

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Professor Dr. med. H. HAMPERL)

Histologische Untersuchungen bei experimenteller Pneumocystis-Pneumonie

Von
D. RICKEN

Mit 6 Textabbildungen in 13 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 16. August 1958)

Eine Lungenpneumocystose im Tierversuch konnte erstmalig WEL-
LER (1) bei Ratten durch intranasale Infektion mit pneumocysten-
haltigem Lungenbrei und nachfolgende Resistenzschwächung mit hohen
Cortisondosen erzeugen. Seine Ergebnisse wurden sowohl von ihm
selbst (2) als auch von LINHARTOVA, GOETZ und RENTSCH und von
PLESS und TRODE in erneuten Versuchsreihen überprüft und bestätigt.
Eigentümlicherweise bekamen aber auch Ratten, die nicht mit pneumo-
cystenhaltigem Lungenbrei infiziert, sondern lediglich mit Cortison
resistenzgeschwächt worden waren, größtenteils eine Pneumocystose
ihrer Lungen. Dieses Phänomen wurde auf eine Aktivierung einer all-
gemein bei Ratten vorhandenen latenten Pneumocystis-Infektion zu-
rückgeführt [WELLER (1,2), LINHARTOVA, GOETZ und RENTSCH].

Inzwischen sind am hiesigen Institut ebenfalls Versuche zur Erzeu-
gung einer Pneumocystis-Pneumonie an Ratten und Mäusen durchgeführt
worden. Mit den gewonnenen pneumocystenhaltigen Tierlungen wurden
morphologische Untersuchungen an Pneumocystis Carinii angestellt.
Dabei war die Frage von Interesse, ob und inwieweit zwischen der
tierischen und menschlichen Pneumocystis-Pneumonie Übereinstim-
mungen und folglich Vergleichsmöglichkeiten vorhanden waren. Des
weiteren wurden vergleichende Untersuchungen von Pneumocystis
Carinii mit verschiedenen Pilzen angestellt. Außerdem wurden bei
Tieren mit intensivem Pneumocystenbefall der Lungen die übrigen
Organe untersucht.

Tierversuche

Insgesamt 100 Ratten und 15 Mäuse wurden nach der in einigen Zügen ab-
geänderten Methode von WELLER (1) behandelt.

Versuch I (s. Tabelle 1). 21 Ratten, von denen bei Versuchsbeginn 3 Tiere
2 Tage, 7 Tiere 3, 2 Tiere 5, 4 Tiere 13, 2 Tiere 19 und 3 Tiere 42 Tage alt
waren, wurden 8 Tage lang mehrmals mit der Schnauze in eine Lungen-
breiaufschwemmung von an Pneumocystis-Pneumonie verstorbenen Säuglingen
getaucht, bis sie aspirierten. Gleichzeitig bekam jedes Tier zuerst 2,5 mg
und vom 10. Versuchstag an 5 mg Cortison pro Tag subcutan injiziert. Vom

50. Versuchstag an wurde die Cortisondosis auf 15 mg pro Tag und Tier erhöht. Während der ganzen Versuchsdauer wurden außerdem täglich 4000 E Hostamycin¹ pro Tier subcutan injiziert. In gleicher Weise mit Ausnahme der Verabreichung von pneumocystenhaltigem Lungenbrei wurden 8 Kontrollratten behandelt, von denen bei Versuchsbeginn je 3 Tiere 23 und 29 Tage und 2 Tiere 42 Tage alt waren. Alle Ratten zeigten unter der andauernden Cortisonapplikation ungefähr vom 10. Tag an eine Wachstumsverlangsamung und eine nur geringe oder keine Gewichtszunahme mehr. Sie starben nach unterschiedlich langer Behandlungsdauer bei extremer Abmagerung und Schwächung, oft mit stark erhöhter Atemfrequenz als Zeichen eines pneumonischen Infektes. Sowohl bei mehreren infizierten Ratten als auch Kontrollratten konnten in den Lungen Pneumocystenwaben in wechselnder Ausdehnung nachgewiesen werden.

Bei Ratten, die vor dem 40. Behandlungstag mit Cortison und Hostamycin starben, wurden keine Pneumocysten gefunden. Dieses waren vornehmlich die bei Versuchsbeginn 2, 3, 5 und 13 Tage alten Tiere, welche bei der relativ hohen Cortisondosierung schon nach kurzer Zeit an Magen-Darmblutungen, eitrigen Pneumonien oder an Pyämien mit Abscessen in Leber und Lungen zugrunde gingen. Erst bei Ratten, die nach dem 40. Behandlungstag starben, konnten Pneumocystenwaben in den Lungen festgestellt werden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1. Versuch I. Anzahl der „infizierten“ Ratten und Kontrollratten mit positivem und negativem Pneumocystenbefund in Abhängigkeit von der Dauer der Cortisonapplikation

		Dauer der Cortisonapplikation in Tagen					
		0—20	21—40	41—60	61—80		
„Infizierte“ Ratten	positiv			4	5	= 9	} = 21
	negativ	5	6		1	= 12	
Kontroll- ratten	positiv			2	4	= 6	} = 8
	negativ		2			= 2	

Versuch II (s. Tabelle 2). Nur ältere Ratten wurden in den Versuch genommen. 44 Ratten, von denen bei Versuchsbeginn 4 Tiere 22 Tage und je 10 Tiere 19, 23, 32 und 45 Tage alt waren, wurden zu Anfang in einem nach außen abgeschlossenen System einem Spray von frisch gewonnener, pneumocystenhaltiger Lungenbrei-aufschwemmung in physiologischer NaCl-Lösung (Tröpfchengröße 5—10 μ) 7—9 Tage lang mehrmals am Tage ausgesetzt. Gleichzeitig bekam jedes Tier zuerst „einschleichende“ Cortisondosen von $\frac{1}{2}$ —1 mg pro Tag subcutan, je nach „Verträglichkeit“ wurde dann langsam auf 5 mg und vom 50. Behandlungstag bis auf 25 mg Cortison gesteigert. Dazu wurden jedem Tier täglich 4000 E Hostamycin injiziert.

