

Miscellanea : Testen von Antimalaria-Mitteln an Plasmodium gallinaceum im Darm von Aedes aegypti

Autor(en): **Geigy, R. / Rahm, U.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **6 (1949)**

Heft 2

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-310233>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Testen von Antimalaria-Mitteln an *Plasmodium gallinaceum* im Darm von *Aedes aegypti*.¹

Von R. GEIGY und U. RAHM
Schweizerisches Tropeninstitut, Basel.

(Eingegangen am 4. April 1949.)

Solange es nicht möglich oder zum mindesten noch mit Schwierigkeiten verbunden ist, Malaria-Plasmodien im Laboratorium auf Kleinsäugetern zu halten, wird die Vogel malaria zum Testen und zum Kontrollieren der plasmodiziden Wirkung verschiedener Substanzen stets herangezogen werden müssen. Allgemein eingeführt ist der Test am Warmblüter (Hühnchen, Kanarienvogel, Reiskuckuck usw., je nach Plasmodienart). Dagegen ist unseres Wissens erst in den letzten Jahren damit begonnen worden, die Wirkung solcher Substanzen auch am sexuellen Zyklus des Plasmodiums in der Mücke auszuprobieren (*Terzian* 1947, *Johnson* und *Akins* 1948, *Whitman* 1948). Wir haben uns in der letzten Zeit ebenfalls mit der Ausarbeitung eines solchen Mückentestes befaßt und geben hier die ersten, an *Plasmodium gallinaceum* erzielten Resultate bekannt. *Aedes aegypti* infiziert sich zu durchschnittlich 95% an gametentragenden Hühnchen.

Zeitlich und räumlich kann der Wirkungsbereich des Mückentestes folgendermaßen abgesteckt werden. Die Exflagellation der Mikro gameten, die Befruchtung der Makro- durch die Mikro gameten und die daraus resultierende Ookinetenbildung findet bei konstanten Versuchsbedingungen (Temperatur 26° C, relative Luftfeuchtigkeit 85%) innerhalb der ersten 12 Stunden statt, die auf die infizierende Blutmahlzeit folgen. Bald darauf entstehen in der Darmwand die ersten Sporocysten und werden vom 4. Tage an als solche deutlich erkennbar. Am 9. und 10. Tag haben die Cysten ihre Endreife erreicht, platzen auf und lassen die Sporozoiten in die Leibeshöhle ausschwärmen. Vom 10. Tag an dringen die Sichelkeime in die Speicheldrüsen ein, und man kann vom 12. Tag an mit Sicherheit damit rechnen, daß diese Organe infiziert und daß sämtliche Darmcysten geplatzt sind. Es gibt theoretisch vier Möglichkeiten, den Malaria-Parasiten mit den zu testenden Mitteln in Kontakt zu bringen:

1. die Gameten und Ookineten im Darmlumen;
2. die Entwicklungsstadien der Sporozoiten in den an der Außenseite der Darmwand sitzenden Cysten;
3. die schwärmenden Sichelkeime in der Hämolymphe der Mücke, und
4. die in den Speicheldrüsen festgesetzten Sporozoiten.

Zu Punkt 3 ist zu sagen, daß diese «Schwärmzeit» etwas kurz ist, so daß es technisch schwierig ist, die Keime während der wenigen Stunden, wo sie sich in der Hämolymphe zwischen der Darmwand und den Speicheldrüsen aufhalten, zu treffen und gegebenenfalls die Speicheldrüseninfektion einwandfrei zu verhindern. Wir haben uns deshalb dieser an sich sehr interessanten Frage bis jetzt noch nicht besonders gewidmet. Ebenso wenig haben wir Punkt 4 abgeklärt, ob es nämlich möglich ist, die in den Drüsenzellen sitzenden Sichelkeime mit einem Antimalaria-Mittel, das in den Mückendarm eingegeben wird, überhaupt zu erreichen. Es soll deshalb hier ausschließlich über die Anwendung der Methode auf Punkt 1 und 2 berichtet werden.

