

Institut für Pathologie der Krankenanstalten Gilead, Bielefeld/Bethel (Leiter: Dr. med. K. Dumke) (1)  
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene der Universität Göttingen  
(ehem. Leiter: Prof. Dr. med. W. Bommer) (2)

# Morphologisch-morphometrische Untersuchungen an der Rattenlunge bei experimenteller Pneumozystose

M. Leichsenring<sup>1</sup>, A. Kuhlencord<sup>2</sup>, W. Bommer<sup>2</sup>

## Einleitung

Die von CHAGAS 1909 zuerst im Rahmen einer Trypanosomiasis in Rattenlungen entdeckten (2), ein Jahr später auch von CARINI (1) beschriebenen Pneumozysten wurden 1912 von dem Ehepaar DELANOË als eigene Spezies abgegrenzt und *Pneumocystis carinii* genannt (5). 1942 beschrieben VAN DER MEER und BURG erstmals Pneumozysten in menschlichen Lungen (16). Als Erreger der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie der Frühgeborenen wurde *Pneumocystis carinii* erst 1952 von VANĚK und JÍROVEC erkannt (22). Wichtige Erkenntnisse über den Entwicklungszyklus der Pneumozysten und den Pathomechanismus der Lungenschädigung brachten elektronenmikroskopische Verlaufsuntersuchungen an der Lunge (15, 28) und Beobachtungen der Pneumozysten in einer Kultur embryonaler Lungenzellen (20).

Klinisch und pathologisch-anatomisch wird zwischen der klassischen oder epidemischen Pneumozystose (infantiler Plasmazell-Typ) und dem sporadischen Typ (child-adult type) bei Immunsuppression oder AIDS unterschieden (12).

Die von IVADY und PALDY zwischen 1958 und 1967 eingeführte Therapie mit Pentamidin konnte die hohe Letalität der Pneumozystose entscheidend senken (13, 14). Die tierexperimentellen Untersuchungen zur Therapie mit Trimethoprim und Sulfonamiden (8) sowie die routinemäßige Einführung von Trimethoprim und Sulfonamiden in die Therapie und Prophylaxe waren ein weiterer Fortschritt bei der Bekämpfung der Pneumozystose (11). Anfang der 80er Jahre kam es mit dem Auftreten der Immunschwäche AIDS zu einem erneuten Anstieg der Erkrankungszahlen. Die Pneumozystose wurde zur häufigsten opportunistischen Infektion bei AIDS-Patienten. Auch bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie sowie angeborenen Immundefekten ist die Pneumozystose eine gefürchtete Komplikation.

Nach erfolgreicher Einführung der Aerosol-Prophylaxe mit Pentamidin bei AIDS (17) wurde vermehrt über extrapulmonale Manifestationen der Pneumozystose berichtet (4).

Die Verdachtsdiagnose einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie (PcP) wird meist klinisch und/oder radiologisch gestellt. Laborbefunde erbrachten bisher keine charakteristischen Ergebnisse (29); serologische Untersuchungsbefunde haben für die Diagnostik wenig Bedeutung (25). Beweisend ist ausschließlich der direkte Erregernachweis in Biopsiematerial und/oder Lavageflüssigkeit.

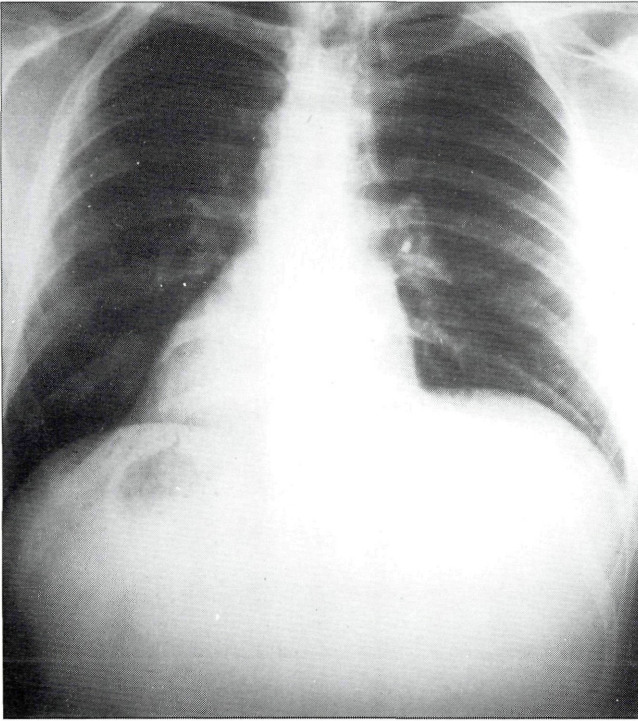


Abb. 1 A:

*Pneumocystis carinii*-Pneumonie (Frühstadium)

Als klinisch-diagnostische Methode der Wahl ist auch nach neueren Untersuchungen die Bronchiallavage anzusehen (21).

