©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 197–202

Max von Pettenkofer Institut der Universität München, Abteilung Serologie – Parasitologie
(Vorstand: Prof. Dr. Friedriech Deinhardt)

Neues Verfahren zur Gewinnung von Pneumocystis carinii aus der Rattenlunge Gewinnung von Pneumocystis carinii-Antigen mit Hilfe der „forcierten" Lungenperfusion

A. Szabados, Angelika Freytag, Karin Tybus, G. Schierz, F. Deinhardt

Einleitung

Pneumocystis carinii (P. c.) bietet nicht nur bei der Kultivierung große Probleme, auch die Isolierung des Erregers aus der Lunge war bislang nicht zufriedenstellend gelungen (1–10). Die strukturellen Eigenheiten der Lunge, dem einzigen für die in vivo-Vermehrung geeigneten Organ, erschweren eine quantiativ und qualitativ befriedigende Gewinnung der Parasiten erheblich. Die bisher angewandten Verfahren, eine mechanische Zerstörung des Lungengewebes, bzw. eine in situ Lavage des Bronchialbaumes, führen entweder zu einer erheblichen Kontamination durch Lungengewebe, oder – im zweiten Falle – zu einer in der Regel ungenügenden Ausbeute.

In der vorliegenden Arbeit wird ein modifiziertes Verfahren zur Isolierung von *P. c.* aus der Lunge infizierter Ratten* beschrieben, bezeichnet als forcierte Lungenperfusion.

Methodik

Die forcierte Lungenperfusion erfolgt außerhalb des Tierkörpers. Vor Entnahme der Lunge werden die Trachea und die beiden Hauptbronchien mit steril eingeführten Sonden** versehen. Die Lagerung der Sonden erfolgt so, daß durch die Trachealsonde unter Druck zugeführtes Perfusionsmedium nach der Durchspülung des Alveolarsystems aus den beiden Bronchialsonden wieder entweichen kann. Die Perfusion führt zu einer beträchtlichen Aufblähung der Lunge. Dabei reißen die Alveolarsepten und die *P. c.* können leichter abgelöst und herausgespült werden. Detaillierte Beschreibung der Lungenperfusion: Nach Herzpunktion wird der Brustkorb der Ratte steril geöffnet und der knöcherne Thorax bis zur Medioclavicularlinie abgetragen. Die weiteren präparativen Schritte umfassen die Freilegung von Trachea und Mediastinum, die Entnahme des Herzens, die Freispülung der Gefäßstümpfe mit physiologischer Kochsalzlösung sowie die schonende Darstellung der Bifurkation und der beiden Hauptbronchien. Nach Verschlußligatur der Trachea unterhalb des Kehlkopfes wird die Hauptsonde bis zur Bifurkation vorgeschoben und durch Mehrfachligaturen unterhalb der Einstichstelle rutschfest fixiert. Die etwa 5 mm oberhalb der Bifurkation eingeführten Bronchialsonden müssen möglichst weit in die Bronchien vorgeschoben und ebenfalls mit der Trachealwand verbunden werden.

*) Zur Gewinnung von *P. c.* wurden 10–14 Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die mit proteinarmer Diät (ca. 5%) ernährt waren und etwa 5–7 Wochen lang mit 2×25 mg Cortisonacetat parenteral behandelt waren, bevor sie getötet worden sind