Mit Ausnahme des Infektionsversuches wurde in gleicher Weise mit 27 Kontrollratten verfahren, die bei Beginn der Cortisonapplikation 16 Tage (6 Tiere), 32 (10 Tiere), 35 (7 Tiere) und 53 Tage (4 Tiere) alt waren. Um die Möglichkeit einer

¹ Cortison und Hostamycin wurden von den Farbwerken HOECHST in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Übertragung der Pneumocystis Carinii von infizierten Tieren auf die Kontrolltiere auszuschließen, wurden letztere von ortsfremden Wüfren genommen und außerdem in einem anderen, vorher gründlichst desinfizierten Stall untergebracht. Sie wurden von einer anderen Person behandelt, die während der gesamten Versuchsdauer niemals mit den infizierten Tieren noch mit den zu ihrer Behandlung benützten Gegenständen in Berührung kam.

Drei Ratten starben vor dem 40. Behandlungstag an einer eitrigen, konfluierenden Herdpneumonie. Pneumocysten konnten bei ihnen nicht nachgewiesen werden, ebenso nicht bei 5 Ratten, die nach diesem Termin aus der gleichen Ursache zugrunde gingen. Alle anderen Ratten — und zwar infizierte Tiere wie auch wiederum die Kontrolltiere —, welche nach dem 40. Behandlungstag starben oder auf der Höhe der Erkrankung getötet wurden — 15 von ihnen nach einem cortisonfreien Intervall von 8—10 Tagen —, zeigten einen oft hochgradigen Pneumocystenbefall ihrer Lungen (Abb. 1), manchmal in Kombination mit einer teils durch Pilze hervorgerufenen eitrigen Herdpneumonie.

Im einzelnen wiesen 38 der 44 „infizierten“ Ratten (= 86 %) und 24 der 27 Kontrollratten (= 89 %), insgesamt also 62 der 71 Ratten des Versuchs II (= 87 %) einen positiven Lungenbefund auf (siehe Tabelle 2).

Die größte Anzahl der positiven Pneumocystenbefunde war zwischen dem 60. und 90. Tag der Resistenzschwächung zu beobachten (s. Tabelle 2); innerhalb dieser Spanne war auch die Intensität des Pneumocystenbefalles am größten (siehe Tabelle 3).

Versuch III. 15 zu Versuchsbeginn 76 Tage alte Mäuse wurden in gleicher Weise wie in Versuch II behandelt, jedoch mit wesentlich kleineren Cortisondosen (zuerst $\frac{1}{4}$ mg, später

Tabelle 2. Versuch II. Anzahl der „infizierten“ Ratten und Kontrollratten mit positivem und negativem Pneumocystisbefund in Abhängigkeit von der Dauer der Cortisonapplikation

		Dauer der Cortisonapplikation in Tagen										Positive Ratten in Prozent	Zahl der Ratten in Versuch II	Prozent positive Ratten in Versuch II
		11—20	21—30	31—40	41—50	51—60	61—70	71—80	81—90	91—100				
„Infizierte“ Ratten	positiv				1	3	11	13	5	5	= 38 = 6	44	71	87 %
	negativ	1	2				3							
Kontrollratten	positiv				3		7	9	4	1	= 24 = 3	27		89 %
	negativ	1					1		1					

Tabelle 3. Versuch II. Intensität des Pneumocystenbefalles bei 62 Ratten mit positivem Pneumocystenbefund, in Abhängigkeit von der Dauer der Cortisonapplikation

Intensität des Befalles mit Pneumocysten	Dauer der Cortisonapplikation in Tagen						
	41—50	51—60	61—70	71—80	81—90	91—100	
Schwach	2	1	4	4		1	=12
Mittel	2	2	8	10	9	5	=36
Stark			4	7	3		=14

$\frac{1}{2}$ —1 mg). Die 10 infizierten Mäuse und 5 Kontrollmäuse gingen bis zum 41. Behandlungstag an Pneumonien und Pyämien zugrunde. Pneumocysten konnten in ihrem Lungen nicht nachgewiesen werden.

Histologische Befunde

Bei der Beschreibung der verschiedenen Formen und Strukturen von Pneumocystis Carinii wird im folgenden die Nomenklatur gebraucht, welche sich nach vorangegangenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an gleichen pneumocystenhaltigen Rattenlungen (WESSEL und RICKEN) als günstig erwiesen hat. Bei diesen wurden unterschieden: Cysten mit einem Innenkörperchen, als Übergangsformen bezeichnete Cysten mit sichel- oder napfförmiger Innensubstanz (Matrix), Cysten mit unreifen und reifen Cystenkörperchen (Tochterindividuen) und freie Cystenkörperchen. In der Reihenfolge ihrer Aufzählung ließen sich diese Formen zu einem Entwicklungs- und Vermehrungszyclus zusammenfassen, welcher mit dem von VANEK und JIROVEC aufgestellten weitgehende Übereinstimmung zeigte.

Die Ausbreitung der Pneumocystenwaben in den Rattenlungen ist im allgemeinen von herdförmigem, in mehreren Fällen auch von lobärem Charakter. Dabei sind die Lungenalveolen und auch die kleineren Bronchien mehr oder weniger intensiv mit Pneumocystenwaben ausgefüllt (Abb. 1a und b). In den größeren Bronchien finden sich höchstens noch Bruchstücke von Waben, die zudem eine beginnende Auflösung oder Koagulation ihrer Strukturen zeigen. In der Trachea konnten nur in 2 Fällen kleinste Wabenreste beobachtet werden.

Die Waben bestehen aus dicht aneinandergelagerten, verschiedenen Formen von Pneumocystis Carinii. Vornehmlich finden sich etwa 4μ große, runde oder unregelmäßig gestaltete Cysten mit zarter PAS-positiver Membran, die ein unscharf begrenztes, mit Kernfarbstoffen sich anfärbendes, etwa 1μ großes Innenkörperchen in einer nicht immer sichtbaren, schwach PAS-positiven Innensubstanz enthalten.

Mit der Gram-Färbung, und nur dann, wenn mit Anilinöl, nicht, wenn mit 95%igem Alkohol differenziert wird, kommen die sog. *Sichel- und Napfcysten* [GIESE (1,2), PLEISS (1, 2)] zur Beobachtung (Abb. 2). Ihre Zahl ist unterschiedlich, in manchen Alveolarbezirken können sie ganz fehlen. Sie sind rund, etwa 5μ groß, haben eine gramnegative, nur schattenhaft sichtbare Membran und enthalten eine grampositive,

unterschiedlich dichte Substanz von mannigfachem Aufbau. So kann sie einmal sichel- oder napfförmig sein und ist dann gegen den übrigen optisch leeren Cysteninnenraum durch feinste Vorsprünge und Zapfen abgegrenzt (Abb. 2, *a*). Zum anderen ist sie netzartig (Abb. 2, *b*), oder sie liegt als grampositiver Ring der Membran an (Abb. 2, *c*), wodurch eine Gram-Positivität der letzteren vorgetäuscht wird.