Spezifische radiologische Befunde für die PcP gibt es nicht. In einem Teil der Fälle zeigt sich ein Verlauf mit zu Beginn diffuser bilateral entwickelter, perihilar akzentuierter, interstitieller Pneumonie (Abb. 1A), die sich über ein retikulonoduläres Bild radiär in die Lungenperipherie ausbreitet und zuletzt ein diffuses Bild zeigt („weiße Lunge“) (Abb. 1B). In einem großen Teil der Fälle finden sich allerdings eher atypische Verlaufsformen (6).

In der Ratte, als etabliertem Tiermodell für die PcP, wurde die Verteilung der Pneumozysten in der Lunge in Abhängigkeit vom Schweregrad der Infektion untersucht.

## Material und Methoden

### Induktion der Pneumozystose

Nach Erprobung der in der Literatur beschriebenen Standardverfahren (8, 27) zur Erzeugung einer Pneumozystose im Tiermodell (Ratte) wurde ein modifiziertes Versuchsregime in Anlehnung an die Untersuchungen von HENDLEY und WELLER benutzt (10). Statt einer mehrmaligen wöchentlichen subkutanen Injektion von Kortisonazetat wurde eine orale Immunsuppression mit Dexamethason im Trinkwasser vorgenommen. Die Konzentration von 1 mg/l Trinkwasser entsprach bei einer mittleren Trinkmenge von 20 - 30 ml/Tag einer Dosis von 1,0 bis 1,5 mg Dexamethason/kg/Tag,

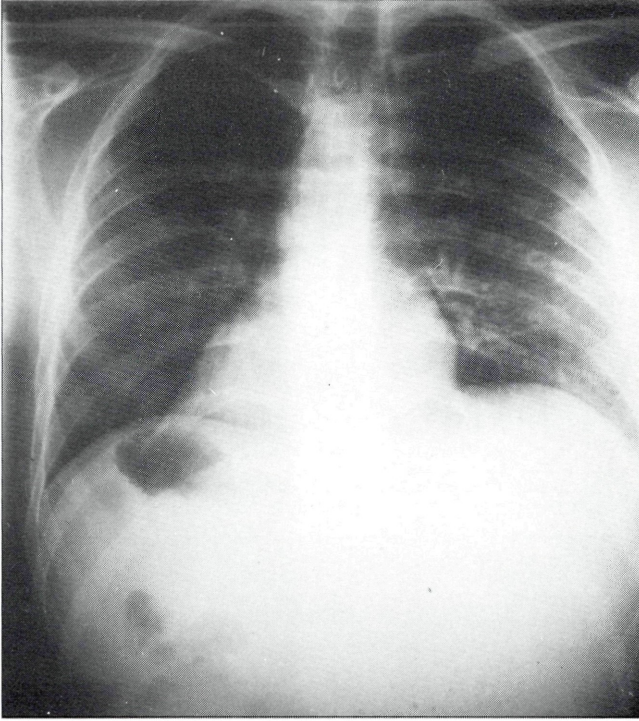


Abb. 1 B:

*Pneumocystis carinii*-Pneumonie (Spätstadium)

äquivalent einer Dosis von ca. 30 mg Kortisonazetat/kg/Tag. Eine Antibiotikaprophylaxe erfolgte mit Tetrazyklin im Trinkwasser in einer Konzentration von 1 g/l (Tab. 1).

#### Nachweis der Pneumozysten

Zum Nachweis der Pneumozysten wurden histologische Sagittalschnittpräparate von Rattenlungen nach GROCOTT gefärbt (9) und bei 1.000facher Vergrößerung mit Ölimmersion ausgewertet.

Die semiquantitative Bewertung des Pneumozystenbefalls in der Lungenhistologie erfolgte ebenfalls an diesen Sagittalschnitten. Es wurden die Anzahl der Pneumozysten/Gesichtsfeld bei 1.000facher Vergrößerung bestimmt und eine Einteilung in fünf Schweregrade vorgenommen (Tab. 2).

