

# Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie von *Anopheles stephensi* nach Doppelinfection mit *Vavraia culicis* und *Plasmodium yoelii nigeriensis*

H. Becker-Feldmann, W. A. Maier, C. Adl-Amini, H. M. Seitz

## Einleitung

Die Mikrosporidienart *Vavraia culicis* kann Laborkolonien von *Anopheles stephensi* parasitieren. Die reifen Mikrosporidiensporen werden von den Larven mit der Nahrung aufgenommen. Im Darm der Larven schleudern die Sporen dann einen bis zu 350 µm langen Polfaden aus. Dieser kann in eine Darmepithelzelle oder aber auch in jede andere Zelle geschleudert werden. Daraufhin erscheint an seiner Spitze der Amoeboidekeim. In den befallenen Zellen entwickelt sich aus diesem über mehrere Zwischenstadien Pansporoblasten mit mehr als 16 Sporen. Am Ende dieser Entwicklung gehen die Wirtszellen zugrunde und die freiwerdenden reifen Sporen können neue Zellen befallen. Eine Infektion der Mücken mit *Vavraia culicis* führt zu einer erhöhten Sterblichkeit. Sofern sich die infizierten Larven noch verpuppen, geht die Entwicklung der Mikrosporidien in den adulten Mücken weiter (1).

Infektionen von *Anopheles stephensi* mit den Nagetier-Malaria-Erregern *Plasmodium berghei* und *Plasmodium yoelii nigeriensis* führten ebenfalls zu einer erhöhten Mortalität bei den adulten Mücken. Der stärkste Anstieg der Mortalitätsrate war nach 10 - 48 Stunden, etwa zum Zeitpunkt der Ookinetenwanderung durch die Darmepithelzellen, zu verzeichnen (9, 11, 12).

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, welche Schäden die Entwicklungsstadien von *Vavraia culicis* und die Ookineten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* an den Darmepithelzellen hervorrufen und wie sich eine erhöhte Mortalitätsrate der adulten Moskitos erklären läßt.

## Material und Methoden

### *Anopheles stephensi*:

Die *Anopheles stephensi*-Kolonie wurde seit 1972 in unserem Labor gezüchtet.

Die Larven wurden mit Tabimin (Fa. Tetra) und die Adulten mit 10% Glucose gefüttert. Die Gelege wurden nach Blutaufnahme an NMRI-Mäusen gewonnen.

Infektionsversuche wurden mit 4 - 6 Tage alten Mücken durchgeführt. Einen Tag vor der infektiösen Blutmahlzeit wurde das Zuckerwasser aus den Käfigen entnommen.

*Plasmodium yoelii nigeriensis*:

Der verwendete Stamm wurde 1983 von D. WALLIKER, Edinburgh, bezogen. Es handelt sich um den Clone N 67 aus einer einzelnen Oocyste.

Zur Infektion verwendete Mäuse:

Es wurden Mäuse vom Stamm NMRI/Hannover verwendet. Ihr Körpergewicht bei der Infektion betrug ca. 20 g.

*Plasmodium*-Infektion:

Durch Dekapitieren einer infizierten Maus gewonnenes Blut wurde in 0,1 ml Liquemin aufgefangen. Davon wurden 0,1 ml mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung (0.85%) verdünnt und einer Maus intraperitoneal injiziert. Nach 2 - 3 Tagen hatten sich in der Maus infektiöse Gametozyten bei einer Parasitämie von 10 - 20% entwickelt. Daraufhin wurden die Mäuse mit Nembutal betäubt und für 15 min. auf die Gazekäfige gelegt, sodaß die Mücken durch die Gaze Blut saugen konnten.

*Vavraia culicis*:

Die Mikrosporidieninfektion trat im Jahr 1984 aus noch nicht geklärter Ursache in unserem Insektarium auf. Die Mikrosporidien wurden von J. WEISER, Prag, noch im selben Jahr als *Vavraia culicis* bestimmt.