Das Prinzip des Testes besteht darin, daß man die zu untersuchende Substanz in den Mückendarm eingibt. Die Weibchen von *Aedes aegypti* ernähren sich in erster Linie von Blut; dieses wird durch den Rüssel aufgesaugt und gelangt via

¹ Ermöglicht durch Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes.

Oesophag und Proventrikel direkt in den Mitteldarm. Zwischen den Blutmahlzeiten nehmen die Weibchen aber auch gerne süße Flüssigkeiten wie Blütennektar, Zuckerwasser, Honigsaft usw. auf. Diese gelangen aber bekanntlich nicht direkt in den Mitteldarm, sondern werden zuerst vorübergehend im ventral in den Oesophag mündenden unpaaren Blindsack, dem sogenannten Vormagen oder Kropf, gespeichert. Die Resorption des Honigsaftes erfolgt erst später im Mitteldarm. Von diesen Voraussetzungen ausgehend, konnten wir nun die folgenden beiden Testmethoden ausarbeiten.

1. Einwirkung von Substanzen auf Gameten und Ookineten im Darmlumen.

Die Testsubstanz wird in einem bestimmten Prozentsatz einem Quantum Honigwasser beigegeben und dieser sogenannte Testsaft einer größeren Anzahl frischgeschlüpfter Aedes-Weibchen nach einer ca. 48stündigen Hungerperiode angeboten. Während 2 Tagen läßt man den Mücken Gelegenheit, den Saft aufzunehmen, was sie auch alle ausnahmslos tun². Es folgt dann eine zweitägige Hungerperiode, während welcher der Testsaft aus dem Kropf in den Mitteldarm gelangt und dort zum Teil resorbiert wird. Sodann werden die Mücken auf ein ca. dreiwöchiges Kücken gebracht, das seit 9—12 Tagen mit *Plasmodium gallinaceum* infiziert ist und somit, wie eine gleichzeitige Blutkontrolle unter dem Mikroskop bestätigt, in vielen Erythrocyten Mikro- und Makrogametocyten führt. Alle Weibchen, die Blut aufgenommen haben, werden nun abgesondert in einem großen Lampenglas gehalten, wo ihnen noch gewöhnliches Honigwasser geboten wird. Nach 7 weiteren Tagen, also nach einer Zeit, wo sich sicher sämtliche Cysten gebildet haben müssen, erfolgt die Autopsie. Im Gegensatz zu *Terzian* (1947) und *Johnson und Akins* (1948), von denen sich der erste offenbar darauf beschränkte, Mückenemulsionen mikroskopisch auf ihren Sporozoitengehalt bzw. serologisch auf ihr Infektionsvermögen beim Hühnchen zu prüfen, während die zweiten Autoren auf die mikroskopische Kontrolle der Speicheldrüsen abstellten, haben wir — wohl ähnlich wie *Whitman* (1948) — der individuellen Kontrolle der einzelnen Mückendärme den Vorzug gegeben. Der Darm wird in Ringerscher Lösung für Insekten herauspräpariert und mit der Rollmethode sorgfältig auf Cystenbefall durchsucht. Besitzt die zu prüfende Substanz plasmodizide Wirkung, so konnten sich die mit dem Blut aufgenommenen Gameten, die sich im Mitteldarm mit dem Testsaft mischten, nicht weiterentwickeln; die Ookineten- und Cystenbildung unterblieb infolgedessen. Ist dagegen die Substanz nur schwach wirksam, so finden sich nur bei einem bestimmten Prozentsatz der Därme Cysten in reduzierter bzw. in normaler Zahl; ist die Substanz unwirksam, so ergibt sich normaler Cystenbefall bei mindestens 95% der Versuchsmücken.