#### Morphologisch-morphometrische Methodik

Die Verteilung der Pneumozysten in der Rattenlunge wurde mit einem stereologischen Verfahren (26) untersucht. Bei 34 ausgewählten histologischen Sagittalschnitten von Rattenlungenpräparaten, mit einem mäßigen bis schweren Befall durch *Pneumocystis carinii*, wurden acht Untersuchungsfelder im Kerngebiet (3 - 5 mm vom Parenchymrand entfernt) sowie acht Untersuchungsfelder in der Mantelregion der Lunge (ca. 1 mm vom Parenchymrand entfernt) markiert (Abb. 2).

Bei 250facher Vergrößerung wurden 16 Untersuchungsfelder je Lungenschnittpräparat fotografiert (Ilford PanF ISO 50/180 mit Grünfilter, Mikroskop Zeiss III RS) und nach Entwicklung sowie Rahmung der Negative mit einem Tisch-Dia-Projektor (Kindermann

TABELLE 1

**Versuchsregime zur Erzeugung einer Pneumozystose**

|                                                            |                     |
|------------------------------------------------------------|---------------------|
| Versuchstiere: Wistar Albino Ratten.                       |                     |
| Immunsuppression mit Dexamethason (1,0 mg/l Trinkwasser)   | 0,02 - 0,030 mg/Tag |
| Antibiotikaprophylaxe mit Tetrazyklin (1 g/ml Trinkwasser) | 20 - 30 mg/Tag      |
| Futter:                                                    |                     |
| Proteinmangeldiät (Proteingehalt 8%)                       | ad libitum          |
| Trinkwasser                                                | ad libitum          |
| Alle Versuchstiere in Einzelkäfigen.                       |                     |
| Gewichtskontrolle alle vier Wochen.                        |                     |
| Versuchsdauer ca. 4 Monate.                                |                     |

TABELLE 2

**Semiquantitative Bestimmung des Pneumozystenbefalls**  
 (Anzahl Pneumozysten/Gesichtsfeld bei 1000facher Vergrößerung)

|             |   |       |                   |
|-------------|---|-------|-------------------|
| keine       | = | 0     |                   |
| 0,01 - 0,06 | = | +     |                   |
| 0,07 - 2,5  | = | ++    |                   |
| 2,6 - 12,5  | = | +++   | mäßiger Befall    |
| 12,6 - 24   | = | ++++  |                   |
| > / = 25    | = | +++++ | schwerster Befall |

diafocus AV 150) in ca. 5,2facher Vergrößerung dargestellt. Die Auszählung der Pneumozysten erfolgte mit einem 0,5 cm Raster.

Die Pneumozysten stellen sich hierbei als rundliche Aufhellungsareale mit zentraler Abblassung dar (Abb. 3A), die Pilze lassen sich als schlauchförmige mehr homogen aufgehellte Strukturen gut von den Pneumozysten abgrenzen (Abb. 3B).

## Ergebnisse

### Erzeugung einer Pneumozystose

Bei allen Versuchstieren konnte mit dem eigenen Versuchsregime eine Pneumozystose induziert werden. Der Befall mit Pneumozysten lag zwischen Grad + und +++++ (entsprechend der Skalierung) bei einer Versuchsdauer von mindestens vier Monaten. Einzelne Ratten wiesen gleichzeitig auch eine Pilzinfektion der Lunge auf.

### Verteilung der Pneumozysten in der Lunge

Beim Vergleich der Pneumozystendichte in Kern- und Mantelregion der Lunge zeigt sich unter Berücksichtigung aller Präparate mit einem Befall von Grad +++ bis Grad +++++ (n = 34) kein signifikanter Unterschied (Abb. 4A). Bei Unterteilung in Lungen mit mittlerem Befall (Grad +++ [n = 19]) sowie mit schwerem und schwerstem Befall (Grad ++++ und +++++ [n = 15]) ergab sich ein differentes Bild. In Lungen mit einem mäßigen Pneumozystenbefall (Grad +++) fanden sich signifikant (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen) mehr Pneumozysten in der Kernregion der Lunge als in der Mantelregion (Abb. 4B). Bei einem Befall Grad ++++ und +++++ konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