Zum Zeitpunkt der Präparation waren alle Mücken mit den Mikrosporidien infiziert.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen:

Zur elektronenmikroskopischen Präparation wurden zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* Gruppen von Tieren entnommen, die Mitteldärme aus dem Abdomen herauspräpariert und mit 3% Glutaraldehyd in Sörensen-Puffer pH 7,2 fixiert. Anschließend wurden sie mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, mit einer aufsteigenden Äthanolreihe und Propylenoxid entwässert und in Epon 812 eingebettet. Die Schnitte wurden mit Uranylazetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss EM 9 S-2. Im folgenden wird über die Därme, die nach 10,5 Stunden entnommen worden waren, berichtet (insgesamt 9 Därme). Zu diesem Zeitpunkt dringen die Ookineten in die Darmepithelzellen ein.

## Ergebnisse

In Abb. 1 sind verschiedene Entwicklungsstadien von *Vavraia culicis* in einer Darmepithelzelle zu erkennen. Eindeutig zu identifizieren sind vor allem die Pansporoblasten mit reifen Sporen in der befallenen Zelle. Die Epithelzelle ist morphologisch stark verändert. Sie ist aufgebläht und in einzelnen Bereichen sind kaum mehr Zellorganellen vorhanden. Daher ist sie stellenweise elektronenlicht. Die Mitochondrien sind stark angeschwollen und die innere Mitochondrienmembran ist zerrissen. Weitere Zellorganellen sind nicht zu erkennen. Direkt neben der nekrotischen Darmepithelzelle liegt, hier nur teilweise angeschnitten, eine völlig intakte Zelle.

Im Darmlumen sind noch unverdaute Erythrocythen und einzelne Bakterien zu erkennen.

Die Abb. 2 dokumentiert, daß auch nach dem Eindringen eines Ookineten in die Darmepithelzelle pathologische Veränderungen zu beobachten sind. Der Mikrovilli-

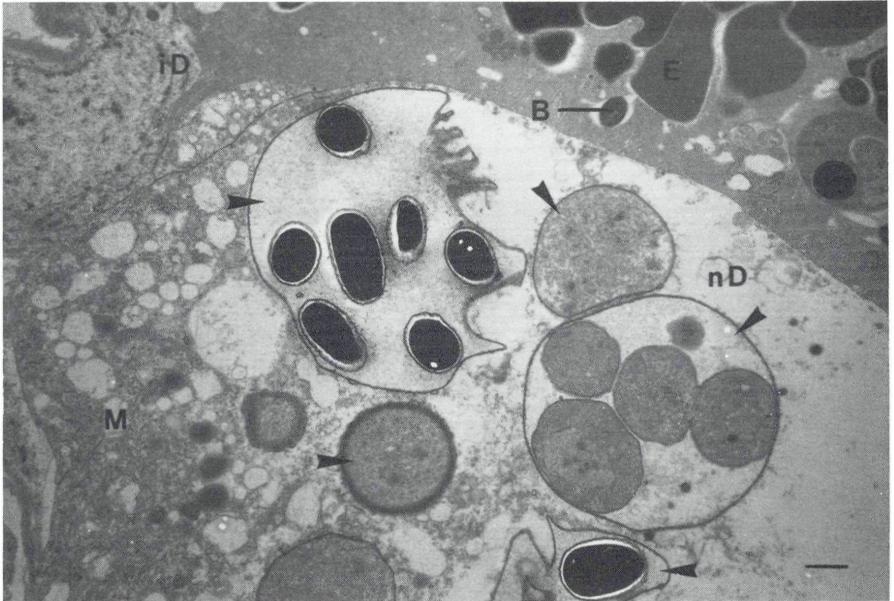


Abb. 1:

Verschiedene Entwicklungsstadien von *Vavraia culicis* in einer nekrotischen Darmepithelzelle. Direkt benachbart liegt eine noch intakte Darmepithelzelle. Die Blutmahlzeit ist noch nicht vollständig verdaut · (>) = Entwicklungsstadien von *Vavraia culicis*; B = Bakterien; E = unverdaute Erythrocyten; iD = intakte Darmepithelzelle; nD = nekrotische Darmepithelzelle; M = veränderte Mitochondrien