**) Abbocath® (Fa. Abboth), Branüle® (Fa. Braun/Melsungen)

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

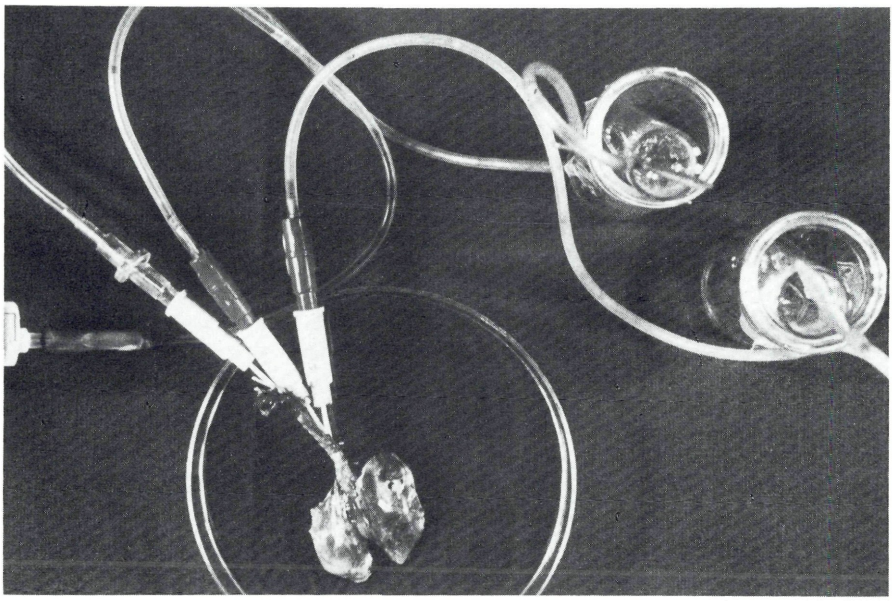

Abb. 1: Rattenlunge vor der forcierten Perfusion

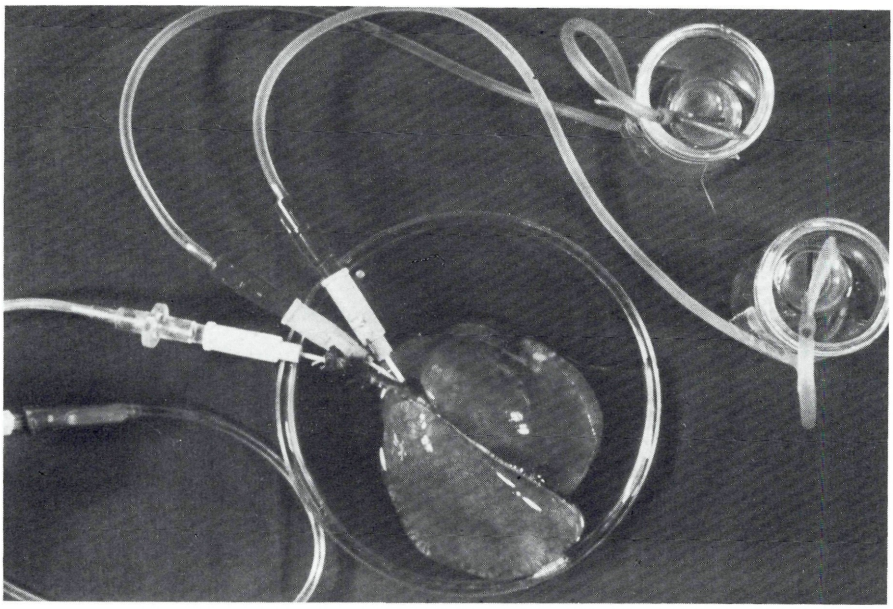

Abb. 2: Dieselbe Rattenlunge wie im Bild 1, während der Perfusion

Anschließend wird der Oesophagus oberhalb des Zwerchfells doppelt abgebunden, um eine Kontomination der Lunge durch den Mageninhalt zu vermeiden. Nunmehr können Trachea und Lunge unter Anhebung der obersten Trachealligatur ventralwärts freipräpariert (cave: Verletzung der Lunge!) und in ein steriles Gefäß übergeführt werden.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

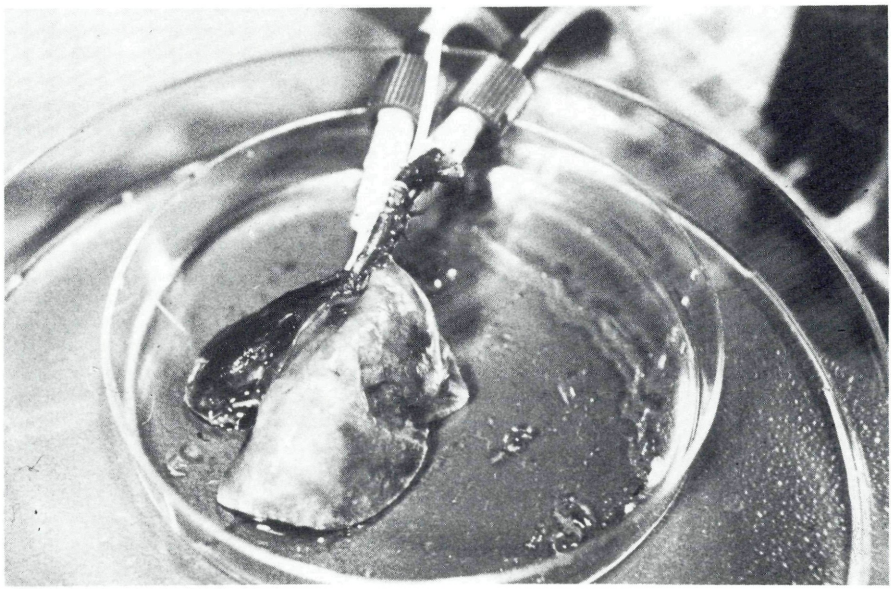

Abb. 3: Separate Perfusion des linken Lungenflügels. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen den beiden Flügeln. Der linke, perfundierte Flügel blaßt während der Perfusion ab und gewinnt eine farblose, glasige Konsistenz.

