

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 7—12

Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München

# Sinn, Technik und Aussage von Tierexperimenten bei der Identifizierung von Leishmania-Infektionen des Menschen

Heinz Eberhard Krampitz

## Einleitung

Tierexperimente spielen heute in der klinischen Diagnostik einer Leishmaniasis des Menschen oder auch eines Haustieres so gut wie keine Rolle mehr. Die Sicherung der Diagnose durch den direkten oder indirekten Parasitennachweis ist immer ohne Versuchstier möglich. Leishmania-Infektionen sind in adäquaten Gewebspunktaten zu erkennen, wenn auch mitunter nicht immer ganz leicht. Notfalls kann eine Vermehrung auf leblosen Nährböden zwischengeschaltet werden, wofür bewährte Medien zur Verfügung stehen. Alle *quo ad vitam* gefährlichen, also zur Generalisation neigenden klinischen Verlaufsformen gehen gesetzmäßig mit der Bildung humoraler Antikörper einher. Die Handhabung und Verlässlichkeit serologischer Nachweistekniken bessern sich zunehmend, die Antigenvermehrung *in vitro* bereitet keine Schwierigkeiten. Welchen Sinn also könnte es haben, die Möglichkeit von Parasitenvermehrungen in tierischen Experimentalwirten in einer Zeit in Erinnerung zu bringen, in der die Verwendung von Versuchstieren prinzipiell zum Gegenstand öffentlicher Kritik geworden und daher von Fall zu Fall neu überdacht werden sollte?

Es handelt sich um notwendige diagnostische Anliegen ganz anderer Art. Leishmania-Infektionen sind Schul- und Standardmodelle für die Möglichkeiten zellgebundener und zellvermittelter Immunantworten. Nur bruchstückweise ist dieses immunogene Orchester *in vitro* nachzuvollziehen. Das gleiche gilt für die Zyto- und Immunpathologie, die genetischen Grundlagen für Empfänglichkeit, Resistenz, Immunabwehr und Reservoir-eignung, die Prüfung der Organrestriktion und ihrer Konstanz sowie die experimentelle Chemotherapie. Die zu alledem erforderliche Lebendhaltung der Erreger kann auf xenogenes Coreagieren und die Ermittlung der Mitbestimmung eines Trägerorganismus nicht verzichten. Diesen im Rahmen der genannten Aktivitäten entbehrlich zu machen, hat darum auch keine der modernen *in vitro* Methoden der Merkmalsbestimmung eines Leishmania-Stammes zu erreichen vermocht.

## Methoden und Ergebnisse

Bei der Dauerhaltung von Laborstämmen sollten sich *in vivo* und *in vitro* Methoden gegenseitig ergänzen. Beide haben eigene Indikationen, beide ihre Vor- und Nachteile, die hier allerdings nicht in extenso dargestellt werden sollen. Standardisierte Versuchstierinfektionen können z. B. auf die kurzfristige Interpolation von *in vitro* Kulturen dann nicht verzichten, wenn es um die Quantifizierung von Inokula mittels der Zählkammer geht. Auch bakterielle Begleitkomponenten in Organsuspensionen sind durch *in vitro* Passagen am sichersten zu beseitigen. Bei der Verabfolgung eines Leishmania-stammes oder eines auf diese Parasiten zu prüfenden Organpunktates sind jeweils adäquate Versuchstierarten und Infektionswege zu nutzen. Von allen Arten kleiner

Laboratoriumstiere eignet sich noch immer der Goldhamster mit Abstand am besten für Stammisolierungen und fortlaufende Stammhaltungen. Je nach Parasitenart und Fragestellung bieten sich 4 Infektionsrouten an: Sub- oder intrakutan, intraperitoneal, intralinear und intrakardial oder intravenös.