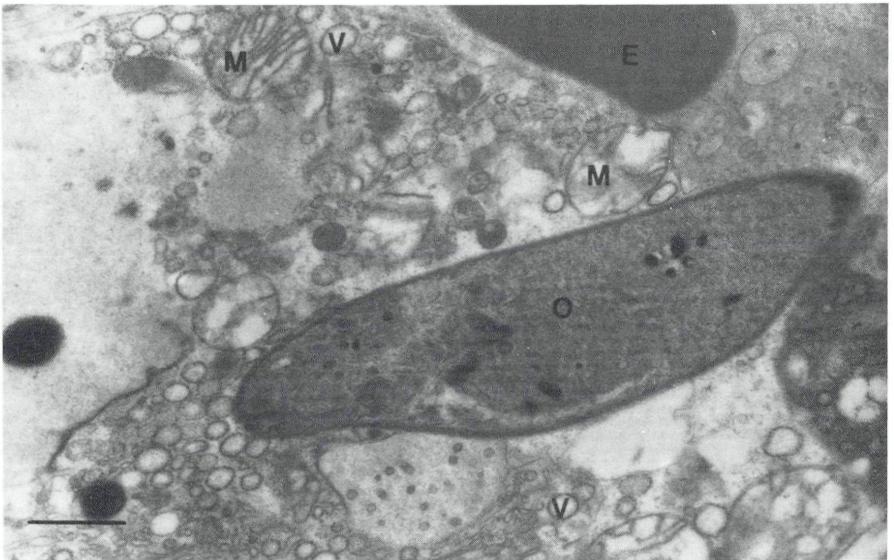


Abb. 2:

Ookinete in einer nekrotischen Darmepithelzelle. Der Ookinete weist keine pathologischen Veränderungen auf · E = unverdaute Erythrocyten; M = veränderte Mitochondrien; O = Ookinete; V = Vakuolen

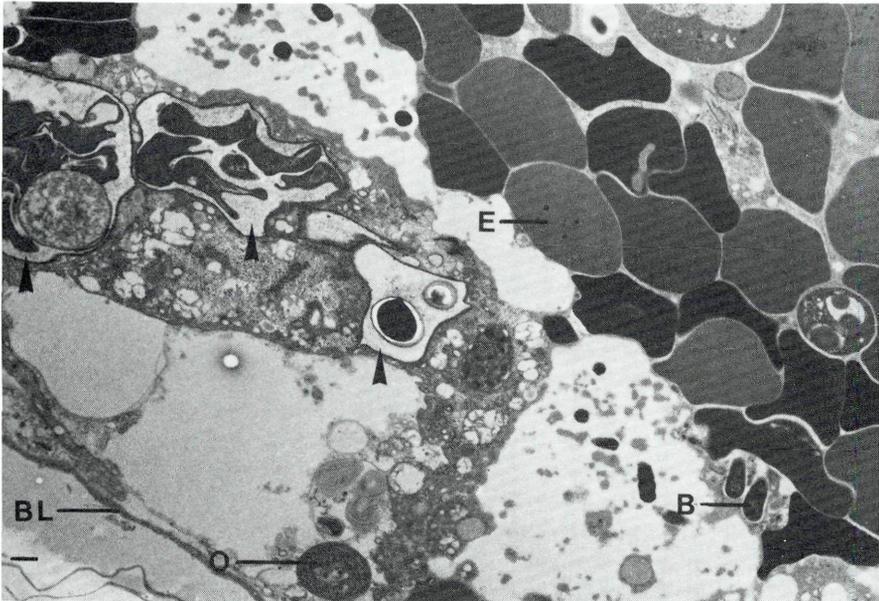


Abb. 3:

Vermehrungsstadien von *Vavraia culicis*, ein Ookinet und Bakterien in einer nekrotischen Darmepithelzelle. Die Zelle hat sich von der basalen Lamina abgelöst · B = Bakterien; BL = Basale Lamina; E = unverdaute Erythrocyten; O = Ookinet; (>) = Mikrosporidien

saum ist kaum zu erkennen, auch hier sind die Mitochondrien stark aufgebläht. Außerdem sind viele Vakuolen vorhanden. Im Darmlumen, direkt der Zelle anliegend, erkennt man auch hier einen nicht verdauten Erythrocyten. Der Ookinet selbst weist keine pathologischen Veränderungen auf.