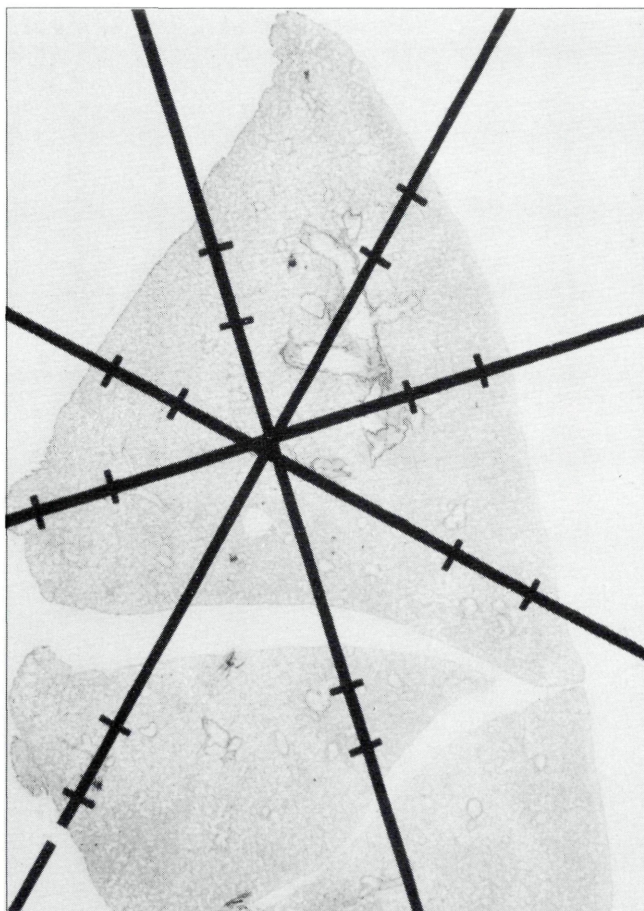


Abb. 2:

Bestimmung der Untersuchungsfelder am Sagittalschnitt einer Rattenlunge

## Diskussion

Das angewandte Tierversuchsmodell zur Erzeugung einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie erwies sich als ebenso erfolgreich wie die bekannten Standardverfahren (8, 10). Eine Pneumozystose ließ sich in allen Fällen hervorrufen. Eine Zweitinfektion mit Pilzen war selten. Das vorliegende Versuchsmodell ist aufgrund der langen Überlebenszeit der Versuchstiere (mindestens 4 Monate) offenbar auch für Langzeituntersuchungen geeignet. Insbesondere im Hinblick auf Untersuchungen zum Grad der Pneumozystenelimination aus der Lunge unter Therapie bzw. nach Abbrechen der Immunsuppression könnte das vorgestellte Modell von Nutzen sein (3).

Das eigene semiquantitative Score-System erlaubt eine ausreichende Differenzierung von einem minimalem Befall mit weniger als einer Zyste pro Gesichtsfeld. Bei anderen in der Literatur beschriebenen Skalierungen zur Bestimmung des Befalls mit Pneumozysten (18) wurde die Anzahl der Pneumozysten pro Gewichtseinheit Lungenparenchym bestimmt. Dies ist allerdings ein relativ aufwendiges Verfahren und das Untersuchungsmaterial steht für weitere morphologische Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