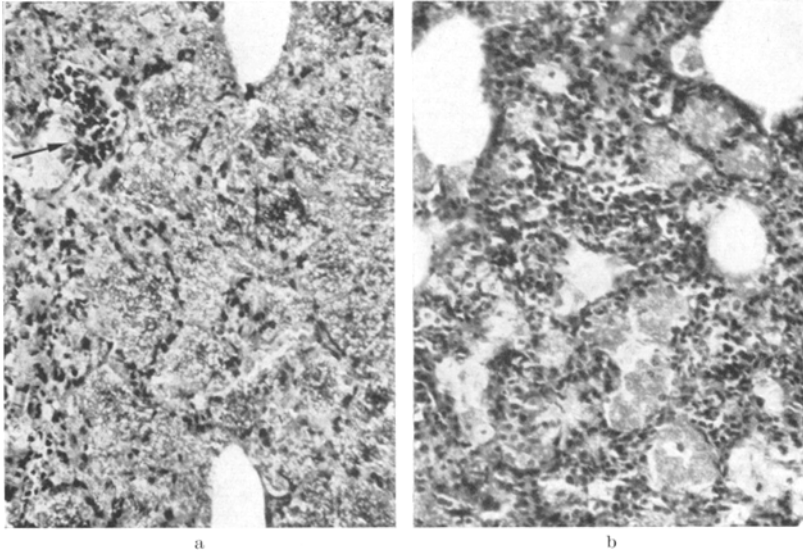


Abb. 1. a Lungenpneumocystose. Dichte Ausfüllung der Alveolen mit Pneumocystenwaben. Die Alveolarsepten schmal und reaktionslos. Perivaskuläres, rundzelliges Infiltrat (\uparrow). b Pneumocystis-Pneumonie. Lockere Ausfüllung einzelner Alveolargruppen mit Pneumocystenwaben. Die Alveolarsepten durch histiocytäre, lymphocytäre und plasmacelluläre Infiltration im Sinne einer interstitiellen Entzündung verbreitert.

HE, Vergr. 190fach

Weiter sieht man Cysten, in denen gleichzeitig mit der unterschiedlich strukturierten grampositiven Substanz runde, etwa $1\ \mu$ große, dichte, ebenfalls grampositive Körperchen auftreten (Abb. 2, *d*). Wieder andere Cysten enthalten bis zu acht dieser grampositiven und runden Körperchen (Abb. 2, *e*), während das übrige Cysteninnere optisch leer ist. Diese strukturell sehr dichten Körperchen möchten wir als *unreife Cystenkörperchen* bezeichnen. Sie lassen sich auch mit der Giemsa-Färbung in blauer Farbe erfassen, die in gleicher Farbe auch die umschließende, scharf konturierte Cystenmembran zur Darstellung bringt. Die anderen grampositiven Formen können dagegen mit der Giemsa-Färbung nicht dargestellt werden.

Die *reifen Cystenkörperchen*, ebenfalls mit der Giemsa-Färbung gut darzustellen, unterscheiden sich von den unreifen dadurch, daß sie eine

bei starker Vergrößerung sichtbare Feinstruktur aufweisen. Sie sind rund oder oval, im Ausstrichpräparat auch spindelförmig, $1-2\ \mu$ groß und gut voneinander abgegrenzt. Sie bestehen aus einer mäßig dichten, bei Giemsa-Färbung graubläulichen Substanz mit einem verdichteten, punktförmigen, blau gefärbten Bezirk (Abb. 3). Die einzelne Cyste enthält wiederum bis acht strukturierte, reife Cystenkörperchen, die

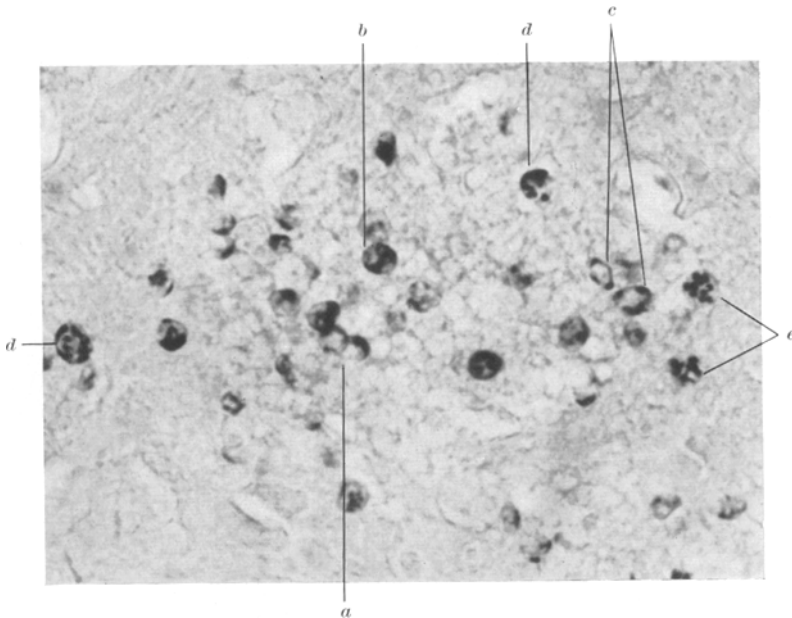


Abb. 2. Intraalveoläres Wabenwerk von *Pneumocystis Carinii* mit grampositiven Cystenformen (Übergangsformen). Die grampositive Innensubstanz ist sichel- (a), netz- (b) und ringförmig (c). Entwicklung von grampositiven unreifen Cystenkörperchen aus der grampositiven Innensubstanz (d). Cysten mit acht grampositiven, unreifen Cystenkörperchen (e).
Gram, Vergr. 990fach

jedoch den ansonsten optisch leeren Cysteninnenraum nicht ganz ausfüllen. Diese reifen Cystenkörperchen liegen weiterhin einzeln oder zu mehreren zwischen den übrigen *Pneumocysten*formen, ohne daß die umschließende Cystenmembran zu erkennen ist. Ihre Größe schwankt dann zwischen 2 und $4\ \mu$ im Durchmesser; bei den größeren von ihnen erscheint die Struktur etwas aufgelockerter, außerdem ist manchmal eine zarte Membran zu sehen.