In Abb. 3 befinden sich sowohl Entwicklungsstadien von *Vavraia culicis* als auch ein Ookinet in der Darmepithelzelle. Allgemein kann man feststellen, daß bei Doppelinfektionen die Schäden an den Zellen noch größer sind. Hier hat sich die gesamte Zelle von der basalen Lamina abgelöst und der Mikrovillisaum ist nicht mehr vorhanden. Bei den anderen Zellorganellen sind die gleichen Veränderungen wie bereits beschrieben zu beobachten. Der eingedrungene Ookinet ist hier quer angeschnitten, so daß die typischen Organellen des Apikalkomplexes in diesem Anschnitt nicht zu erkennen sind. Auch hier sind am Ookineten keine Veränderungen zu beobachten. Im Darmlumen fallen wiederum unverdaute Erythrocyten und Bakterien auf.

In nicht infizierten Kontrolltieren war, nach gleicher elektronenmikroskopischer Präparation, die Anzahl der nekrotischen Zellen wesentlich geringer. Normalerweise gehen nämlich immer einzelne Darmepithelzellen zugrunde. Die verbrauchten Zellen werden dann aus dem Zellverband ausgeschleust und die entstehende Lücke von anderen Zellen eingenommen (3).

## Diskussion

Sowohl die Wanderung der Ookineten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* als auch die Entwicklung von *Vavraia culicis* kann zu Zerstörungen der Darmepithelzellen führen. Begleitinfektionen mit Bakterien der Art *Serratia marcescens* können die pathologi-

schen Effekte noch verstärken (12). Bei sehr großflächigen Zerstörungen sind die Darmepithelzellen nicht mehr in der Lage, Verdauungsenzyme zu sezernieren und anschließend Nahrungsbestandteile zu resorbieren. Zum Zeitpunkt der Präparation der Därme hätten nämlich die peripher liegenden Blutkörperchen bereits verdaut sein müssen.

Neben den Darmepithelzellen befallen die Mikrosporidien auch alle anderen Organe der Moskitos, wo sie ebenfalls Schädigungen hervorrufen können (4).

BANO (2) fand, daß auch die *Plasmodium*-Entwicklung durch *Vavraia culicis* gehemmt wird. Auch auch eine andere moskitopathogene Mikrosporidienart *Nosema algerae* zeigt neben einer schädigenden Wirkung auf die Mücken einen Einfluß auf die Entwicklung der Malariaerreger. FOX und WEISER (5) beobachteten, daß in *Anopheles gambiae* mit einer schweren *Nosema stegomyiae* (syn. *Nosema algerae*)-Infektion keine Oocysten von *Plasmodium falciparum* mehr gebildet wurden. Nach Infekten von *Anopheles stephensi* mit *Nosema algerae* wurden merklich weniger Sporozoiten von *Plasmodium berghei* gebildet (8). Diese Beobachtungen wurden von GAJANANA et al. (6) für *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium vivax* bestätigt. Außerdem verkürzen diese Mikrosporidien die Überlebensdauer von *Anopheles stephensi* derart, daß keine reifen Sporozoiten von *Plasmodium vivax* mehr gebildet werden können (7). In unserem Labor konnte ebenfalls beobachtet werden, daß in doppelinfizierten Mücken die Sporozoitenproduktion von *Plasmodium yoelii nigeriensis* wesentlich verringert ist. In histologischen Präparaten war eine starke Vakuolisierung des Oozystenplasmas zu erkennen (10).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Grad der Zerstörung der Darmepithelzellen eine hinreichende Erklärung für die erhöhte Mortalitätsrate liefert. Sie können jedoch noch nicht klären, auf welche Weise die Mikrosporidien die Entwicklung der *Plasmodien* hemmen oder verhindern. Dieses ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

### Zusammenfassung

Eine Infektion von *Anopheles stephensi* mit *Plasmodium yoelii nigeriensis* und der Mikrosporidienart *Vavraia culicis* führte zu einer erhöhten Mortalitätsrate der Mücken. Im elektronenmikroskopischen Bild erkennt man, daß sowohl die Vermehrung der Mikrosporidien als auch die eingedrungenen Ookineten pathologische Veränderungen an den befallenen Darmepithelzellen hervorrufen. Der Doppelbefall einer Darmepithelzelle verstärkt die Schädigungen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Grad der Zerstörung der Darmepithelzellen eine hinreichende Erklärung für die erhöhte Mortalitätsrate der doppelinfizierten Moskitos liefert.

