

Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7 (1985) 223–227

Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen (Komm. Direktor: Prof. Dr. W. Höfler)

## Die Reproduktion von *Litomosoides carinii*, einer Nagetierfilarie mit blutzirkulierenden Mikrofilarien

**Jürgen Mössinger, Peter Wenk**

### Einleitung

Filarien vermehren sich im Laufe eines Lebenszyklus nur einmal, nämlich bei der Produktion von Mikrofilarien. Diese von den adulten weiblichen Würmern freigesetzten ersten Larven ( $L_1$ ) sichern einerseits die Übertragung des Parasiten durch den Arthropoden-Vektor und sind andererseits im Wirbeltierwirt nachhaltig für das Krankheitsgeschehen mitverantwortlich.

Bei fast allen Entwicklungsschritten hin zu den adulten Würmern werden die Parasitenstadien zumeist stark dezimiert. Alle diese Verluste müssen bereits bei der Embryogenese der Mikrofilarien kompensiert werden. Daher sollte die Fekundität der Nagetierfilarie *Litomosoides carinii* experimentell genau bestimmt werden.

Die intrauterine Entwicklung der Mikrofilarien (Embryogenese) von *L. carinii* wurde von McFADZEAN und SMILES (1956) und TAYLOR (1960a) bereits beschrieben. Über erste quantitative Untersuchungen wurde von HAWKING (1954), TAYLOR (1960b) und in jüngerer Zeit von ILLGEN (1982) berichtet.

### Material und Technik

Isogenetische Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) aus eigener Zucht wurden mit 30 metazyklischen Larven ( $L_3$ ) in die Vorderextremitäten subcutan infiziert. Die Larven gewannen wir mittels „Pooltieren“ (*Meriones unguiculatus*), die während zwei Stunden in eine infestiertere Population der Überträgermilbe *Ornithonyssus bacoti* eingesetzt wurden (PETRANYI und MIETH 1972). Nach vier Tagen (96–100 Stunden) wurden die Larven aus der Pleurahöhle der „Pooltiere“ ausgespült, gewaschen und unmittelbar danach zur Infektion verwendet.

Die aus der Pleurahöhle der Baumwollratten isolierten adulten Würmer wurden nach Geschlecht ausgezählt, die Weibchen vermessen und qualitativ oder quantitativ auf ihren Gehalt an Embryonalstadien untersucht.

Zur qualitativen Beurteilung der Embryogenese wurden die Weibchen auf einem Objektträger in etwa 5 mm lange Stücke zerteilt und die aus den Uteri hervorquellenden Embryonen untersucht.

Um die Embryonen zu zählen, wurde der Inhalt eines Weibchens in 1 ml Flüssigkeit (Säugermedium) suspendiert und eine Probe davon in eine FUCHS-ROSENTHAL-Kammer (Tiefe 0,2 mm) überführt. Es wurde zwischen normal entwickelten und pathologisch veränderten Embryonen unterschieden (SCHULZ-KEY et al. 1980).

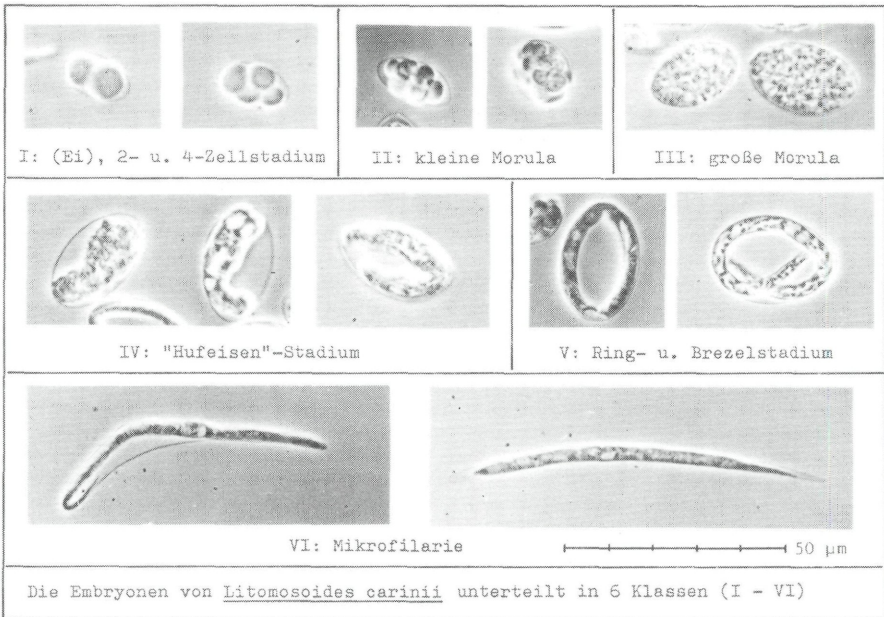
Zur Haltung *in vitro* wurden weibliche Würmer aus Baumwollratten mit einer Mikrofilariämie von 200—700 Mikrofilaren pro  $\mu\text{l}$  Blut 16—20 Wochen *post infectionem* (p. i.) steril entnommen. In Röhrchen vom Typ „Leighton“ wurden die Würmer einzeln fünf Tage lang gehalten und beim täglichen Wechseln des gesamten Kulturmediums von jeweils 2 ml der Ausstoß an Mikrofilarien bestimmt (Medium 199 + 10% inaktiviertes Baumwollratten-Serum, 37° C, Luft als Gasphase).