Neben den *Pneumocysten*waben sieht man in den Alveolen desquamierter, unterschiedlich große und teils mehrkernige *Alveolardeckzellen*, die ein PAS-positives, fein- bis grobkörniges Cytoplasma besitzen. Außerdem fallen große, ovale, oft in Gruppen zusammenliegende Zellen mit chromatinreichem Kern und einem vacuolisierten, schaumigen,

schwach PAS-positiven Cytoplasma auf. Nur einige dieser Zellen sind feintropfig verfettet, bei den meisten scheint es sich um eine vacuoläre Umwandlung des Cytoplasmas mit Einlagerung von Flüssigkeit zu handeln. Insgesamt sind diese Zelltypen in den pneumocystenarmen Alveolarbezirken reichlicher vorhanden als in den pneumocystenreichen, wo sie kaum anzutreffen sind. Stellenweise in den Alveolen vorkommende feinkörnige oder schollige, schwach PAS-positive Massen sind nicht näher zu definieren. Es könnte sich um Zelldetritus oder zugrunde gegangene Pneumocysten handeln.

Die *Alveolarsepten* sind besonders bei intensivem, lobärem Pneumocystenbefall sehr schmal und erscheinen durch die in den Alveolen liegenden Pneumocystenmassen wie zusammengedrückt (Abb. 1a). Bei mittelstarker, herdförmiger Ausbreitung der Pneumocysten und besonders bei den Ratten, die nach einem cortisonfreien Intervall von 8 bis 10 Tagen (s. Versuch II) an einem stärkeren Pneumocystenbefall ihrer Lungen zugrunde gingen, zeigen die Alveolarsepten jedoch eine deutliche Verbreiterung (Abb. 1b), die sowohl durch eine Vermehrung histiocytärer Elemente als auch durch eine lymphocytäre und plasmacelluläre Infiltration bedingt ist. Um kleinere Lungengefäße herum finden sich des öfteren dichte Ansammlungen von Lymphocyten und Plasmazellen, die sich auf die nächstliegenden Alveolarsepten ausdehnen können (Abb. 1a).

Ein *Einschluß* von einzelnen oder mehreren Pneumocysten im Cytoplasma frei in der Alveolarlichtung liegender Zellen ist wohl stellenweise zu beobachten (Abb. 4 und 5), indessen im Verhältnis zur Masse der Pneumocysten und besagter Zellen ein seltener Befund. In Blut und Lymphgefäßen konnten keine Pneumocysten festgestellt werden, ebenso wenig im interstitiellen Gewebe.

Von Ratten mit hoch- und mittelgradigem Pneumocystenbefall der Lungen wurden Gehirn, Herz, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren und Lymphknoten des Lungenhilus an HE-, PAS- und GIEMSA-gefärbten

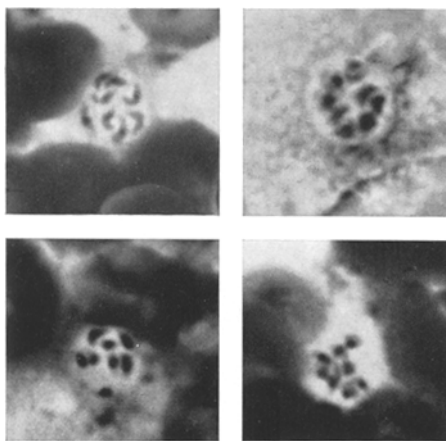


Abb. 3. Lungentupfpräparat. Cysten mit acht reinen, strukturierten Cystenkörperchen von runder oder sichelförmiger Gestalt, die jeweils einen verdichteten Bezirk aufweisen. Die umschließende Cystenmembran im Tupfpräparat nur undeutlich zu erkennen. Giemsa, Vergr. 2100fach

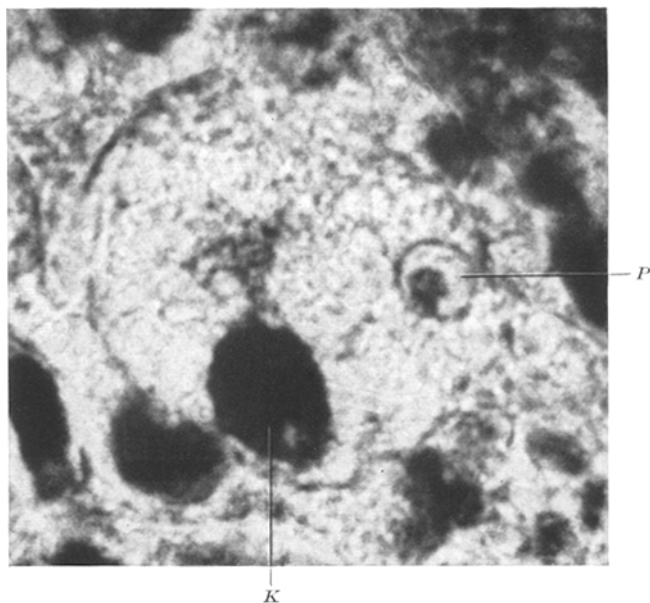


Abb. 4. Phagocytierte Cyste mit mehreren Cystenkörperchen (*P*) in einer Alveolarzelle mit schaumig umgewandeltem Cytoplasma. *K* Zellkern der Alveolarzelle. Giemsa, Vergr. 2600fach

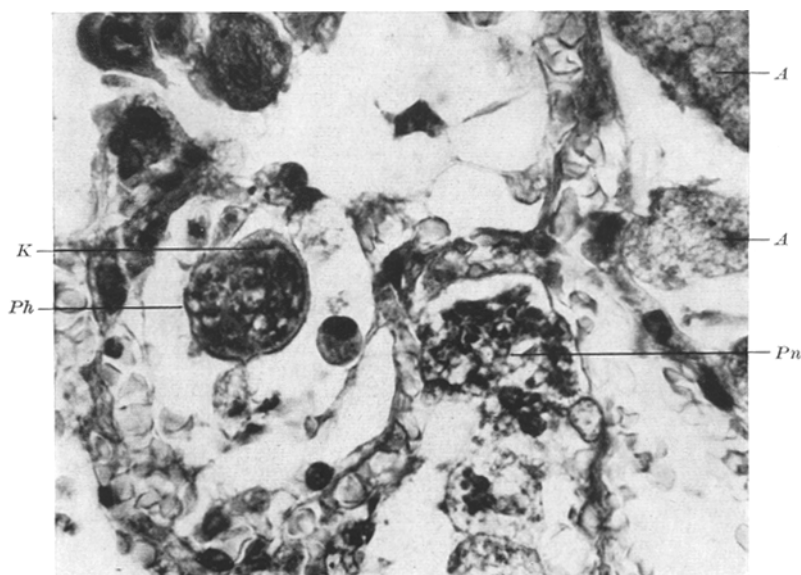


Abb. 5. Alveolarmakrophage (*Ph*) mit mehreren phagocytierten Pneumocysten. Sein Zellkern (*K*) eigentümlich verformt und der Zellwand anliegend. In benachbarter Alveole Pneumocystenwaben (*Pn*). Bei *A* Alveolarzellen mit schaumig umgewandeltem Cytoplasma. PAS, Vergr. 940fach

Schnitten untersucht. Pneumocysten konnten in diesen Organen nicht gefunden werden. Die übrigen Organbefunde waren unspezifischer Natur.