In der Tabelle sind einige wenige Beispiele der von uns erhaltenen Resultate aufgeführt, lediglich um das Prinzip des Testes zu zeigen. Im Bestreben, eine Basis für das Testen neuer Präparate zu erhalten, haben wir zunächst bekannte Malariamittel wie Paludrin (in 2 Varianten) und Atebrin auf ihre Wirksamkeit im Mückendarm getestet. Die Konzentrationen wurden variiert, um einerseits die unterste Grenze der Wirksamkeit zu ermitteln, andererseits um festzustellen, ob das Mittel bei höheren Konzentrationen auf die Mücke toxisch wirkt, was, wie das Atebrin zeigt, der Fall sein kann. Es erwies sich, daß das Paludrin, das ja

² Den objektiven Nachweis der Aufnahme des Honigsaftes bzw. des Antimalariamittels haben wir dadurch erbringen können, daß wir diesem besondere Farbstoffe beimischten, welche uns im Mückenkörper den jeweiligen Standort des Testsaftes erkennen ließen.

für seine gute Wirkung auf den extraerythrocytären Teil des Plasmodienzyklus im Menschen bekannt ist, in relativ sehr geringen Dosen auch die Stadien von *Plasmodium gallinaceum* im Mückendarm abtötet. Fast ebenso wirksam zeigte sich das Atebrin.

Unter den hier aufgeführten Substanzen, die auf ihre plasmodizide Wirkung untersucht wurden, war das Präparat I, ähnlich wie das Atebrin, in höheren Konzentrationen für die Mücken toxisch; allerdings erst von einer Dosis von 6,66% an, währenddem Atebrin schon in 10mal schwächerer Konzentration toxisch wirkt. Im übrigen zeigen die Präparate I und II gute Wirkung, indem sie beide noch bei 1,81 bzw. 1,66% die Cystenbildung gänzlich verhindern. Allerdings erreichen sie noch nicht die mit Paludrin und Atebrin gewonnenen Resultate. Die Präparate III und IV sind praktisch unwirksam.

Testsubstanz	Konzentration: Mittel in Honigwasser	Anzahl der sezierten Mücken	davon		Infizierte Mücken %
			mit mehr oder weniger Cysten (d. h. ungenügend oder nicht wirksam)	ohne jede Cyste (d. h. wirksam)	
Paludrin A	0,66%	14	0	14	0
	0,18%	13	0	13	0
	0,09%	10	0	10	0
	0,04%	9	4	5	44
Paludrin B	0,18%	11	0	11	0
	0,09%	10	2	8	20
Atebrin	0,66%	Toxisch für die Mücken, sämtliche eingegangen			
	0,18%	14	4	10	14
	0,09%	12	0	12	0
Präparat I	6,66%	Toxisch für die Mücken, sämtliche eingegangen			
	4,00%	8	0	8	0
	1,81%	18	0	18	0
	0,95%	14	13	1	92,5
	0,49%	10	10	0	100
Präparat II	2,00%	6	0	6	0
	1,66%	10	0	10	0
	0,90%	5	4	1	80
	0,90%	15	11	4	73
Präparat III	2,00%	13	10	3	76
	0,90%	14	11	3	78
	0,90%	12	10	2	83
Präparat IV	2,00%	13	13	0	100
	0,80%	14	13	1	92
	0,36%	10	10	0	100

2. Einwirkung von Substanzen auf die Darmcysten.

Um nun festzustellen, ob bereits gebildete Darmcysten durch Antimalariamittel abgetötet werden können, mußte die eben beschriebene Methode etwas variiert werden. Die Mückenweibchen erhalten in diesem Fall zuerst die in-



Abb. 1.
 Normale Sporocyste am 9. Tag nach der
 Blutmahlzeit. Vergrößerung 1125 \times .

Abb. 2.
 Reife geplatzte Cyste.
 Vergrößerung 1125 \times .