Für eine kutane Infektion werden Nase, Ohren und Pfoten empfohlen. Je nach lokaler Routinetradition wird bald der eine, bald der andere Verabfolgungsort propagiert. Besonders tauglich sind sie alle nicht, zumindestens nicht für die Erreger altweltlicher Leishmaniasen, von denen hier ausschließlich die Rede sein soll. Die Inokulationsvolumina, die an einer der genannten Stellen untergebracht werden können, liegen weit unter einem halben ccm, was speziell bei Organsuspensionen nicht opportun und praktikabel ist. Wir bevorzugen deshalb die Unterlippe, in der sich Raum für 0.5—1.0 ml Inokulum findet. Voraussetzung ist, daß weit lateral eingestochen wird und die Nadelspitze subkutan nach medial bis in die Lippe vorgeschoben wird, ohne diese zu durchstechen. Bei Verwendung anderer Rezeptorarten kann analog verfahren werden. Je kleiner jedoch das Körpervolumen, um so prekärer wird das Problem angemessener Verimpfungsvolumina. Wichtig ist immer die gute Einsehbarkeit der zu beimpfenden Hautpartie. Seit langem gilt bei Mäusen die schütter behaarte Gegend der dorsalen Schwanzwurzel als besonders günstig. Bei der haarlosen Variante der Labormaus haben vergleichende Prüfungen ergeben, daß jede Körperstelle für eine experimentelle Hautleishmaniose gleich gut geeignet ist (Scheffer 1980). Unsere anfängliche Hoffnung, Nacktmäuse könnten sich bei der serienmäßigen Passagehaltung von *L.tropica* oder *L.major* dem Goldhamster überlegen erweisen, hat sich aus mehreren Gründen nicht erfüllt. Es lassen sich aber auf der Haut von haarlosen Mäusen "Orientbeulen" erzeugen, deren makroskopischer Aspekt und Verlauf den durch die gleichen Erreger beim Menschen erzeugten Läsionen täuschend ähneln. Nach der Verimpfung von Leishmanien der beiden genannten Arten aus einem Hautulkus des Menschen in oder unter die Haut eines Tierwirtes entsteht in loco ein Granulom, das meistens unter Mitwirkung von Bakterien einschmilzt und abszediert. Die Leishmanienvermehrung und deren Auflösung in Residualnester erfolgt wie bekannt, vorzugsweise in den wulstigen Randpartien des entstehenden Ulkus.

Bei den *Leishmania*-Stämmen des *Donovani*-Komplexes, deren hervorstechendstes Merkmal die Fähigkeit zu mehr oder minder progressiver Besiedlung der phagozytierenden Gewebselemente innerer Organe ist, gilt der intraperitoneale Infektionsweg als der geeignetste. Alle Einwände, die gegen diesen erhoben werden, erscheinen wenig stichhaltig. Injektionen begrenzter Volumina direkt in den Kreislauf oder die Milz erfordern mehr Aufwand, operatives Geschick und Ausfälle an Versuchstieren, bringen aber nur bei bestimmten Fragestellungen Vorteile. Wir haben auch kleine und kleinste Leishmaniazahlen in suspektem Material nach i.p. Verimpfung auf Goldhamster in diesen vermehren können. Mitunter empfiehlt sich in solchen Fällen 6—7 Wochen p.i. eine Leber-Milz-Blindpassage anzuschließen, wenn das Ergebnis noch nicht klar genug erscheint.

Die Konstanz der offensichtlich genetisch fixierten organotropen Eigenschaften von *Leishmania*-Stämmen ist unabhängig von der Art des Experimentalwirtes. Passagehaltungen in Nagetieren entweder kutan oder viszeral sind im amastigoten Stadium jahrelang möglich, ohne daß die Parasiten sich dabei plötzlich eines anderen besinnen und an Körperstellen vermehren, die ihnen bislang keine Daseinsmöglichkeiten boten.

Eine wiederholt gemachte Beobachtung muß hier genannt werden. Sie betraf immer Angehörige der Art *L. infantum* aus unseren bevorzugten mediterranen Feriengebieten.