Außer dem „reinen“ Pneumocystenbefall der Rattenlungen fanden wir in einer Reihe von Fällen gleichzeitig mit den Pneumocysten eitrige, konfluierende und abscedierende *Herdpneumonien*, die teilweise auf eine

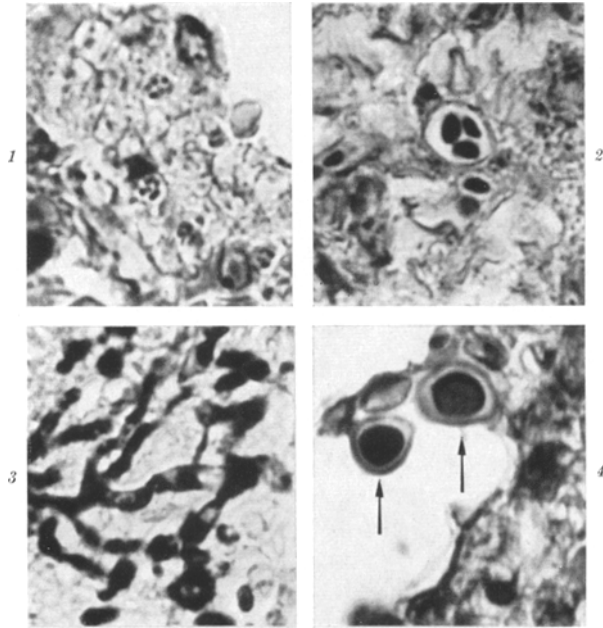


Abb. 6. Alle 4 Aufnahmen bei gleicher 1240facher Vergrößerung. Rattenlungen. 1 Wabenwerk von *Pneumocystis Carinii* mit 2 Cysten mit mehreren Cystenkörperchen (Giemsa), 2 *Saccharomyces octosporus*. Hefezelle mit 3 Ascosporen und frei in der Alveole liegende Sporen (PAS). 3 *Candida albicans*. Grampositives Pseudomycel und grampositive Blastosporen. 4 *Cryptococcus neoformans*. Hefartige Zellen (↑) mit breitem Stärkering (PAS)

gleichzeitige Infektion mit einem Pilz — eine *Aspergillus*art — zurückgeführt werden konnten. Mycel und Sporen dieses Pilzes waren von den verschiedenen Formen der in den benachbarten Alveolen liegenden Pneumocysten deutlich zu unterscheiden. Die Sporen hatten eine gleichfalls PAS-positive, aber sehr dicke Membran; den Cystenkörperchen entsprechende Strukturen konnten in ihnen nicht gefunden werden.

Um die Frage der *Hefenatur von Pneumocystis Carinii* [CSILLAG und BRANDSTEIN (1, 2), GIESE (1, 2), SIMON (1, 2) u. a.] weiter zu verfolgen, wurden je drei erwachsenen Ratten mittels Tracheotomie unter sterilen Kautelen zellreiche Aufschwemmungen von Kulturen von *Saccharomyces octosporus*, *Candida albicans* und *Cryptococcus* (*Torulopsis*) *neoformans* durch eine Sonde intrabronchial und -pulmonal instilliert, und zwar pro Tier 0,05 cm³ einer Aufschwemmung des entsprechenden Pilzes in 0,9%iger NaCl-Lösung. Gleichzeitig bekam jedes Tier pro

Tag 10 mg Cortison und 4000 E Hostamycin subcutan. Nach 5 Tagen wurden die Ratten getötet. Bei allen fand sich in mindestens einem Lungenlappen eine eitrige, konfluierende Bronchopneumonie mit den der vorangegangenen Infektion entsprechenden Pilzarten, die eine mehr oder minder deutliche Vermehrung zeigten. Im einzelnen wiesen sie folgende morphologische Kennzeichen auf:

Saccharomyces octosporus. Runde oder ovale, etwa $5-15\ \mu$ große Hefezelle mit scharf konturierter, relativ dicker PAS-positiver Membran. In den größeren und mehr walzenförmigen Zellen Ausbildung von acht ovalen, $2-3\ \mu$ großen, scharf abgegrenzten, dichten grampositiven Ascosporen. Der übrige Innenraum der ascosporenbildenden Hefezelle optisch leer (Abb. 6, 2). Frei in den Alveolen liegende Sporen von einem schmalen, hellen und glänzenden Saum umgeben.

Candida albicans. Runde bis ovale, $4-6\ \mu$ große, grampositive Zellen. Ausbildung von Pseudomycel mit Blastosporen (Abb. 6, 3).

Cryptococcus (Torulopsis) neoformans. Runde, $5-15\ \mu$ große, hefeartige Zellen mit homogener oder grobkörniger, grampositiver Binnensubstanz. Von einer breiten, schwach PAS-positiven, hell glänzenden Kapsel eingehüllt, die besonders beim Tuschkverfahren nach BURRI als heller Ring aufscheint und aus Stärke besteht. Durch Knospung entsteht jeweils eine einzige neue Zelle (Abb. 6, 4).

Alle diese Befunde zeigten keine Übereinstimmung mit den bei *Pneumocystis Carinii* (Abb. 6, 1) vorhandenen Strukturen.

Diskussion

Auftreten und Intensität des Pneumocystenbefalles in den Rattenlungen sind von 2 Bedingungen abhängig: Einmal müssen die Tiere bei ständiger Resistenzabschwächung bis über den 40. Behandlungstag hinaus am Leben erhalten werden, da vorher ein histologisch faßbarer Pneumocystenbefall nicht entsteht; zum anderen muß die Resistenzverminderung besonders von diesem Termin an groß genug sein. Unter diesen Bedingungen läßt sich nicht nur eine große Ausbeute an Tieren mit Pneumocysten, sondern auch eine intensive Ausbreitung der Pneumocysten in den Rattenlungen erreichen (s. Tabelle 2 und 3). Das Lebensalter der Tiere hat abgesehen von der Cortisonüberempfindlichkeit sehr junger Ratten und ihrer deshalb verfrühten Absterberate keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse. Diese liegen mit 87% positiver Ratten in Versuch II über den Ergebnissen von WELLER (2) (65%) und GOETZ und RENTSCH (75%), die ebenfalls mit einem großen Tiermaterial arbeiteten.