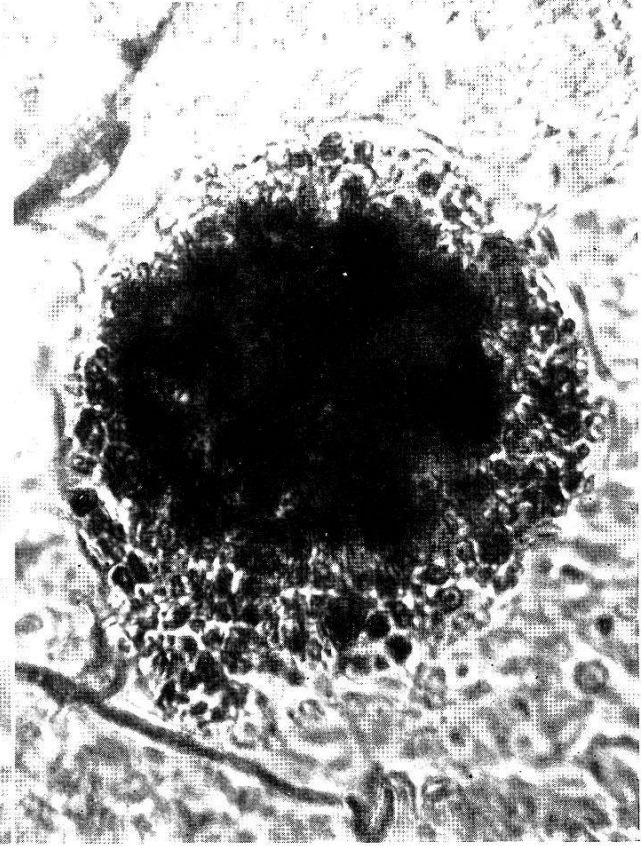
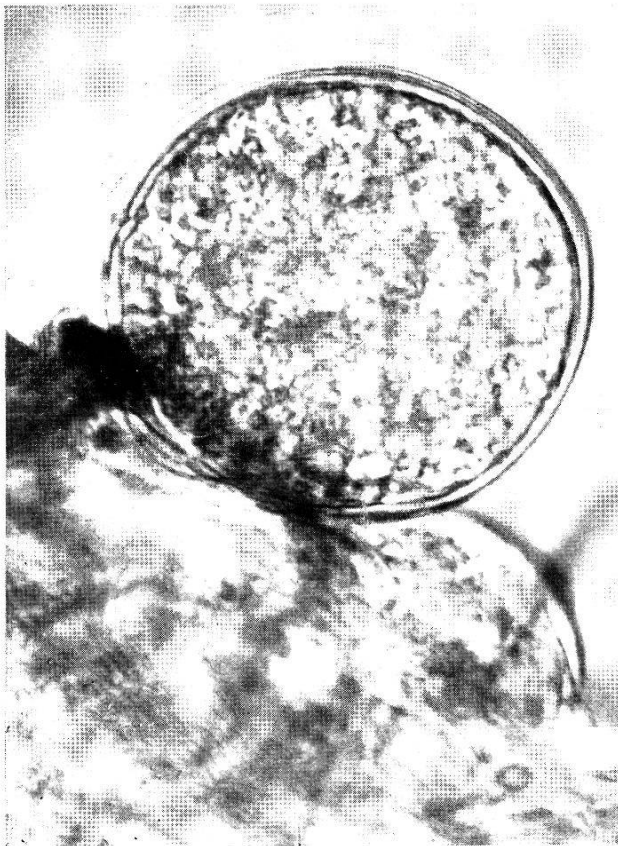


Abb. 3.
 Cysten am 9. Tag nach der infizierenden Blutmahlzeit durch Paludrin gehemmt.
 Mikrophotographie 10 Tage später.
 Vergrößerung 1125 \times .

Abb. 4.
 Cysten am 9. Tag nach der infizierenden Blutmahlzeit durch Paludrin gehemmt.
 Mikrophotographie 14 Tage später.
 Vergrößerung 1125 \times .

fizierende Blutmahlzeit am Hühnchen. Sodann hält man sie während 4 Tagen bei Honigwasser und läßt dann eine zweitägige Hungerperiode folgen. Nach diesen 6 Tagen, d. h. wenn die Cysten bereits gebildet sind, wird der Testsaft verabfolgt, und einige Tage später kann dann in verschiedenen Zeitabständen autopsiert werden, um eine allfällige Wirkung auf die Cysten festzustellen. Wir möchten hier lediglich auf einige mit Paludrin erzielte Resultate hinweisen, aus denen eine deutliche Wirkung auf die Cysten hervorgeht.