Wir haben bisher von dort und den Ländern des Mittleren Ostens 10 verschiedene Stämme aus Orientbeulen in vivo zu isolieren versucht. 7 davon waren mühelos und ad infinitum im Goldhamster kutan zu passieren, 3 Südeuropäer (Malta, Elba und Spanien) gediehen dagegen von der ersten Labortierpassage an ausschließlich und beständig sehr gut viszeral. Beim Versuch sie kutan zu passieren gingen sie zugrunde. Die Überprüfung der Krankengeschichten ergab keine Hinweise auf eine vielleicht jüngst überwundene oder eine noch subklinische frühe interne Verbreitungsform in Donorpatienten. Neuerdings sind mehrfach auf dem Wege über die Analyse der Enzymsausstattungen ebenfalls zwingende Indizien dafür erbracht worden, daß *L. infantum* auch eine reine Hautleishmaniasis erzeugen kann, ohne sich bei solchen Patienten gleichzeitig für die inneren Organe zu interessieren (Rioux et al. 1980, Lanotte et al. 1981, Portús et al. 1982, Morillas Marquez & Sanchis Martin 1982). Unsere Tierversuche zeigten das schon seit Jahren (Krampitz et al. 1977, Krampitz 1981). Diese Erfahrungen veranlaßten uns *routinemäßig jeden "Wildstamm", der aus einem Patienten gewonnen werden konnte, in Goldhamstern parallel sowohl kutan wie viszeral in Passage zu schicken. Daß diese Chance einen primär viszeralen Stamm je dazu verleitet haben könnte, sich plötzlich anders zu orientieren, haben wir nie erlebt.*

Doch auch diese Feststellung will interpretiert sein. Auf meine Anregung hin prüfte Krause (1976) die wichtigsten einheimischen Wildnagetierarten, die wir zuvor in Gefangenschaft vermehrt hatten, auf ihre Eignung als Wirte für *L. donovani*. Als wichtigstes Ergebnis wurde die einheimische Rötel- oder Waldwühlmaus (*Clethrionomys glareolus*) als nützlicher Experimentalwirt für viszerotrope Leishmania-Stämme erkannt. Im Gegensatz zum sehr vulnerablen und zudem zur Amyloidbildung neigenden Goldhamster überlebt diese Wühlmaus einen für den Hamster binnen 2—3 Monaten tödliche i.p. Infektion mitunter länger als ein Jahr. In den Spätphasen solcher Infektionen kommt es regelmäßig zu einem massiven symptomatischen Befall der Haut und der Schleimhäute. Die Tiere verlieren dabei große Teile des Haarkleides und leiden an chronischer Konjunktivitis. Gleichzeitig geht die Intensität des Parasitenbefalls der inneren Organe merklich zurück, ohne indessen jemals ganz zu erlöschen. Alle 11 bisher in Rötelmäusen geprüften Stämme des *L. donovani*-Komplexes, isoliert aus Orientbeulen, Kala-azar-Patienten oder viszeral infizierten Hunden aus nahezu dem gesamten altweltlichen Verbreitungsgebiet der Parasiten zeigten diese Tendenz der massenhaften späten Rückkehr in die Peripherie. Die Anzahl der vorausgegangenen Labortierpassagen war dabei ohne Belang. Die Ökotypen des Parasiten aus der Haut können sich bei experimenteller Weiterverimpfung auf einen empfänglichen Neuwirt in diesem primär *nur viszeral ansiedeln und vermehren. Erst in den Spätphasen dieser Infektion beginnt dann sicher reproduzierbar das Streuen in die Haut von neuem. Nach direkter intrakutaner Subinokulation geht der Stamm in loco zugrunde. Die habituelle Tendenz zur temporären Massenexkursion ins Tegument hat wie der analoge Vorgang beim Menschen nichts mit den prinzipiell viszerotropen Eigenschaften der Stämme zu tun, die durch diese Extravaganz unberührt bleiben. Es lassen sich also keine Substämme mit ausschließlicher und konstanter kutaner Orientierung abzweigen (Krampitz 1981). Das histologische Hautbild des Post-Kala-azar-Dermal-Leishmanoids (PKADL) entspricht bei der Wühlmaus nicht dem der analogen Erscheinung des Menschen. Immerhin ist experimental beweisbar, daß linguale, bukkale und konjunktivale Schleimhautlokalisationen von Leishmanien zum Spätbild der viszeralen Leishmaniasis durch *L. donovani* gehören können.*

