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

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 13 (1991) 119 - 124

Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. J. Knobloch)

Versuche zur Regulation der Wurmlast bei der Nagerfilarie *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidiea) in *Sigmodon hispidus*

K. Hoffmeister, P. Wenk

Einleitung

Die invasiven dritten Larven (L_3) der Nagerfilarie *Litomosoides carinii* migrieren von ihrer Eintrittsstelle mit dem Lymphstrom zu regionalen Lymphknoten, durchdringen diese und gelangen schließlich über das rechte Herz in die Lungenkapillaren, von wo sie sich in den Pleuralspalt durchbohren (1). Auch nach einer optimalen extrinsischen Entwicklungsdauer von 13 Tagen entwickelt sich bei mehr als dreißig inokulierten Larven stets weniger als die Hälfte zu adulten Würmern (2).

Die bei der Lymphknotenpassage resorbierten, migrierenden Larven stellen den ersten Kontakt mit somatischem Antigen dar. Die protektive Wirkung dieses Antigens läßt sich durch Injektion von Muramyldipeptid (MPD) wie auch durch Trehalosedimykolat (TDM) während der Migrationsphase unspezifisch steigern (3).

Da nach vier bis fünf Tagen eine Immunantwort erwartet werden kann, interessierte uns, ob die in der Pleura angekommenen Larven und juvenilen Würmer hierdurch vermindert werden oder ob die Wurmlast bereits nach der Migration feststeht. Deshalb verglichen wir die Anzahl von Adultwürmern in Tieren mit voll entwickelter Parasitämie 16 Wochen post inoculationem (p. i.) mit der Anzahl der fünf bis elf d. p. i. in der Pleura angekommenen Larven.

Wir fragten uns außerdem, ob die Verlustrate unabhängig von der Anzahl gleichzeitig migrierender Larven immer gleich groß ist. Deshalb wurden die Rückfindungsraten bei steigenden Inokulationsdosen miteinander verglichen.

Ferner wollten wir untersuchen, ob diese Verluste vor allem durch lokale Effekte bei der Lymphbahnpassage oder durch systemische Defensivreaktionen des Wirtes verursacht werden. Wir verglichen deshalb die Rückfindungsraten nach Inokulation der Gesamtdosis von L_3 entweder in eine oder verteilt auf alle vier Extremitäten.

Material und Methoden

Die verwendeten Baumwollratten *(Sigmodon hispidus)* gehören zu einem isogenetischen Stamm (4), der in unserem Institut konventionell gehalten wird. Die Tiere wurden meist zu zweit bei 22° C, 55 -56% Luftfeuchtigkeit und täglich zwölf Stunden Licht gehalten. Futter (Ratten- und Mäusediät H 103, Alma, Kempten) und Wasser wurden ad libitum angeboten. Die Tiere waren gewöhnlich sechs bis zehn Wochen alt und wogen ca. 150 g.

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

Die Zucht der Vektormilben *Ornithonyssus bacoti,* HIRST 1913, und die Haltung des Filarienzyklus, ebenso wie die Inokulationstechnik, die Bestimmung der Mikrofilarämie und die Autopsie wurde bereits beschrieben (5).

Für die Migrationsexperimente gewannen wir die L_3 dreizehn Tage nach der Blutmahlzeit an patenten Baumwollratten aus Milben. Für die übrigen Experimente stammten sie aus Wüstenrennmäusen *(Meriones unguiculatus),* die als Pooltiere dienten. Die Meriones wurden, genau vier Tage bevor sie mit CO_2 getötet wurden, einer infestierten Milbenkolonie ausgesetzt. Dann wurden die Larven aus der Pleuralhöhle ausgespült und mit RPMI-Säugermedium gewaschen, bevor sie inokuliert wurden (6).

Um die migrierenden Larven wiederzufinden, wurden möglichst alle Lymphknoten untersucht: sie wurden zerzupft und den Larven wurde für vier Stunden erlaubt, in das Medium auszuwandern. Schließlich wurden die Gewebsreste zwischen zwei Objektträgern gepreßt und auf verbliebene Larven untersucht. Die Lungen wurden in kleine Stücke zerzupft und ebenso mikroskopisch untersucht. Die Pleuralhöhle wurde wiederholt mit Medium gespült und die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nachdem sich die Larven abgesetzt hatten, wurde sie portionsweise untersucht.