### Versuche und Ergebnisse

Untersuchungen in der Präpatenz

Zunächst wurden an den Tagen 27—50 p. i. täglich eine oder zwei Baumwollratten obduziert und aus insgesamt 42 Tieren zusammen 401 weibliche Adultwürmer qualitativ auf Embryonalstadien untersucht. Die Rückfindungsrate an adulten Würmern beiderlei Geschlechts betrug durchschnittlich 57% der Infektionsdosis.

Bereits am Tag 28 p. i., ungefähr in der Mitte der Präpatenz, fanden sich bei der Hälfte von 17 weiblichen Wurmern befruchtete Eizellen und frühe Furchungsstadien in den Uteri. Die Weibchen waren zu diesem Zeitpunkt erst 30—35 mm lang. Mit jedem weiteren Untersuchungstag konnte die sukzessive Entwicklung der Embryonen über die kleine und große Morula, das „Hufeisen“-Stadium, das Ring- und Brezelstadium bis zur Geburt der ersten Mikrofilarien 46 Tage p. i. verfolgt werden (Abb. 1). Die Dauer der Embryogenese ließ sich so für *L. carinii* auf  $18 \pm 2$  Tage bestimmen.



### Untersuchungen während der Patenz

Zu Beginn der Patenz ungefähr 7 Wochen p. i. waren die weiblichen Würmer bereits  $70,0 \pm 6,0$  mm lang ( $n = 20$  ♀♀) und enthielten je  $308 \times 10^3$  Embryonen aller Entwicklungsstufen ( $n = 24$  ♀♀), von denen 18,9% pathologisch verändert waren. Auch anschließend wuchsen die Weibchen weiter und erreichten 16—20 Wochen p. i. eine Länge von  $99,8 \pm 10,7$  mm ( $n = 96$  ♀♀). Sie enthielten nun je  $509 \times 10^3$  Embryonen ( $n = 37$  ♀♀), wovon 25,4% pathologisch verändert waren, d. h. es verblieben  $380 \times 10^3$  normal entwickelte Embryonen pro Weibchen (Abb. 2).

## FECUNDITY OF LITOMOSOIDES CARINII

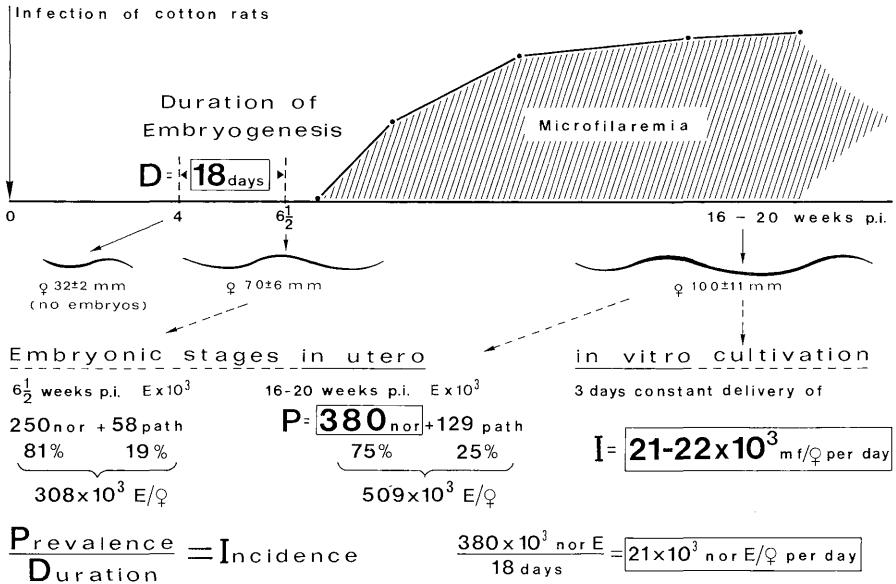


Abb. 2: Experimentelle Bestimmung der Fekundität von *Litomosoides carinii* auf zwei unabhängigen Wegen  
 a. durch Haltung von 16—20 Wochen p. i. gewonnenen adulten Weibchen *in vitro* (rechts)  
 b. durch Berechnung (unten) aus dem Gehalt an normalen Embryonen pro Weibchen (mitte) und der Dauer der Embryogenese (oben links) *in vivo*

nor: normally developed embryos (E)  
 path: pathologically altered embryos  
 mf: microfilariae

nach: MÖSSINGER und WENK, Z. Parasitenk.  
 (im Druck)

*In vitro* setzten 16—20 Wochen p. i. gewonnenen Würmer drei Tage lang gleichbleibend  $21 \times 10^3$  bis  $22 \times 10^3$  Mikrofilarien pro Weibchen und Tag (Mf/♀, Tag) frei; danach sank der Ausstoß rasch ab ( $n = 16$  ♀♀).