## Diskussion

Stauber (1973) gab einen Überblick über das Reaktionsspektrum, das bei verschiedenen Versuchstierarten nach Infektion mit Leishmanien zu erwarten ist. Dieses Spektrum sei breit, die Variation groß. Inzwischen hat man über die genetischen Hintergründe von Empfänglichkeit und Resistenz bei Versuchs-Nagetieren mehr gelernt (Gorczyński 1982), ohne daß sich etwa dadurch die verunsicherte taxonomische Situation innerhalb der Gattung *Leishmania* beruhigt hätte. Natürlich ist der Mensch ein ungeeignetes Medium, wenn es um die Beantwortung und Bewertung wirtsinduzierter Eigenschaften von Parasiten geht, für die er ontogenetisch und phylogenetisch nur eine Nebenrolle spielt. Die zoosystematisch illegitime Basis der Artunterscheidung und -benennung bei den menschenpathogenen Leishmanien hat sich jedoch in der tropenmedizinischen Praxis im großen und ganzen bewährt und vor allem noch keinem Patienten geschadet.

Sie steht auch in keinem unüberbrückbaren Gegensatz zu den modernen Methoden der Art- und Unterartbestimmung, zumal diese im Feld nicht praktikabel sind (Williams & de Vasconcellos Coelho 1978). Zwei Dinge seien hier noch einmal unterstrichen, die keine auch noch so umfangreiche kasuistische Dokumentation evident machen kann. Das stellenweise sogar gehäufte Auftreten von mukokutaner Leishmaniasis vor allem in gewissen Trockengebieten der alten Welt erschüttert die konventionellen Vorstellungen von der geographischen Verbreitung von *L. braziliensis* keinesfalls. Es ist klinisch und parasitologisch etwas anderes und darf, inzwischen durch zahlreiche Publikationen gestützt, als Teil einer Post- oder Para-Kala-azar Symptomatik gelten. Der Tierversuch kann die Deutung stützen. Ein damit zusammenhängendes Ergebnis unserer Tierversuche kann ebenfalls in die Praxis transponiert werden; Manson-Bahr (1973) sah einige Probleme in der geographischen Verteilung des Post-Kala-azar-Leishmanoids. Es zeigt offenkundig innerhalb des natürlichen Vorkommensgebietes von *L. donovani* eigene Fundpunktmassierungen, als ob es mit der auslösenden Parasitenart wenig zu tun hätte. Die Bereitwilligkeit zur späten Hautorientierung und zunehmender Massensammlung in der Peripherie, verbunden mit einem allmählichen Rückzug aus den inneren Organen, ist aber ein festes Merkmal aller Stämme des *L. donovani*-Komplexes, sofern man nur geeignete Indikatoren wählt. Die ungleichmäßige geographische Verbreitung des PKADL beim Menschen, so wie man es aus Indien kennt (Girgla et al. 1977) dürfte kaum mit Verhaltensunterschieden der Erreger zusammenhängen, wohl aber könnte die Symptomatik der späten Hautorientierung der Parasiten in verschiedenen endemischen Gebieten xenogen modifiziert werden.

## Zusammenfassung

Es wird über das methodische Vorgehen und einige Beobachtungen berichtet, die den Versuch einer Laborhaltung von *Leishmania*-Stämmen in kleinen Nagetieren nützlich machen. Dabei ging es vorrangig um die Ermittlung wirtsinduzierter Eigenschaften, die zum vollständigen Merkmalskatalog eines Erregerstammes gehören. Gearbeitet wurde ausschließlich mit Isolaten, die im Laufe der Jahre aus Organpunkaten von Patienten bekannter Herkunft und Exposition stammten. Die Rolle des Goldhamsters als Versuchstier der Wahl sowohl für Erstisolierungen wie für Passagehaltungen von *Leishmania*-Stämmen aller Art ist unterstrichen und verschiedene bewährte Infektionsarten sind genannt. Auch der haarlose Zuchtstamm der Labormaus und die einheimische Rötelmaus können bei der Bestimmung von Stammeigenschaften von *L. tropica* und *L. donovani* gute Dienste leisten. Herausgehoben und diskutiert ist das massenhafte Auftreten von *L. donovani* in der Haut und den Schleimhäuten geeigneter Ver-

suchstiere in den Spätphasen einer viszeralen Infektion und die Fähigkeit von *L. infantum*-Stämmen aus dem Mittelmeergebiet in erwachsenen Menschen nur eine Orientbeule zu produzieren, ohne dabei gleichzeitig die inneren Organe zu besiedeln, wie sie es sofort nach Übertragung auf das Versuchstier tun.