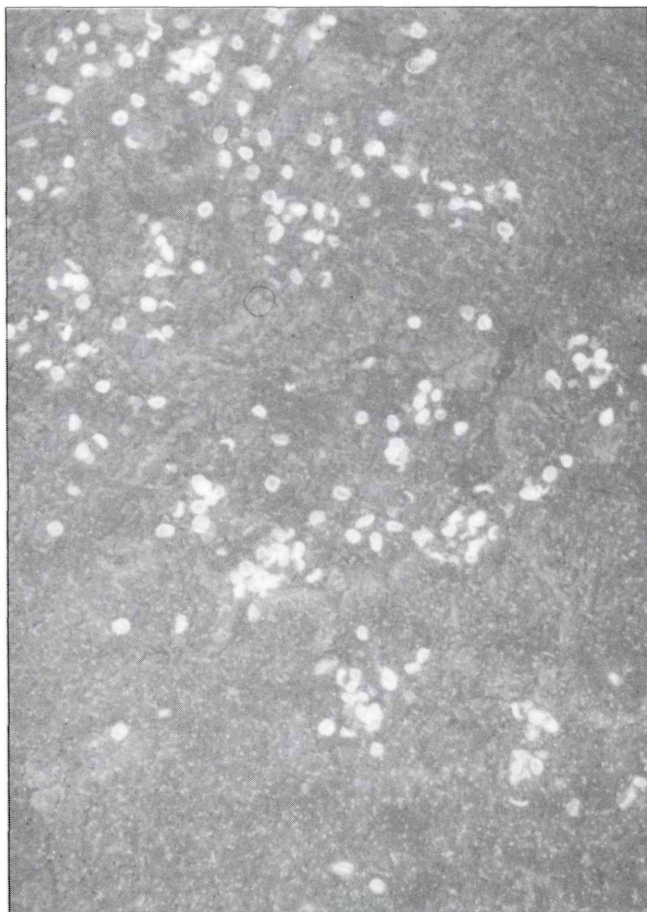


Abb. 3 A:  
Pneumozysten im Lungenparenchym (Negativ)

Bei einem nur geringen Befall der Lunge mit Pneumozysten (Grad +) ist die klinische Bedeutung dieses Befundes oft unklar. Im konkreten Fall ist die Entscheidung zwischen behandlungsbedürftiger Infektion oder Saprophytose schwer und nur unter Berücksichtigung des klinischen Bildes möglich. In diesen Zusammenhang stellt sich auch die Frage nach der Vitalität der nachgewiesenen Erreger, z. B. nach vorausgegangener Therapie (7).

Die eigenen Untersuchungsergebnisse am Tiermodell zeigen eine besondere Verteilung der Pneumozysten in der Lunge der Versuchstiere in Abhängigkeit vom Grad der Infektion. Mit Hilfe der beschriebenen stereologischen Methode konnte an Rattenlungen mit einem mäßigen Pneumozystenbefall (Grad +++) eine statistisch signifikante, disproportionale Verteilung der Pneumozysten zugunsten der Kernregion nachgewiesen werden. Bei zunehmendem Befall der Lunge durch Pneumozysten (Grad ++++ bis ++++++) fand sich dieser Unterschied zwischen Kern- und Mantelregion nicht mehr, es lag eine homogene Verteilung vor.

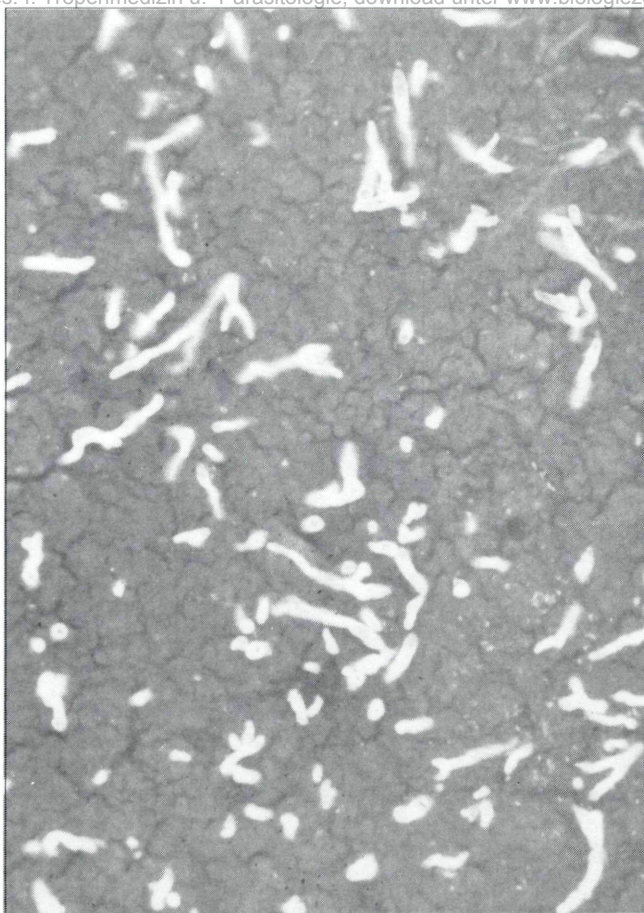


Abb. 3 B:

Pilze im Lungenparenchym (Negativ)

Ein Vergleich dieser Befunde an der Rattenlunge mit der menschlichen Pneumozystose ist problematisch. Einerseits sind die physiologischen Bedingungen in der Lunge des Menschen infolge des aufrechten Ganges nicht vollständig mit denen in der Ratte vergleichbar, andererseits muß beim Menschen zwischen der klassischen epidemischen und der sporadischen bzw. experimentellen Form unterschieden werden.

