB (1963) zunächst erwartet wurde. Der stark bekapselte Stamm zeigte sogar einen vergleichsweise rascheren Abfall der Zahl vermehrungsfähiger Zellen gegenüber dem nahezu unbekapselten Stamm.

Ebenso war ein Einfluß der verwendeten Substrate (Erde, Sand) auf die *Cr. n.*-Überlebensdauer nicht feststellbar.

Die drei parallel angewendeten Nachweismethoden für *Cr. n.* — Direktausstrich, Anreicherung in Bierwürze, Tierversuch in der Maus — wurden gleichzeitig durchgeführt, um die Chancen der Nachweisbarkeit beim Versagen eines der drei Verfahren zu erhöhen.

Während BÖHM und Mitarb. (1970) an künstlich mit *Cr. n.* infiziertem Seesand mit der Anreicherung in Würze optimale Nachweiserfolge hatten, die denen des Direktausstriches geringfügig und denen des biologischen Nachweisverfahrens in der Maus stärker überlegen waren, ergeben unsere Erfahrungen, insbesondere an künstlich infizierten Erdproben, bessere Ergebnisse mit dem Direktausstrichverfahren. Die Unterlegenheit des Mäuseversuchs wurde auch hier bestätigt. Trotz des Diphenylgehaltes im NKAD-Agar und in dem Anreicherungsmedium konnten bei den Kryptokokkenreisolierungsversuchen aus Erde Schimmelpilze nicht vollständig gehemmt werden. In der Regel war jedoch die Auswertung der Kulturversuche im Gegensatz zu den Erfahrungen von STAIB (1963), der wegen eines starken Mucorwachstums in vor der Infektion mit *Cr. n.* nicht sterilisierter Erde, keine Kryptokokken reisolieren konnte, ohne große Schwierigkeiten möglich.

Die Untersuchungsbefunde lassen zwar erkennen, daß *Cr. n.* über längere Zeit, mindestens über 12 Monate, auch unter wechselnden Witterungseinflüssen in der Außenwelt vermehrungsfähig bleiben kann. Die Überlebensfähigkeit ist jedoch zumindest unter den hiesigen klimatischen Bedingungen begrenzt, wie die mißlungenen Reisolierungsversuche

18 Monate nach Versuchsbeginn erwiesen haben. Die Befunde sprechen daher zumindest unter hiesigen Verhältnissen gegen die Bedeutung von Erde als primärem Standort von *Cr. n.*

### Zusammenfassung

Bei quantitativen Untersuchungen zur Überlebensdauer von *Cr. n.* unter Außenweltbedingungen wurde unter Verwendung von 2 Stämmen mit unterschiedlicher Bekapselung in künstlich infizierten natürlich belebten Erd- und Sandproben innerhalb von 12 Monaten ständige Verminderung des Gehalts an *Cr. n.* nachgewiesen. Nach 18 Monaten gelang in keiner Versuchsgruppe mehr der Nachweis vermehrungsfähiger Kryptokokken. Die Bedeutung von Witterungsfaktoren für die unter Außenweltbedingungen gegenüber Laborversuchen verminderte Überlebensdauer von *Cr. n.* wird diskutiert. Ein Einfluß der unterschiedlichen Bekapselung auf die Absterbegeschwindigkeit bestand nicht. Die Befunde werden als Unterstützung der Ansicht gewertet, daß unter den gegebenen Verhältnissen Erde nicht als primärer Standort von *Cr. n.* zu betrachten ist.

### Summary

In quantitative studies on the survival of *Cr. n.* under external environmental conditions 2 strains with differences in encapsulation were used. In artificially infected samples of soil and sand with natural flora a continuous decrease in the number of *Cr. n.* was demonstrated over a period of 12 months. After 18 months *Cryptococci* capable of multiplication were no longer demonstrated in any of the experimental groups. The importance of meteorological factors for the reduction of survival of *Cr. n.* under external environmental conditions — as compared with laboratory conditions — is discussed. Differences in encapsulation did not have any effect on the rate of survival. The findings are regarded as support for the view that under the conditions given soil cannot be termed the primary habitat of *Cr. n.*

### Literatur

1. AJELLO, L. (1958): Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. *Amer. J. Hyg.* 67, 72—77.
2. BÖHM, K. H., E. WEILAND, I. S. ABDALLAH und M. SASU: Untersuchungen zum Verhalten von *Cryptococcus neoformans* in Erde. 1. Vorkommen in Erde, Überlebensfähigkeit in Seesand, Leistungsvergleich unterschiedlicher Nachweismethoden. *Mycopath. mycol. appl.* (im Druck).
3. BÖHM, K. H., I. S. ABDALLAH, G. TRAUTWEIN und W. BISPING (1967): Nachweis von *Cryptococcus neoformans* in Taubenkot. *Zbl. Vet. Med. B* 14, 419—431.
4. CRAMER, CH. and A. J. MIX (1957): Deep freeze storage of fungus cultures. *Trans. Kansas Acad. Sci.* 60, 58—64.
5. EMMONS, C. W. (1955): Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Amer. J. Hyg.* 62, 227—232.
6. EMMONS, C. W. (1960): Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Pub. Health. Rep.* 75, 362—364.
7. LITTMAN, M. L. and S. S. SCHNEIERSON (1959): *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Amer. J. Hyg.* 69, 49.
8. McDONOUGH, E. S., L. AJELLO, R. J. AUSSHERMAN, A. BALOWS, J. T. McCLALLAN and S. BRINKMAN (1961): Human pathogenic fungi recovered from soil in an area endemic for North American blastomycosis. *Amer. J. Hyg.* 73, 75—83.
9. SEELIGER, H. P. R. und F. STAIB (1966): Klinisch-epidemiologische Probleme der *Cryptococcose*. *Fortschr. Med.* 84, 436—440.
10. SMITH, C. D., R. RITTER, H. W. LARSH and M. L. FURCOLOW (1964): Infection of white Swiss mice with airborne *Cryptococcus neoformans*. *J. Bact.* 87, 1364—1368.
11. STAIB, F. (1963): Zur Widerstandsfähigkeit von *Cryptococcus neoformans* gegen Austrocknung und hohe Temperaturen. *Arch. Microbiol.* 44, 323—333.
12. SWATEK, F. E., J. W. WILSON and D. T. OMIECZYNSKI (1967): Direct plate isolation method for *Cryptococcus neoformans* from the soil. *Mycopath. mycol. appl.* 32, 129—140.

Anschr. d. Verf.: Dr. EMILIE WEILAND, 3 Hannover, Bischofsholer Damm 15