### Diskussion

Die Weibchen von *L. carinii* wachsen auch noch nach der Kopulation ca. 4 Wochen p. i. zumindest bis zur voll entwickelten Mikrofilariämie ungefähr 20 Wochen p. i. weiter. Bei der von uns gewählten geringen Infektionsdosis hemmen sich die Würmer nicht gegenseitig im Wachstum, d. h. es tritt noch kein crowding-effect auf (KANDA und TASA-KA 1966). Die Körperlänge und die Embryonenzahl eines Weibchens sind positiv korreliert und mit der Zunahme dieser beiden Parameter steigt auch der Prozentsatz pathologisch veränderter Embryonen signifikant an.

Ab etwa 30 Wochen p. i. treten bei den Weibchen verstärkt degenerative Erscheinungen auf, der Anteil pathologisch veränderter Embryonen in den Uteri solcher Weibchen steigt in der Folge weiter an. Nach 50—60 Wochen p. i. findet man nur noch wenige lebende Würmer, die dann fast ausschließlich pathologische Embryonalstadien enthalten. Bevor solche Alterungsprozesse einsetzen, sind die Weibchen stets voller Embryonen aller Entwicklungsstadien und setzen Mikrofilarien frei, d. h. die Reproduktion erfolgt bei *L. carinii* kontinuierlich und nicht in Rhythmen wie bei *Onchocerca volvulus*, wo die Weibchen drei bis fünf Reproduktionszyklen pro Jahr durchlaufen (SCHULZ-KEY 1983).

Verläuft die Embryonenproduktion im Gleichgewicht, d. h. halten sich die Befruchtung von Eizellen, der Ausfall pathologisch veränderter Embryonen und der Ausstoß von Mikrofilarien die Waage, so läßt sich die Fekundität eines Weibchens mit der Formel  $P = I \times D$  (Prävalenz = Inzidenz  $\times$  Dauer) berechnen. Dabei entspricht P der Anzahl normaler Embryonen pro Weibchen, I dem Mikrofilarien-Ausstoß pro Weibchen und Tag und D der Dauer der Embryogenese. Der theoretische Mikrofilarien-Ausstoß eines 16—20 Wochen alten Weibchens berechnet sich somit aus dem Quotienten  $380 \times 10^3 / 18$  (Anzahl normaler Embryonen/Dauer der Embryogenese) auf  $21,1 \times 10^3$  *Mf*/♀, Tag. Dies stimmt mit dem *in vitro* ermittelten Ergebnis sehr gut überein (Abb.2).

In unseren Versuchen fanden sich durchschnittlich 9—10 weibliche Adultwürmer pro Baumwollratte, die täglich zusammen ca.  $200 \times 10^3$  *Mf* produzierten. Eine entsprechend große Anzahl Mikrofilarien muß vom Wirtsorganismus täglich eliminiert werden, da die Parasitämie nur geringfügig weiter ansteigt und in den inneren Organen keine nennenswerte Akkumulation stattfindet. Aus der Gesamtanzahl von Mikrofilarien in einem Wirtstier, welche sich aus der Parasitämie und dem Blutvolumen des Tieres abschätzen läßt, geteilt durch die tägliche Produktion aller Weibchen, errechnet sich für die Mikrofilarien eine Halbwertszeit der Zirkulation im peripheren Blut von einigen Wochen.

Bei *Onchocerca volvulus*, einer Filarie mit Gewebs-Mikrofilarien, ist die tägliche Produktion eines Weibchens mit etwa 1000 *Mf* geringer (ENGELBRECHT und SCHULZ-KEY 1984). Andererseits sind diese Würmer jedoch jahrelang reproduktiv und ist auch die Lebenserwartung der Mikrofilarien im befallenen Menschen deutlich größer als die von *L. carinii* in der Baumwollratte.