Der Vergleich mit der menschlichen Lunge ist nur über den röntgenologischen Befund möglich, wobei einschränkend erwähnt werden muß, daß das Infiltrat im Röntgenbild natürlich nicht direkt mit der Erregerdichte im Lungengewebe korreliert.

Während die eigenen Untersuchungen an der Rattenlunge eine kontinuierliche Ausbreitung der Erreger von perihilär in die Lungenperipherie nahelegen, sind die Verhältnisse im Röntgenbild der menschlichen Lunge weniger einheitlich. Berichte über einen stadienhaften Verlauf und eine Ausbreitung des Infiltrates in die Lungenperipherie bei der infantilen Pneumozystose zeigen gewisse Parallelen zu den Befunden im eigenen Modell (19).

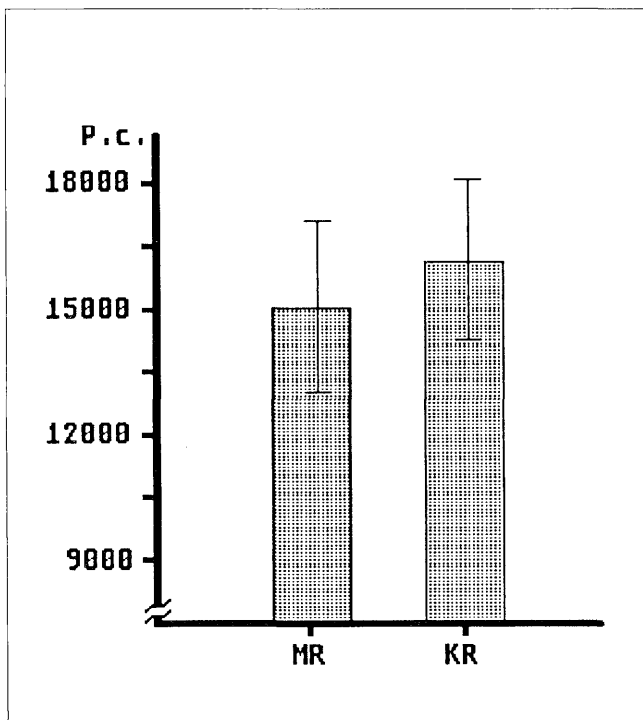


Abb. 4 A:

Verteilung der Pneumozysten (P. c.) zwischen Kern (KR)- und Mantel (MR)-Region bei einem Befall Grad +++ bis +++++ (34 Präparate)

Andere Autoren (6) wiesen auf eine große Zahl atypischer röntgenologischer Bilder oder Verlaufsformen mit einem nur segmentalen oder fokalen Befall hin (23). Ein typischer Verlauf der infantilen Form der Pneumozystose im Röntgenbild konnte in einer weiteren Untersuchung von 124 Fällen nicht dokumentiert werden (24).

Die unterschiedlichen röntgenologischen Befunde bei der menschlichen Pneumozystose lassen eine vom Grad der Infektion abhängige Verteilung der Pneumozysten in der Lunge, wie im vorgestellten Tiermodell, bzw. einen stadienhaften Verlauf der Erkrankung nur in wenigen Fällen vermuten.

## Zusammenfassung

Mit einem effektiven Versuchsverfahren (orale Medikation von Dexamethason und Tetrazyklin) wurde eine Pneumozystose im Tiermodell (Ratte) erfolgreich induziert. Das vorliegende Versuchsmodell ist aufgrund der langen Überlebenszeit der Versuchstiere (mindestens 4 Monate) offenbar für Langzeituntersuchungen geeignet. In 34 histologischen Lungensagittalschnitten wurde bei einem mäßigen bis schweren Pneumozystenbefall die Verteilung der Zysten in Lungenmantel- und Kernregion untersucht. Bei einem mäßigen Pneumozystenbefall fand sich ein signifikanter Unterschied zugunsten der Lungenkernregion, welcher mit zunehmendem Befall nicht mehr nachweisbar war. Die unterschiedlichen röntgenologischen Befunde bei der menschlichen Pneumo-