Um voll entwickelte Adultwürmer zu erhalten, wurden diese nicht vor acht Wochen p. i. gewonnen. Männchen und Weibchen ebenso wie eingekapselte Würmer wurden aus der Pleura entfernt und ihre Länge gemessen. Weibchen wurden außerdem auf Embryonalstadien und Mikrofilarien untersucht. Um sicherzustellen, daß keine Würmer im Abdomen vorhanden waren, wurde auch in der Peritonealflüssigkeit nach Mikrofilarien gesucht.

Die Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte mitgeteilt. Die Rückfindungsraten adulter Würmer wurden untereinander mit dem Rangtest nach WILCOXON verglichen. Die Anzahl der Larven in der Pleura und die Anzahl der Adultwürmer wurde außerdem mit dem F-Test auf unterschiedliche Varianz geprüft. Die Korrelation von Rückfindungsraten und Inokulationsdosis wurde mit dem Rangkorrelationstest nach SPEARMAN geprüft (7).

Ergebnisse

Zwanzig Tiere erhielten jeweils 60 L_3 hälftig in beide Vorderextremitäten inokuliert. In den folgenden Tagen wurden täglich Lymphknoten, Lunge und Pleura von ein bis zwei Tieren auf migrierende Larven untersucht.

Eine Kontrollgruppe von zwölf Tieren, denen gleichzeitig und in gleicher Weise ebenfalls sechzig Larven inokuliert worden waren, wurde erst 16 Wochen p. i. in der voll entwickelten Patenz obduziert.

In der ersten Gruppe wurden ein bis drei Tage p. i. Larven nur in den Lymphknoten gefunden. Vier Tage p. i. hatten eine und zwei Larven die Pleura erreicht. Fünf Tage p. i. wurden schließlich zehn und zwanzig Larven in der Pleuralhöhle gefunden, während nur noch jeweils eine Larve in den Lymphknoten je eines Tieres gefunden wurde.

Bis zum Ende des Versuchs, elf Tage p. i., wurden keine weiteren Larven in den Lymphknoten wiedergefunden. Nur jeweils ein Tier enthielt nach sieben bzw. acht Tagen p. i. noch eine migrierende Larve in den Lungen. Alle anderen Larven hatten die Pleuralhöhle erreicht. Durchschnittlich wurden so 14,1 $\pm$ 9,4 (1 - 32) Larven, das sind 23,5%, in dieser Zeit in der Pleura wiedergefunden. In der Kontrollgruppe fanden sich 16 Wochen p. i. durchschnittlich 19,9 $\pm$ 6,1 (14 - 31) das sind 33,1%, als Adultwürmer wieder.

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

Die Differenz von 9,6% zwischen Larven und Adultwürmern ist statistisch nicht signifikant.

Inokulation steigender Dosen

Elf Tiere erhielten 6 L_3, acht weitere 12 L_3 und acht Tiere 60 L_3 in die rechte Vorderextremität. Die Rückfindungsrate adulter Würmer sieben bis neun Wochen p. i. fiel mit der Steigerung der Inokulationsdosis von 53% auf 43% und 26% ab. Diese negative Korrelation ist hoch signifikant ($p < 0{,}025$).

Inokulation der Gesamtdosis von 60 L_3 in eine oder verteilt auf vier Extremitäten

Sechs Sigmodon erhielten 15 L_3 in jede der vier Extremitäten. Eine Kontrollgruppe von acht Tieren erhielt die Gesamtdosis in eine Vorderextremität inokuliert. Acht Wochen p. i. wurden in der Versuchsgruppe 59% der Larven als Adulte wiedergefunden. In der Kontrollgruppe betrug die Rückfindungsrate 26%. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist signifikant ($p < 0{,}05$).

Diskussion

Von 60 hälftig in die beiden Vorderextremitäten inokulierten dritten Larven waren bereits fünf bis elf Tage p. i. nur noch durchschnittlich 14,1 Larven in der Pleura wiederzufinden. Die Lunge wird offenbar schnell und ohne größere Verluste durchwandert. Entsprechend wurden bei histologischen Untersuchungen der Lunge niemals durch resorbierte Larven verursachte Granulome festgestellt (1). Somit wurden bereits innerhalb der ersten vier bis fünf Tage bis zu dreiviertel der migrierenden Larven ausschließlich in den Lymphknoten resorbiert. In der Kontrollgruppe hatten sich durchschnittlich 19,9 Adultwürmer entwickelt. Da zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand, ließen sich in der weiteren Entwicklung keine zusätzlichen Verluste nachweisen.