### Zusammenfassung

Baumwollratten wurden mit 30 metazyklischen Larven von *L. carinii* infiziert und noch während der Präpatenz die Entwicklung der Embryonen in den Uteri der jungen adulten Würmer verfolgt. Die Dauer der Embryogenese der Mikrofilarien wurde so auf  $18 \pm 2$  Tage bestimmt. Die weiblichen Würmer wuchsen bis zur voll entwickelten Patenz 16—20 Wochen p. i. auf 100 mm Körperlänge heran und enthielten dann  $509 \times 10^3$  Embryonen aller Entwicklungsstadien, wovon  $380 \times 10^3$  (75%) normal entwickelt, die übrigen pathologisch verändert waren. *In vitro* setzte ein solches Weibchen täglich  $21 - 22 \times 10^3$  Mikrofilarien frei; dies entspricht der berechneten Fekundität *in vivo*.

### Summary

The reproduction of *Litomosoides carinii*, a filarial parasite of rodents with blood-dwelling microfilariae.

Cotton rats were infected quantitatively by subcutaneous inoculation of 30 third stage larvae of *L. carinii*. By daily autopsy during the prepatency and subsequent examina-

tion of the adult female worms the course of embryogenesis was followed. During the  $18 \pm 2$  days duration of embryogenesis *in vivo* the females grew in length from 30—35 mm to  $70 \pm 6$  mm. In the beginning of patency about 7 weeks p. i. one female contained  $308 \times 10^3$  embryos of all the different developmental stages. When the patency was fully developed after 16 — 20 weeks p. i. the females grew up to  $100 \pm 11$  mm and contained  $509 \times 10^3$  embryos, of which 25% were pathologically altered. *In vitro* such 16 — 20 week old worms released  $21 - 22 \times 10^3$  microfilariae per female per day.

According to the formula  $P = I \times D$  (prevalence = incidence  $\times$  duration) the expected daily output of microfilariae (I) *in vivo* may be calculated on the number of normal embryos per female (P) divided by the duration of embryogenesis (D) and results in  $21 \times 10^3$  mf/♀, day. This corresponds exactly with the data experimentally assessed *in vitro*, i. e. the fecundity of *L. carinii* is  $20 \times 10^3$  mf/♀, day.

### Danksagung

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Weltgesundheitsorganisation (WHO, OCP, TDR) unterstützt. Ferner danken wir Herrn Dr. Schulz-Key vom Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen für seine fachkundige Beratung bei der Embryonenanalyse.

### Literatur

- ENGELBRECHT, F., H. SCHULZ-KEY (1984): Observations on adult *Onchocerca volvulus* maintained *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 212—215.
- HAWKING, F. (1954): The reproductive system of *Litomosoides carinii*, a filarial parasite of the cotton rat; III. — The number of microfilariae produced. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 48, 382—385.
- ILLGEN, B. (1982): *In vitro* — Versuche mit *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea); II. Einfluß verschiedener Seren auf die Freisetzung von Mikrofilarien sowie Versuche zur Kopulationsbereitschaft der Würmer. *Z. Parasitenk.* 67, 227—236.
- KANDA, T., S. TASAKA (1966): Studies on cotton rat filariasis using quantitative inoculation with larvae of *Litomosoides carinii* (TRAVASSOS 1919). *Jap. J. Parasitol.* 15, 138—147.
- McFADZEAN, J. A., J. SMILES (1956): Studies of *Litomosoides carinii* by phase-contrast microscopy: the development of larvae. *J. Helminthol.* 30, 25—32.
- MÖSSINGER, J., P. WENK (im Druck): Fecundity of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) *in vivo* and *in vitro*. *Z. Parasitenk.*
- PETRANYI, W., W. MIETH (1972): Eine rationelle Methode zur quantitativen Infektion adäquater Laboriere mit *Litomosoides carinii*. *Z. Tropenmed. Parasit.* 23, 2—9.
- SCHULZ-KEY, H., B. JEAN, E. J. ALBIEZ (1980): Investigations on female *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug trials. *Tropenmed. Parasit.* 31, 34-40.
- SCHULZ-KEY, H. (1983): Observations on the reproductivity of *Onchocerca volvulus*. Abstracts 3. Int. Symp. Invertebrate Reproduction.
- TAYLOR, A. E. R. (1960a): The spermatogenesis and embryology of *Litomosoides carinii* and *Dirofilaria immitis*. *J. Helminthol.* 34, 3—12.
- TAYLOR, A. E. R. (1960b): Maintenance of filarial worms *in vitro*. *Exp. Parasit.* 9, 113—120.

### ANSCHRIFT DER AUTOREN:

Dipl. Biol. Jürgen Mössinger

Prof. Dr. Peter Wenk

Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen

Wilhelmstr. 31, D-7400 Tübingen 1

# 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: 1985

Band/Volume: [7](#)

Autor(en)/Author(s): Mössinger Jürgen, Wenk Peter

Artikel/Article: [Die Reproduktion von Litomosoides carinii, einer Nagetierfilarie mit blutzirkulierenden Mikrofilarien. 223-227](#)