Ein Vergleich zwischen den Cystenformen in den Lungen unserer Versuchstiere mit den bei der *Pneumocystis*-Pneumonie des Säuglings beschriebenen [VANEK und JIROVEC, JIROVEC und VANEK (1, 2), HAMPERL (1), PLIESS (1), BACHMANN] zeigt weitgehende Übereinstimmung nicht nur in Form, Größe und Struktur, sondern auch in der Bildung des charakteristischen, intraalveolären Wabenwerkes. Der meistens herdförmige, in mehreren Fällen aber auch lobäre Pneumocystenbefall in den Rattenlungen läßt ebenfalls *keine wesentlichen Unterschiede zur menschlichen Pneumocystis-Pneumonie* erkennen.

Demgegenüber führen PLIESS und TRODE eine vorwiegend kleinherdige und geringgradige Ausbreitung der Pneumocysten in den Lungen ihrer Versuchsratten zusammen mit einer nur mangelhaften interstitiellen Entzündung als wichtiges Unterscheidungsmerkmal der Rattenpneumocystose gegenüber der typischen Pneumocystis-Pneumonie des Säuglings an, die mit einer interstitiellen, plasmacellulären Entzündung einhergeht. Das Ausbleiben bzw. eine nur geringe Entwicklung der interstitiellen Entzündung fiel bei unseren Tieren besonders dann auf, wenn die Lungen einen sehr kräftigen und ausgedehnten Pneumocystenbefall aufwiesen. Hier war also lediglich eine *Lungenpneumocystose* vorhanden. In den Rattenlungen mit mittelkräftigem Pneumocystenbefall war dagegen eine interstitielle Entzündung, gekennzeichnet durch Verbreiterung und histiocytäre sowie plasmacelluläre und lymphocytäre Infiltration der Alveolarsepten, zu beobachten. Dieses besonders bei den Tieren, die nach einem 10tägigen cortisonfreien Intervall zugrunde gingen. In derartigen Fällen kann von einer richtigen *Pneumocystis-Pneumonie* gesprochen werden. Der Einfluß des in hohen Dosen verabreichten Cortisons, welches neben der allgemeinen Resistenzschwächung auch entzündungs- und proliferationshemmend (LEUTHARDT, SCHMID-BIRCHER) wirkt, darf bei der Beurteilung der interstitiellen Reaktion nicht vernachlässigt werden. Nach unseren Beobachtungen besteht folgende Wechselwirkung: Bei hoher und langandauernder Cortisondosierung und dementsprechend maximaler Resistenzschwächung ist der Pneumocystenbefall sehr intensiv, die interstitielle Entzündung nicht oder nur angedeutet vorhanden; bei kleinerer und kürzerer Dosierung oder nach Absetzen des Cortisons und damit geringerer Resistenzschwächung ist der Pneumocystenbefall nur mittelgradig, die interstitielle Entzündung dagegen ausgeprägt. Weiter muß daran gedacht werden, daß die interstitielle, entzündliche Reaktion auch bei der menschlichen Pneumocystis-Pneumonie unterschiedlich stark entwickelt sein kann [HAMPERL (2)].

Den von uns des öfteren beobachteten Einschluß einzelner oder mehrerer Cysten im Cytoplasma von Alveolarmakrophagen halten wir für eine *Phagocytose*, wie sie auch schon von HAMPERL (3) bei der menschlichen Pneumocystis-Pneumonie aufgezeigt werden konnte. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß eine einzelne phagocytierte Cyste sich intracellulär vermehrt. Dadurch würde das Bild eines mit mehreren Cysten ausgefüllten Alveolarmakrophagen (Abb. 5) — der Pneumocystiszelle nach PLIESS und TRODE —, entstehen.

Für eine von vornherein *intracelluläre Entwicklung der Pneumocysten* aus sog. Globularkörpern, wie PLIESS und TRODE auf Grund phasenkontrastmikroskopischer Untersuchungen an pneumocystenhaltigen Rattenlungen neuerdings annehmen, konnten wir jedoch in Schnitt-

und Tupfpräparaten keinen Anhalt finden. Die desquamierten Alveolardeckzellen mit fein- und grobkörnigem, PAS-positivem oder schaumig-vacuolisiertem, schwach PAS-positivem Cytoplasma zeigten keinen Übergang in angrenzende Pneumocystisstrukturen. Vielmehr hatte man den Eindruck, daß diese Zellen bei ihrem Zerfall von den sich ausbreitenden Pneumocystiswaben überwuchert wurden. Wir sind deshalb nach wie vor der Ansicht, daß es sich bei der Lungenpneumocystose bzw. Pneumocystis-Pneumonie der Ratten um echte Pneumocystisstrukturen im Sinne der interstitiellen plasmacellulären Pneumocystis-Pneumonie des Säuglings handelt.

Eine Übertragung des Parasiten vom Menschen auf die Ratte scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich zu sein. Der prozentual ungefähr gleiche Pneumocystenbefall bei „infizierten“ Ratten und Kontrollratten (s. Tabelle 2) deutet vielmehr darauf hin, daß *Pneumocystis Carinii* von vornherein in den Lungen gesunder Ratten vorkommt, wie auch schon WELLER (1, 2), LINHARTOVA, GOETZ und RENTSCH vermuten. Dafür spricht auch, daß CARINI und MACIEL und weiter DELANOE und DELANOE Pneumocystis erstmalig bei Ratten beschrieben und daß JIROVEC und VANEK (1) in der Lunge einer gesunden Ratte eine Cyste mit 8 Cystenkörperchen fanden. Offenbar beginnt erst bei maximaler Resistenzschwächung des Wirtstieres der Parasit sich zu vermehren und auszubreiten.