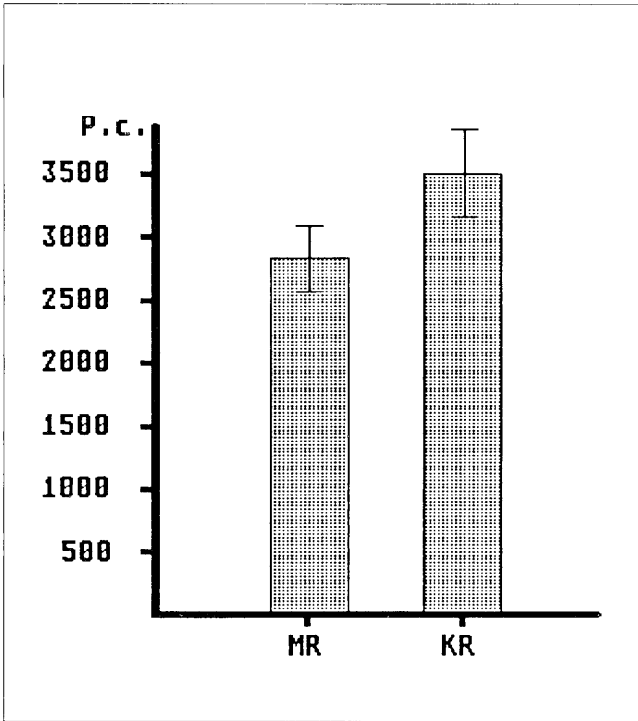


Abb. 4 B:

Verteilung der Pneumozysten (P. c.) zwischen Kern (KR)- und Matel (MR)-Region bei einem Befall Grad +++ (19 Präparate)

zystose lassen eine vom Grad der Infektion abhängige Verteilung der Pneumozysten in der Lunge, wie im vorgestellten Tiermodell, bzw. einen stadienhaften Verlauf der Erkrankung nur in wenigen Fällen vermuten.

### Schlüsselwörter

*Pneumocystis carinii*, Induktion, Verteilung in der Lunge.

### Summary

#### Morphological-morphometric examination of rat lungs in experimental pneumocystosis

*Pneumocystis carinii* pneumonia was induced in an experimental animal model, using oral medication of Dexamethasone and Tetracycline. Because of the long survival of the animals in this course (over 4 months), the documented regime might be useful in long term studies. In 34 histologic slides of sagittal sections of the lung with a moderate to severe infection of *Pneumocystis carinii*, the distribution of cysts in the core and coat of lung was examined. In cases with moderate infection there was a significant difference in favour of the core region. With increasing severity of infection this difference disappears. The radiographic findings in human pneumocystosis do not show a similar regular development of the disease of distribution of *Pneumocystis carinii*, as it is found in the animal model.

## Key words

*Pneumocystis carinii*, induction, distribution in lung.

## Literatur

1. CARINI, A. (1910):  
Formas de eschizogonia do Trypanosoma Lewisii.  
Comm. a Soc. de Med. de S. Paulo 16 de Augusto de 1910.
2. CHAGAS, C. (1909):  
Nova tripanomiaz humana.  
Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.
3. D'ANTONIO, R. G., JOHNSON, D. B., WINN, R. E., VanDELLEN, A. F., EVANS, M. E. (1986):  
Effects of folinic acid on the capacity of trimethoprim-sulfamethoxazole to prevent and treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats.  
Antimicrob. Agents Chemother. 29, 327-329.
4. DAVEY, R. T., MASUR, H. (1990):  
Recent advances in the diagnosis, treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia.  
Antimicrob. Agents Chemother. 34, 499-504.
5. DELANOÉ, M., DELANOÉ, P. (1912):  
Sur les rapports des cystes de Carini du poumon des rats avec le Trypanosoma lewisi.  
C. R. Acad. Sci. Paris 155, 658-660.
6. DOPPMANN, J. L., GEELHOED, G. W.:  
Atypical radiographic features in *pneumocystis carinii* pneumonia.  
In: Robbins, B., DeVita, V. T. Jr., Dutz, W. (ed.): Symposium on *Pneumocystis carinii* Infection.  
National Cancer Institute, Monograph 43, Bethesda NIH, 1976.
7. EL-SADR, W., SIDHU, G. (1986):  
Persistence of trophozoites after successful treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia.  
Ann. Int. Med. 105, 889-890.
8. FRENKEL, J. K., GOOD, J. T., SCHULTZ, J. A. (1966):  
Latent *Pneumocystis carinii* infections in rats, relapse and chemotherapy.  
Lab. Invest. 15, 1559-1577.
9. GROCOTT, R. G. (1955):  
A stain for fungi in tissue sections and smears.  
Am. J. Clin. Pathol. 25, 975-979.
10. HENDLEY, J. O., WELLER, T. H. (1971):  
Activation and transmission in rats of infection with *Pneumocystis*.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 1401-1404.
11. HUGHES, W. T., McNABB, P. C., MAKRES, T. D., FELDMAN, S. (1974):  
Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment for *Pneumocystis carinii* pneumonitis.  
Antimicrob. Agents Chemother. 5, 289-293.
12. HUGHES, W. T.:  
Clinical manifestations.  
In: Hughes, W. T. (ed): *Pneumocystis carinii* pneumonitis.  
CRC Press, Inc., Boca Raton, 1987.
13. IVADY, G., PALDY, L. (1958):  
Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit fünfwertigem Stibium und aromatischen Diamidinen.  
Mschr. Kinderheilk. 106, 10-14.
14. IVADY, G., PALDY, L., KOLTAY, M., TOTH, G., KOVACS, Z. (1967):  
*Pneumocystis carinii* pneumonia (Letter to the editor).  
Lancet 1967, i, 616-617.
15. MATSUMOTO, Y., YOSHIDA, Y. (1984):  
Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complex and meiotic nuclear divisions observed in precysts.  
J. Protozool. 31, 420-428.