Die Verlustrate nimmt jedoch mit der Steigerung der Inokulationsdosis zu. Dieses wurde auch in Versuchen mit *Acanthocheilonema viteae* beobachtet (7) und mit vier verschiedenen Dosen zwischen vier und 90 Larven pro Tier bestätigt (8). Offenbar bestehen bei der Gewebspassage Engpässe, da man eine signifikant höhere Rückfindungsrate erhält, wenn die gesamte Dosis inokulierter L_3 nicht in eine Extremität sondern auf die vier Extremitäten verteilt injiziert wird.

Demnach wird bereits während der Migrationsphase durch unspezifische Effekte ein Overcrowding vermieden und dabei eine tolerierbare Wurmlast garantiert.

Zusammenfassung

Die invasiven Larven wandern über Lymphknoten und die Lunge während fünf Tage in die Pleura. Währenddessen hatten bei zwölf Tieren von 60 L_3 durchschnittlich 14,1 $\pm$ 9,48 L_3 die Pleura erreicht. Annähernd ebensoviele Adultwürmer, nämlich 19,9, wurden 16 Wochen p. i. in einer Kontrollgruppe von zwölf Tieren wiedergefunden. Demnach treten nach Abschluß der Migrationsphase keine weiteren Verluste mehr auf und die Wurmladung steht am Ende der Migrationsphase bereits fest.

Die Rückfindungsrate adulter Würmer fällt bei Erhöhung der Inokulationsdosis von sechs auf zwölf und 60 L_3 pro Tier signifikant von 53% auf 43% und 26% ab ($p < 0{,}025$).

Wird die Gesamtdosis von 60 L_3 auf vier Extremitäten verteilt, so wurden 59% als Adultwürmer wiedergefunden, während bei Inokulation der Dosis in eine Vorderextremität nur 26% wiedergefunden wurden ($p < 0{,}05$).

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

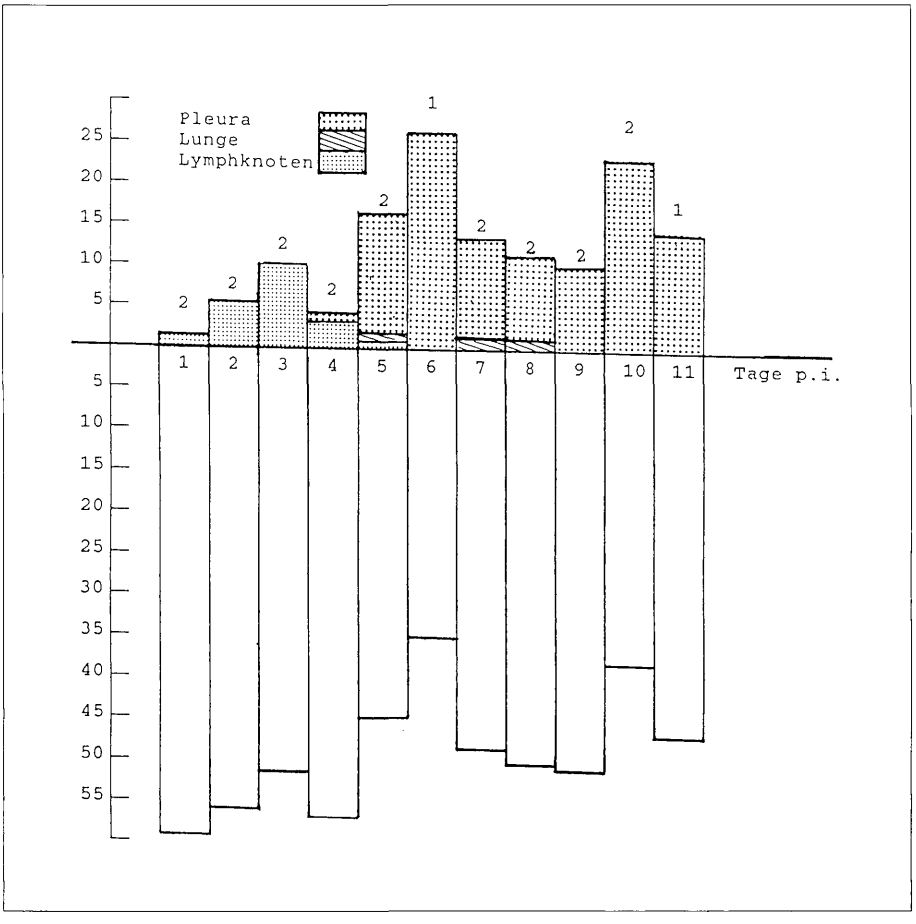

Abb. 1:

Migrierende Larven von *L. carinii* in *Sigmodon hispidus* nach subcutaner Inokulation von je 30 L_3 in beide Vorderextremitäten.