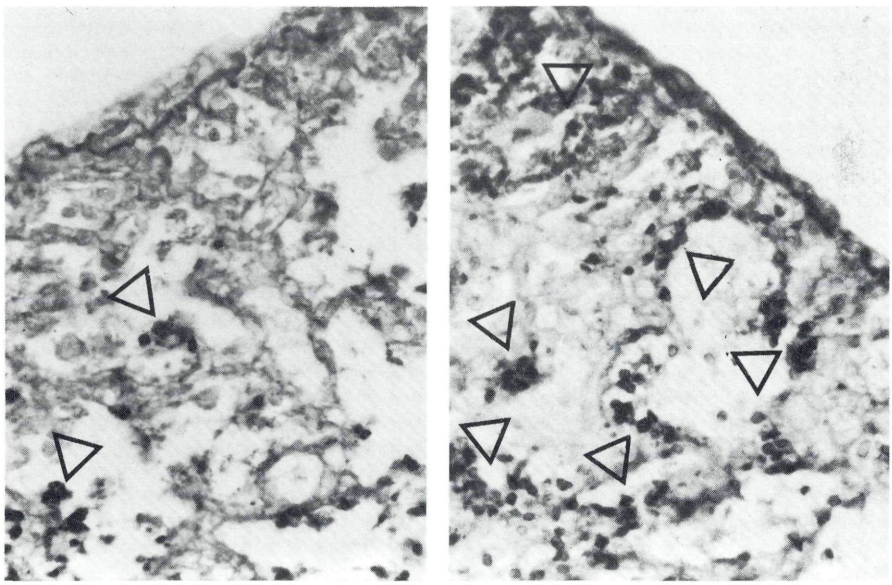

Abb. 4: Histologie der beiden in Abb. 3 gezeigten Lungenflügel (modizifiziertes Versilberungsverfahren nach Grocott zur selektiven Darstellung der Pneumocysten). Das linke Bild zeigt den perfundierten Flügel mit deutlich aufgelockerter, z. T. zerstörter Alveolarstruktur und mit vereinzelten Parasiten (Pfeile). Das rechte Bild zeigt den nicht perfundierten Lungenflügel mit erhaltener Alveolarstruktur, intakter Organkapsel und massenhaft Pneumocysten.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

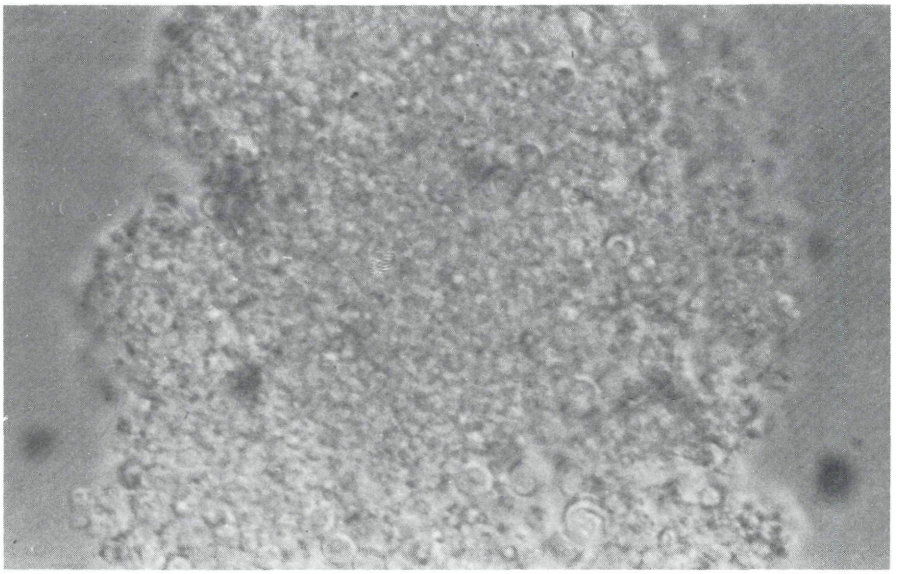

Abb. 5: Pneumocystis carinii in großen, zusammengeballten Haufen (sog. cluster) kurz nach der Perfusion (bevorzugt jugendliche Formen im Bild sichtbar) im Perfusionsmedium. Das hier dargestellte „Rohantigen" zeigt bereits eine zufriedenstellende Reinheit ohne Kontamination mit störenden Lungengewebespartikeln. Die Blutzellbestandteile und die herausgespülten Bronchial- und Alveolarzellen, sowie Makrophagen sind von den Pneumocysten leicht abzutrennen.