### Schlüsselwörter

*Anopheles*, Microsporida, *Plasmodium*, Ookinet, Doppelinfektion, Pathologie

### Summary

Electronmicroscopical observations on the pathology of *Anopheles stephensi* after double-infection with *Vavraia culicis* and *Plasmodium yoelii nigeriensis*

The infection of *Anopheles stephensi* with *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Vavraia culicis* (Microsporida) leads to an increased mortality rate of the mosquitoes. In elec-

tronicoscopic studies we observed pathological alterations of the midgut epithelial cells after infection with the microsporidia as well as after penetration of the ookinetes. Double-infections of midgut cells enhance the damage. The present results clearly show that the damage of the midgut cells is a sufficient explanation for the raised mortality rate of the double-infected mosquitoes.

### Key words

*Anopheles*, Microsporida, *Plasmodium*, ookinetes, double-infection, pathology

### Literatur

1. BAMBERGER, K. (1986): Experimentelle Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Vavraia culicis* (Microsporida) in *Anopheles*. Diplomarbeit Univ. Bonn.
2. BANO, L. (1959): Partial inhibitory effect of *Plistophora culicis* on the sporogonic cycle of *Plasmodium cynomolgi* in *Anopheles stephensi*. Nature (London) 181, 430.
3. BECKER-FELDMANN, H. (1986): Über die Entwicklungsbedingungen der Ookineten von *Plasmodium yoelii nigeriensis* in *Anopheles stephensi* und *in vitro*. Diss. Univ. Bonn.
4. BECKER-FELDMANN, H., BAMBERGER, K., MAIER, W., SEITZ, H. M. (1987): Studies on the life cycle of *Vavraia culicis* (Microsporidia) in *Anopheles stephensi* Zbl. Bakt. Hyg. A. 265, 535 - 536.
5. FOX, R. M., WEISER, J. (1959): A microsporidian parasite of *Anopheles gambiae* in Liberia. J. Parasitol. 45, 21 - 30.
6. GAJANANA, A., TEWARI, S. C., REUBEN, R., RAJAGOPALAN, P. K. (1979): Partial suppression of malaria parasites in *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* doubly infected with *Nosema algerae* and *Plasmodium*. Ind. J. Med. Res. 70, 417 - 423.
7. HAQ, N., REISEN, W. K., ASLAMKHAN, M. (1981): The effects of *Nosema algerae* on the horizontal life table attributes of *Anopheles stephensi* under laboratory conditions. J. Inv. Pathol. 37, 236 - 242.
8. HULLS, R. H. (1971): The adverse effects of a microsporidian on sporogony and infectivity of *Plasmodium berghei*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 421 - 422.
9. MAIER, W. A., BECKER-FELDMANN, H., SEITZ, H. M. (1987): Pathology of malaria-infected mosquitoes. Parasitology Today 3, 216 - 218.
10. SCHENKER, W., MAIER, W. A., WEYLER, D., BECKER-FELDMANN, H., CHIORALIA, G., ADL-AMINI, C., SEITZ, H. M. (1987): Effects of *Vavraia culicis* (Microsporida) upon malaria infections in *Anopheles* mosquitoes. Abstracts 3<sup>rd</sup> Int. Conf. on Malaria and Babesiosis Annecy p. 170.
11. SCHENKER, W. (1987): Persönliche Mitteilung
12. SEITZ, H. M., MAIER, W. A., ROTTOCK, M., BECKER-FELDMANN, H. (1987): Concomitant infections of *Anopheles stephensi* with *Plasmodium berghei* and *Serratia marcescens*: Additive detrimental effects. Zbl. Bakt. Hyg. A. 266, 155 - 166.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. H. Becker-Feldmann  
Insitut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn, FRG  
Sigmund-Freud-Straße 25  
D-5300 Bonn  
Bundesrepublik Deutschland

# 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: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Becker-Feldmann H., Maier Walter A., Adl-Amini C., Seitz Hanns Martin

Artikel/Article: [Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie von Anopheles Stephensi nach Doppelinfektion mit Vavraia culicis und Plasmodium yoelii nigeriensis. 15-21](#)