Läßt man 8 Tage nach der infizierenden Blutmahlzeit Paludrin in Honigwasser auf die Darmwand einwirken, so werden die Cysten offensichtlich in ihrem Wachstum gehemmt. Autopsiert man nämlich solche Mücken 6 Tage später, d. h. 14 Tage nach der Blutmahlzeit, also zu einem Zeitpunkt, wo bereits alle Cysten geplatzt und entleert sein sollten, so findet man die Därme immer noch mit Cysten mittlerer Größe besetzt.

Erfolgt die Wirkung des Paludrins auf die Darmwand am 9. Tag nach der infizierenden Blutmahlzeit, und autopsiert man 10 Tage später, so erhält man etwas größere Cysten als im Fall vorher, denn sie konnten sich um einen ganzen Tag länger entwickeln, bevor sie durch das Paludrin gehemmt wurden. Sie sind aber dann ebenso gründlich blockiert worden, konnten weder heranreifen noch platzen und zeigen einen granulös-durchscheinenden Inhalt (Abb. 3). Im histologischen Bild erkennt man, daß sich die Keimanlagen der Sporozoiten in den Cysten entweder in voller Degeneration befinden oder sich bereits zu einer indifferenten granulösen Masse aufgelöst haben.

Autopsiert man gleich behandelte Därme statt nach 10 nach 14 Tagen, so stellt man fest, daß der granulöse Cysteninhalt bräunlich-undurchsichtig geworden ist und sich klumpig zusammenballt. Die Cystenwand ist merklich dünner geworden, sie reißt nun leicht auf und entleert den abgestorbenen Inhalt (Abb. 4).

Dieses Resultat ist sehr konstant und zeigt, daß Paludrin nicht nur die Gameten und Ookineten im Darmlumen treffen kann, sondern auch die Bildungsstätte der Sporozoiten in den Cysten. Diese werden zunächst in ihrer Entwicklung gehemmt und sterben dann ab.

Abschließend kann festgestellt werden, daß diesem Malariatest im Mückendarm zweifellos praktische Bedeutung zukommt. Er bildet, wie wir mehrmals feststellen konnten, eine wertvolle Ergänzung zum entsprechenden Test am Warmblüter. Er kann an einem leicht zu beschaffenden Material (*Aedes*) und an einer großen Anzahl von Individuen durchgeführt werden, so daß man statistisch gut verwertbare Zahlen erhält. Der Entscheid über Wirksamkeit oder Unwirksamkeit ist leicht und einwandfrei zu fällen, indem im ersten Fall die Cysten entweder überhaupt nicht gebildet werden (Methode 1) oder nach Hemmung degenerieren (Methode 2), im anderen Fall normal ausgebildet sind. Der Test bietet außerdem die Möglichkeit, den Hauptteil der sexuellen Phase des Plasmodiums und die Vorstufen des Sporozoiten pharmakologisch zu erfassen, was im Hinblick auf die für die Malariaprophylaxe so wichtige präerythrocytäre Phase von Bedeutung sein kann.

Literatur.

- Johnson, H. A., und H. Akins. The effect of one plant extract and of certain drugs on the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. Journ. Nat. Malaria Soc., Vol. 7, 1948, p. 144—147.
- Terzian, L. A. A Method for screening antimalarial compounds in the mosquito Host. Science, Vol. 106, 1947, p. 449—50.
- Whitman, L. The effect of artificial blood meals containing the hydroxynaphthoquinone M 2279 on the developmental cycle of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. J. Infect. Dis., Vol. 82, 1948, p. 251—255.