Nach Anschluß der Sonden an die zu- und ableitenden Schläuche erfolgt die Zufuhr des Perfusionsmediums durch die Trachealhauptsonde und der Abfluß durch die Bronchialsonden. Durch mechanischen oder hydrostatischen Druck (20 ml Spritze oder ca. 1,80–2,50 m hochgesetzte Infusionsflasche) werden im Intervall jeweils 10 ml Medium innerhalb von 5 sec perfundiert. Dabei vergrößert sich die Lunge auf das 3- bis 6-fache, mitunter auf das 10-fache. Geringfügige Verletzungen der Lunge können unter Umständen abgebunden werden; möglich ist auch der Ausgleich eines Druckverlustes durch raschere Perfusion. Wird die Lunge in einem sterilen Gefäß perfundiert, kann durch ein Leck austretendes Medium aufgefangen und weiter verarbeitet werden.

Die Perfusionen werden wiederholt, bis die Lunge stark abgeblaßt ist und eine glasige Konsistenz annimmt. Zu diesem Zeitpunkt erscheint die Perfusionflüssigkeit farblos und klar. Ein abschließendes Ausdrücken der Lunge mit sterilem Besteck bis zum Kollabieren (evt. mehrfach durchgeschnitten) ist geeignet, die Ausbeute weiter zu erhöhen.

Das gesammelte Medium wird bei 5000 U/min für 15 min zentrifugiert und das Sediment für die Weiterverarbeitung in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Ergebnisse

Die Vorteile der forcierten Lungenperfusion lassen sich in 5 Punkten zusammenfassen:

1. Die Menge des „Rohantigens" enspricht in der Regel dem mindestens 5- bis 10-fachen der durch eine Bronchiallavage erzielbaren Ausbeute, bleibt aber unter den nach vollständiger Zerstörung der Lunge erreichbaren Werten.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

2. Dem quantitativen Verlust stehen qualitativ erhebliche Vorteile gegenüber. Das nach Zentrifugieren gewonnene Material enthält im wesentlichen noch Zellen des Blutes, sowie vereinzelt Bronchialepithelien und gröbere Stücke von Alveolargewebe. Alle diese Bestandteile lassen sich leicht mittels der Dichtegradientenzentrifugation abscheiden.

3. Eine Kontamination des Präparates ist weitgehend ausgeschlossen, insbesondere ein für anschließende Kultivierungsversuche wichtiger Vorteil.

4. Die Isolierung der *P. c.* erfolgt schonend und weitgehend unter physiologischen Bedingungen. Es kann davon ausgegangen werden, daß die morphologischen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften erhalten bleiben.

5. Das Verfahren ist zeitsparend und mit einiger Übung problemlos durchführbar.

Diskussion

Der größte Vorteil der forcierten Lungenperfusion gegenüber der Bronchiallavage bzw. der Zerstörung des Lungengewebes ist darin zu sehen, daß sie die Nachteile dieser beiden Verfahren, einerseits die geringe Ausbeute, anderseits eine hochgradige Kontamination mit Gewebsresten der Lunge, weitgehend vermeidet. Insbesondere hat es sich uns bei starker Verunreinigung als schwierig erwiesen, annähernd reine *P. c.*-Präparate zu gewinnen und die an den Gewebsteilen haftenden *P. c.* abzulösen. Die ursprünglich sehr hohe Ausbeute an *P. c.* kann sich dann durch die nachfolgend erforderlich werdenden Maßnahmen bis zu 50% verringern. Außerdem erscheint es fraglich, ob die Parasiten Verfahren, wie etwa die enzymatische Verdauung der Lunge oder lange Manipulationszeiten, ohne Schädigungen überstehen können.

Die Möglichkeit einer schonenden Darstellung der *P. c.* erscheint uns als weiterer wesentlicher Vorzug der forcierten Lungenperfusion, wenn es um die Durchführung von Experimenten geht, welche der weiteren Aufklärung des Lebenszyklus der *P. c.* bzw. der Entwicklung von Verfahren zur in vitro-Propagierung dienen sollen.

In welchem Umfang die in der Lunge befindlichen Parasiten durch die forcierte Perfusion extrahiert werden können, läßt sich nur annähernd ermessen. Mikroskopische Vergleichsuntersuchungen zwischen dem perfundierten bzw. nicht perfundierten Flügel einer Lunge sprechen für eine etwa 40–50%ige Ausbeute.