Nach oben: durchschnittlich pro Tier wiedergefundene Larven.

Nach unten: nicht aufgefundene Larven. Ziffern über den Säulen: Anzahl der Versuchstiere.

Schlüsselwörter

Parasit-Wirt-Beziehung, Rückfindungsrate, Wurmlast, Defensivreaktionen, Migration, *Litomosoides carinii.*

Summary

Experiments on the regulation of the worm load at the rodant filariae *Litomosoides carinii* (Nematoda Filaroidae) in *Sigmoda hispidus*

Within five days the invasive larvae (L_3) migrate from the inoculation site via the lympatic drainage through the heart and lungs into the pleural cavity. In the meantime in 12 Sigmodon from sixty larvae inoculated 14.1 had arrived in the pleural cavity.

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

About the same number of adult worms, namely 19.9, had arrived, indicating that there is no additional loss during the further development in the pleural cavity. Hence the wormload is already determined after the migration phase of the larvae.

The recovery rate of adult worms decreases from 53% to 43% and 26% when the inoculation dosage is increased from 6 to 12 and 60 L_3 ($p < 0.025$).

When a total dose of 60 L_3 is distributed to the four extremities in six animals 59% were recovered as adult worms whereas in six controls after inoculation of 60 L_3 in one foreleg only 26% were recovered ($p < 0.05$).

Key words

Parasite-host relationship, recovery rate, worm load, migration, *Litomosoides carinii.*

Danksagung

Frau I. Ossko, Dipl.-Biol. führte den Kontrollversuch zum Migrationsexperiment durch. Frau J. Backes führte einen Teil der Obduktionen aus. Beiden sei hierfür herzlich gedankt.

Literatur

1. WENK, P. (1966):
Der Invasionsweg der metazyklischen Larven von Litomosoides carinii, Chandler 1931 (Filariidae).
Z. Parasitenkd. 28, 240-263.

2. NILSBERG, A., WENK, P. (1988):
Extrinsische Entwicklung und Infektiosität der metazyklischen Larven von Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea) in Sigmodon hispidus.
Z. angew. Zool. 75, 429-439.

3. BAYER, M. (1988):
Immunstatus und Verlauf der Filariose (Dipetalonema viteae, Litomosoides carinii) in den Kleinsäugern Meriones unguiculatus und Sigmodon hispidus.
Dissertation (Biol.) Tübingen.

4. TONCAR, G. (1979):
Nachweis der Isogenität einer Kolonie der Baumwollratte Sigmodon hispidus mittels Transplantation von Haut und Knochenmark.
Diplomarbeit (Biol.) Tübingen.

5. WEGERHOF, P. H., WENK, P. (1979):
Studies on acquired resistence of the cotton rat against microfilariae of Litomosoides carinii. Injection of microfilariae during prepatency.
Z. Parasitenkd. 68, 321-329.

6. SACHS, L.:
Angewandte Statistik.
Springer-Verlag, Berlin, 6. Aufl., 1984.

7. ANUAR, A. K. (1982):
Immunologic reactivity in jirds infected with different doses of Dipetalonema viteae infective larvae. Lymphocyte responsiveness to mitogens and characterization of immunosuppression.
Proc. 25th SEA-MEO-TROPMED SEMINAR, 19 - 21 Oct.

8. BARTHOLD, E., WENK, P. (1991):
Einfluß der Inokulationsdosis auf die Rückfindungsrate von Acanthoceheilonema viteae bei einmaliger und wiederholter Inokulation in Meriones unguiculatus.
Zbl. Bakt. (im Druck).

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

KORRESPONDENZADRESSE:

Klaus Hoffmeister
BFA für Viruskrankheiten der Tiere

Paul-Ehrlich-Straße 28
D-7400 Tübungen 1 · Bundesrepublik Deutschland

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: 1991

Band/Volume: 13

Autor(en)/Author(s): Hoffmeister Klaus, Wenk Peter

Artikel/Article: Versuche zur Regulation der Wurmlast bei der Nagerfilarie Litomosoides carinii (Nematoda, Filarioidiea) in Sigmodon hispidus. 119-124