Die verschiedenen Formen des Erregers in den Rattenlungen entsprechen wie bei der Pneumocystis-Pneumonie des Säuglings [VANEK und JIROVEC, JIROVEC und VANEK (1, 2), PLIESS (1, 2)] den einzelnen Stadien eines zu Anfang kurz skizzierten *Vermehrungszyklus*. In diesem spielen die grampositiven Cystenformen mit ihrer vielfältig strukturierten Innensubstanz bzw. Matrix [PLIESS (2)] die Rolle des Übergangsstadiums zu den Cysten mit mehreren Cystenkörperchen [JIROVEC und VANEK (1), WESSEL und RICKEN]. Aus der Matrix entwickeln sich die unreifen und aus diesen die reifen Cystenkörperchen (Tochterindividuen). Da diese Entwicklung nicht schubweise, sondern augenscheinlich kontinuierlich erfolgt (Abb. 2), können die derbwandigen Cysten eine unterschiedliche Zahl von Cystenkörperchen enthalten. Nur in ausgereiften Cysten sind mit Sicherheit 8 Tochterindividuen zu erwarten. In den Rattenlungen scheint sich der Parasit nur auf diese Art zu vermehren, da wir eine einfache Zweiteilung im Gegensatz zu den Befunden beim Menschen [JIROVEC und VANEK (1)] nicht feststellen konnten. Auch die von BRUNS und BÖTTGER beschriebenen Sprossungen konnten nicht beobachtet werden.

Die *Klassifizierung* von *Pneumocystis Carinii* stößt auf Schwierigkeiten, da es bis jetzt noch nicht gelungen ist, den Parasiten *in vitro*

zu züchten [JIROVEC und VANEK (2), LADSTÄTTER, PLIESS (3)]. Auch Kultivierungserfolge von Hefen aus pneumocystenhaltigen Säuglingslungen [GIESE (2), CSILLAG, CSILLAG und BRANDSTEIN (1, 2), BAUCH und LADSTÄTTER, SIMON (1, 2)] sind für die Hefenatur des Parasiten nicht beweisend, weil die Pilze allein und zusätzlich zu Pneumocystis im Respirationstrakt resistenzgeschwächter Säuglinge vorkommen können [JIROVEC und VANEK, BÜSCHER, GLEISS, GRÜN und LEPPELMANN, HEYMER und DOEPFNER, KALKOFF]. Eine Sekundärinfektion mit Pilzen trat auch in mehreren unserer pneumocystenhaltigen Rattenlungen auf.

Im Tierexperiment unterscheiden sich *Lungeninfektionen mit Saccharomyces octosporus*, *Candida albicans* und *Cryptococcus (Torulopsis) neoformans* von der Pneumocystis-Pneumonie schon dadurch, daß sie unter dem Bild einer eitrigen Herdpneumonie ablaufen. Während *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* pneumocystenartige Strukturen vermissen lassen, bestehen zwischen den ascosporenbildenden Zellen von *Saccharomyces octosporus* und den Cysten mit mehreren Cystenkörperchen strukturelle Ähnlichkeiten (Abb. 6). GIESE (1, 2), CSILLAG und BRANDSTEIN (1, 2), KOVAC und KUNZ rechnen *Pneumocystis Carinii* deshalb zu den ascosporogenen Hefen. Nach unseren Beobachtungen bestehen jedoch zwischen *Saccharomyces octosporus* und *Pneumocystis Carinii* beträchtliche Größenunterschiede, was auch für die von CSILLAG und BRANDSTEIN (1, 2), KOVAC und KUNZ abgebildeten ascosporogenen Hefen gilt, die sie nach Infektionsversuchen in Mäuselungen vorfanden und als Pneumocysten deuteten. In diesen Versuchen wurden ebenso wie bei unseren drei mit *Saccharomyces octosporus* infizierten Ratten das charakteristische Wabenwerk von *Pneumocystis Carinii* vermißt. Bei unseren mit pneumocystenhaltigem Lungenmaterial infizierten und resistenzgeschwächten Mäusen konnten wir weder Pneumocysten noch ascosporenbildende Hefen nachweisen.

Aus diesen Gründen, zu denen noch das Fehlen von Sprossungsvorgängen bei *Pneumocystis Carinii* kommt, erscheint, wie schon JIROVEC und VANEK (1, 2) betonten, die *Zugehörigkeit des Parasiten zu den Hefen als unwahrscheinlich*. Wir möchten *Pneumocystis* der Struktur und dem Vermehrungsmodus nach zu den Protozoen zählen. Dafür sprechen auch unsere vorangegangenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Eine besondere Eigenart dieses Keimes ist es, daß er sowohl im Tierexperiment wie auch beim Säugling [GOEBEL, OEHLERT, RUDOLPH und SCHNEPPENHEIM; PLIESS (4)] nur in den Lungen wächst und sich ausbreitet.

Zusammenfassung

Bei 77 unterschiedlich alten Ratten konnte durch langandauernde Resistenzschwächung mit hohen Cortisondosen nach der Methode von WELLER (1) eine Lungenpneumocystose bzw. eine regelrechte Pneumo-

cystis-Pneumonie erzeugt werden. Diese Befunde traten sowohl bei den vorher mit pneumocystenhaltigem Lungenmaterial infizierten als auch bei den lediglich mit Cortison resistenzgeschwächten Kontrollratten auf. Letzteres spricht für die Aktivierung einer von vornherein bei Ratten vorhandenen, latenten Pneumocystisinfektion und gegen die Möglichkeit einer Übertragung des Parasiten von Mensch auf Tier unter den gegebenen Versuchsbedingungen.

Die Intensität der in vielen Fällen vorhandenen interstitiellen Entzündung steht in indirektem Verhältnis zum Grad der Resistenzverminderung und der Schwächung der mesenchymalen Reaktionen durch Cortison.

Die in den Rattenlungen auftretenden Formen von *Pneumocystis Carinii* sind identisch mit den bei der *Pneumocystis*-Pneumonie des Säuglings beschriebenen. Sie machen in den Lungenalveolen einen Vermehrungszyklus durch. Das Vorkommen von *Pneumocystis Carinii* in Alveolarzellen wird als Ergebnis einer Phagocytose gedeutet.

Pneumocystis Carinii ist strukturell, größenordnungs- und wachstumsmäßig von Hefe zu unterscheiden und wird als ein Protozoid aufgefaßt.

Summary

In 77 rats of various ages a pulmonary pneumocystosis or a regular pneumocystis-pneumonia could be produced by lowering their resistance with high doses of cortisone according to the method of WELLER (1). These pulmonary changes were seen in rats „infected“ with pneumocystis-containing lung material from human cases as well as in control animals treated only with cortisone. Obviously an activation of a latent pneumocystis-infection of the rats occurs.