Zusammenfassung

Es wird über ein als forcierte Lungenperfusion bezeichnetes Verfahren zur Isolierung von Pneumocystis carinii aus der Lunge infizierter Ratten berichtet. Dabei wird die Lunge außerhalb des Tierkörpers über ein System von Sonden unter Druck perfundiert. Die Aufblähung der Lunge und das Reißen der Alveolarsepten begünstigt die Ablösung der Parasiten, sodaß im Vergleich zur Bronchiallavage eine mindestens 5- bis 10-fach höhere Ausbeute erzielt werden kann. Zugleich ist die Kontamination des Päparates durch Zellen des Blutes sowie Bronchial- bzw. Alveolarpithelien gering und durch Dichtegradientenzentrifugation leicht abzuscheiden. Eine enzymatische Verdauung des Lungengewebes ist bei diesem Verfahren nicht notwendig. Die schonende Isolierung von *P. c.* erscheint insbesondere für weitere Studien (Kultivierung der Parasiten in vitro, Zyklusaufklärung, immunologische Studien u. a.) von Vorteil.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Summary

A new method
for the isolation of Pneumocystis carinii from the lung of infected rats
The "forced" lung perfusion
as a method for isolation of the Pneumocystis carinii-antigen

In the present study a new method is described for the isolation of Pneumocystis carinii from the infected lung of rats, called forced lung perfusion. The perfusion is performed under pressure outside the animal's body using a system of drain tubes. The resulting inflation of the lung tissue, accompained by the partial destruction of the alveolar septs, facilitates the extraction of the parasites. Free of bacterial contamination, the parasites ar finally separated from blood cells, alveolar and bronchial cells respectively by gradient centrifugation. Avoiding methods like the enzymatic digestion of lung tissue, it is to expected that Pneumocystis carinii remain intact morphologically and immunologically and are suited for further studies.

Literatur

GOETZ, O. (1958): Über das Antigen der interstitiellen Pneumonie. Klin. Wschr. 36, 118.

HENDLEY, J. O., WELLER, T. H. (1971): Activation and Transmission in rats of infection with Pneumocystis carinii. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 1401–1404.

IKAI, T., YOSHIDA, Y., OGINO, K., TAKEUCHI, S., YAMADA, M. (1977): Studies on Pneumocystis carinii and Pneumocystis carinii pneumonia. II. Method for concentration and quantitation of P. carinii cysts. Jpn. J. Parasitol. 26, 314–322.

MASUR, H., JONES, T. C. (1978): The interaction in vitro of Pneumocystis carinii with macrophages and L-cells. J. Exp. Med. 147. 157–170.

MEUWISSEN, J., LEEUWENBERG, A., HEEREN, J. (1973): New method for study of infections with Pneumocystis carinii. J. Infect. dis. 127, 209–210.

MINELLY, J. A., McDUFFIE, F. C., HOLLEY, K. E. (1970): Immunfluorescent identification of Pneumocystis carinii. Arch. Pathol. 90, 561–566.

NORMAN, L., KAGAN, I. G. (1970): A perliminary report of an indirect fluorescent antibody test for detecting antibodies to cysts of Pneumocystis carinii in human sera. A. J. Clin. Pathol. 58, 170–176.

VIVELL, O. (1954): Über eine neue serodiagnostische Methode bei der interstitiellen plasmacellulären Pneumonie junger Säuglinge und Frühgeburten. Dtsch. med. Wschr. 79, 358–361.

VIVELL, O. (1955): Ein neues, stabiles Antigen für die Serodiagnose der interstitiellen plasmacellulären Pneumonie junger Säuglinge und Frühgeburten. Dtsch. med. Wschr. 80, 1357.

WALZER, P. D., RUTLEDGE, M. E., YONEDA, K., STAHR, B., J. (1979): A new method of separating Pneumocystis carinii from infected lung tissue. Exp. Parasitol. 47, 356–368.

ANSCHRIFT DES AUTORS:

Dr. med., Dipl. Biochem. Andreas Szabados
Max von Pettenkofer Institut der Universität München

Pettenkoferstraße 9 a
D-8000 München 2

ZOBODAT - 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: 1986

Band/Volume: 8

Autor(en)/Author(s): Szabados Andreas, Freytag Angelika, Tybus Karin, Schierz G., Deinhardt F.

Artikel/Article: Neues Verfahren zur Gewinnung von Pneumocystis carinii aus der Rattenlunge Gewinnung von Pneumocystis carinii-Antigen mit Hilfe der "forcierten" Lungenperfusion. 197-202