## Summary

### **Methods and value of animal experiments for the identification of human *Leishmania* infections.**

Some observations are described concerning the determination of biological patterns of Old World *Leishmania* strains administrated directly from patients into laboratory rodents. The amastigots (10 cutaneous, 11 visceral) have been collected systematically from German travellers or their dogs returning from Southern endemic areas. Apart from Syrian hamsters, the most susceptible animals for the isolation and consecutive maintenance of strains, nude mice und European banc voles has been proved to be suitable in vivo cultivations and the determination of some biological properties of a given strain. To test its inborn side selection abilities, experimental animals seems to be indispensable. Two common experiences are confirmed and discussed; *L. infantum*, like parasites can be found in and isolated from human oriental sores but grow in receptor animals exclusively visceraly. Secundly all strains of the *L. donovani* complex immigrate, when administrated intraperitoneally to banc voles in late phases of this infection massively the skin and mucuous membranes. This can be diagnosed by loss of the hair coat and conjunctivitis. As in the case of human PKADL no cutaneous sub-strains can be separated from such rodents. The ecotypes of the parasites from the host bodies surface remain true visceral *Leishmanias*.

## Literatur

- GIRLA, H.S., R.A. MARSDEN, G.M. SINGH, T.J. RYAN (1977): Post-Kala-azar dermal leishmaniasis. *Brit. J. Dermatol.* **97**, 307—311.
- GORCZYNSKI, R.M. (1982): Nature of resistance to leishmaniasis in experimental rodents. *Develop. Comp. Immunol.* **6**, 199—207.
- KRAMPITZ, H.E. (1981): Primary and secondary skin leishmaniasis in experimental rodent host. *Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. A* **250**, 191—197.
- KRAMPITZ, H.E., B. WEBER, K. SCHEFFER (1977): Zum Verhalten von Leishmanien aus Hautulzera des Menschen in kleinen Labortieren. *Acta Trop.* **34**, 293—311.
- KRAUSE, L. (1976): *Leishmania donovani* in kleinen Nagetieren. Med. Diss. München 1976.
- LANOTTE, G., J.—A. RIOUX, R. MAAZOUN, N. PASTEUR, F. PRATLONG, J. LEPARD (1981): Application de la méthode numérique à la taxonomie de genre *leishmania* Ross 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. *Ann. Parasit.* **56**, 575—591.
- MANSON-BAHR, P.E.C. (1973): The problems of post-Kala-azar dermal leishmanoid. Abstr. 9. Intern. Congr. Trop. Med. Athen 1973, I/135.
- MORILLAS-MARQUEZ, F., M.C. SANCHIS MARTIN (1982): Incidencia del Kala-azar en la Provincia Almeria en los últimos años. Resum 3. Reum. An. Asoc. Parasitol. Espan. Madrid 1982, 75.
- PORTÚS, M., G. LANOTTE, F. PRATLONG: Observaciones a proposito de un caso de boton oriente adquirida en las cercanias de Barcelona. *Ibid.* p. 35.
- RIOUX, J.-A., G. LANOTTE, R. MAAZOUN, R. PERELLO, F. PRATLONG (1980): *Leishmania infantum* Nicolle 1908, the agent of oriental sore in France. On the biochemical identification of two strains isolated in Pyrénées orientales. *C. R. Acad. Sci. D.* **291**, 701—703.
- SCHEFFER, K. (1980): Die experimentelle Hautleishmaniose der haarlosen Maus. Med. Diss. München 1980.
- STAUBER, L.A. (1973): Leishmaniasis: Progress of the infection in experimental animals. Abstr. 9. Intern. Congr. Trop. Med. Athen 1973, I/138.
- WILLIAMS, P., M. DE VASCONCELLOS COELHO (1978): Taxonomy and transmission of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* **16**, 1—42.

### ANSCHRIFT DES VERFASSERS:

Prof. Dr. med. H. E. Krampitz  
Abt. für Infektions- und Tropenmedizin  
der Universität München  
Leopoldstraße 5  
D-8000 München 40

# 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: 1983

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Krampitz Heinz Eberhard

Artikel/Article: [Sinn, Technik und Aussage von Tierexperimenten bei der Identifizierung von Leishmania-Infektionen des Menschen. 7-12](#)