The animals with the lowest resistance show only pneumocystosis of the lungs; the animals with higher resistance a chronic interstitial inflammation (pneumocystis-pneumonia).

The forms of *Pneumocystis Carinii* in rat lungs are identical with the forms described in pneumocystis-pneumonia of infants. In the alveoli the parasites reproduce in a certain cycle. The appearance of *Pneumocystis Carinii* in alveolar cells is interpreted as a result of a phagocytosis.

Pneumocystis Carinii can be distinguished easily by structure, size and type of growth from several yeasts examined for comparative purposes. It is believed to be a protozoan.

Literatur

BACHMANN, K. D.: Die derzeitige Problematik der interstitiellen Pneumonie. Münch. med. Wschr. 1954, 805. — BAUCH, R., u. L. LADSTÄTTER: *Pneumocystis*

Carinii und interstitielle plasmacelluläre Pneumonie der Frühgeborenen. *Klin. Wschr.* **1953**, 800. — BRUNS, G., u. D. BÖTTGER: Ein Beitrag zur Histotopochemie der Pneumocystis Carinii. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 278 (1955). — BÜSCHER, L., J. GLEISS, L. GRÜN u. E. LEPPELMANN: Blastomykose und interstitielle plasmazelluläre Pneumonie der Frühgeburt. Beiträge zum Frühgeburtenproblem der Gegenwart. VI. Mitt. *Z. Kinderheilk.* **73**, 217 (1953). — CARINI, A., u. J. MACIEL: Über Pneumocystis Carinii. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **77**, 46 (1916). — CSILLAG, A.: Contribution to the taxonomical classification of the so-called Pneumocystis Carinii. *Acta microbiol. (Budapest)* **4**, 1 (1957). — CSILLAG, A., and L. BRANDSTEIN: (1) The rôle of a blastomyces in the etiology of interstitial plasmocytic pneumonia of the premature infant. *Acta microbiol. (Budapest)* **2**, 179 (1954). — (2) Zur Pathogenetik der interstitiellen Lungenentzündungen bei Säuglingen. *Naturwiss.* **41**, 339 (1954). — DELANOE, M. et Mme. DELANOE: Sur les rapports des Kystes de Carinii du poumon des rats avec le trypanosoma Lewisii. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **155**, 658 (1912). — GIESE, W.: (1) Pathogenese und Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **36**, 284 (1952). — (2) Die Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. *M Schr. Kinderheilk.* **101**, 147 (1953). — GOEBEL, A., W. OEHLERT, G. RUDOLPH u. P. SCHNEPPENHEIM: Organveränderungen bei interstitieller plasmazellulärer Pneumonie. *Z. Kinderheilk.* **76**, 340 (1955). — GOETZ, O., u. L. RENTSCH: Weitere Untersuchungen zur experimentellen Rattenpneumocystose. *Z. Kinderheilk.* **79**, 478 (1957). — HAMPERL, H.: (1) Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstitiellen plasmacellulären Pneumonie. *Klin. Wschr.* **1952**, 820. — (2) Variants of pneumocystis pneumonia. *J. Path. Bakt.* **74**, 353 (1957). — (3) Über heilende und abortive Pneumocystis-Pneumonie. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 325 (1957). — HEYMER, T., u. R. DOEPFNER: Über die Pilzflora der Mundhöhle. *Arch. klin. exp. Derm.* **204**, 374 (1957). — JIROVEC, O.: Über die durch Pneumocystis Carinii verursachte interstitielle Pneumonie der Säuglinge. *M Schr. Kinderheilk.* **102**, 476 (1954). — JIROVEC, O., u. J. VANEK: (1) Zur Morphologie der Pneumocystis Carinii und zur Pathogenese der Pneumocystis-Pneumonie. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **92**, 424 (1954). — (2) Weitere Beiträge zur Morphologie von Pneumocystis Carinii. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **94**, 499 (1955/56). — KALKOFF, K. W.: Zur Kenntnis der Candidamykose. *Münch. med. Wschr.* **1958**, 957. — KOVAC, W., u. CH. KUNZ: Experimentelle Untersuchungen mit Pilzstämmen aus Frühgeburtenpneumonien. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **168**, 460 (1957). — LADSTÄTTER, L.: Kulturversuche bei interstitieller, plasmacellulärer Pneumonie. *Klin. Wschr.* **1954**, 1044. — LEUTHARDT, FR.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1957. — LINHARTOVA, A.: Experimentelle Pneumocystose bei Ratten. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **167**, 178 (1956). — PLIESS, G.: (1) Die Pneumocystis Carinii und ihre Bedeutung bei der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Frankfurt. *Z. Path.* **64**, 184 (1953). — (2) Das mikrokulturelle Verhalten von Alveolarzellen und von Pneumocystis Carinii bei der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Frankfurt. *Z. Path.* **68**, 153 (1957). — (3) Das mikrokulturelle Verhalten von Hefezellen und Bakterien bei der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Frankfurt. *Z. Path.* **66**, 185 (1957). — (4) Interstitielle, plasmazelluläre Pneumonie als Allgemeinerkrankung. Frankfurt. *Z. Path.* **68**, 565 (1957). — PLIESS, G., u. H. TRODE: Experimentelle Pneumocystose. Frankfurt. *Z. Path.* **69**, 231 (1958). — SCHMID-BIRCHER, M.: Histologische Organveränderungen beim Kaninchen durch hohe Cortisondosen. *Beitr. path. Anat.* **114**, 136 (1956). — SIMON, H.: (1) Die sog. Pneumocystis Carinii, eine besondere Vegetationsform des Soor. *Naturwiss.* **40**, 625 (1953). — (2) Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Ätiologie und Pathogenese der interstitiellen plasmazellu-

lären Pneumonie der Frühgeburten und Säuglinge. Verh. dtsh. Ges. Path. **40**, 219 (1956). — VANEK, J., u. O. JIROVEC: Parasitäre Pneumonie. Interstitielle Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch Pneumocystis Carinii. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **158**, 120 (1952). — WELLER, R.: (1) Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch. Z. Kinderheilk. **76**, 366 (1955). — (2) Weitere Untersuchungen über experimentelle Rattenpneumocystose im Hinblick auf die interstitielle Pneumonie der Frühgeborenen. Z. Kinderheilk. **78**, 166 (1956). — WESSEL, W., u. D. RICKEN: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Pneumocystis Carinii. Virchows Arch. path. Anat. **331**, 545 (1958).

Dr. med. DIETER RICKEN,
Medizinische Klinik der Universität Bonn-Venusberg