16. VAN DER MEER, G., BRUG, S. L. (1942):  
Infection à *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux.  
Ann. Soc. Belge Med. Trop. 22, 301-307.
17. MERZ, B. (1988):  
Aerosolized pentamidine promising in pneumocystis therapy, prophylaxis (news).  
JAMA 259, 3223-3224.
18. OGINO, K. (1978):  
*Pneumocystis carinii*: experimental pulmonary infection in rats.  
Jpn. J. Parasitol. 27, 77-89.
19. PALDY, L., IVADY, G.:  
Roentgenologic diagnosis of interstitial plasma cell pneumonia in infancy.  
In: Robbins, B., DeVita, V. T. Jr., Dutz, W. (ed.): Symposium on *Pneumocystis carinii* Infection.  
National Cancer Institute, Monograph 43, Bethesda NIH, 1976.
20. PIFER, L., HUGHES, W. T., MURPHY, M. J., (1977):  
Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro.  
Pediatr. Res. 11, 305-316.
21. TEUSCHER, A. W., OPRAVIL, M., SPEICH, R., KUSTER, H., SIEGENTHALER, W., RUSSI, E. W.,  
LÜTHY, R. (1992):  
Diagnose und Verlauf nach Ausschluß einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie bei HIV-Infizierten.  
Dtsch. Med. Wschr. 117, 1052-1056.
22. VANĚK, J., JIROVEC, O. (1952):  
Parasitäre Pneumonie. „Interstitielle“ Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch  
*Pneumocystis carinii*.  
Zbl. Bakt. I. Abt. Org. 158, 120-127.
23. VESSAL, K., POST, C., DUTZ, W., BANDARIZADEH, B. (1974):  
Roentgenographic changes in infantile *Pneumocystis carinii* pneumonia.  
Am. J. Roentgenol. Rad. Ther. Nucl. Med. 120, 254-260.
24. VESSAL, K., DUTZ, W., KOHOUT, D. E., POST, C. (1976):  
Verlaufskontrolle der Pneumozystose im Roentgenbild.  
Radiologie 16, 38-42.
25. WALZER, P. D., RUTHEDGE, M. E. (1981):  
Humoral immunity in experimental *Pneumocystis carinii* infection.  
In: Serum and bronchial lavage fluid antibody responses in rats.  
J. Lab. Clin. Med. 97, 820-833.
26. WEIBEL, E. R.:  
Stereological Methods.  
Academic Press, London, 1979.
27. WELLER, R. (1955):  
Zur Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch.  
Z. Kinderheilk. 76, 366-378.
28. YONEDA, K., WALZER, P. D. (1981):  
Mechanism of pulmonary alveolar injury in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat.  
Br. J. Exp. Path. 62, 339-346.
29. YOUNG, L. S.:  
V. Laboratory findings.  
In: Young, L. S. (ed.): *Pneumocystis carinii* pneumonia.  
Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.

#### KORRESPONDENZADRESSE:

M. Leichsenring  
Institut für Pathologie, Krankenanstalten Gilead, Bielefeld/Bethel  
Remterweg 2  
D-W 4800 Bielefeld 13 · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Leichsenring M., Kuhlencord A., Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Morphologisch-morphometrische Untersuchungen an der Rattenlunge bei experimenteller Pneumozystose. 139-150](#)