

## Entwicklung von infektiösen Filarienlarven nach intrathorakaler Injektion von Mikrofilarien in *Culicoides nubeculosus*

Bettina Weiß, P. T. Soboslay, H. Schulz-Key

### Einleitung

Infektiöse dritte Filarienlarven werden für verschiedene Untersuchungen im Labor benötigt. Dabei gilt das Interesse den Wirt-Parasit-Interaktionen zur Klärung der Ursachen der Wirtsspezifität der Filarien. An metazyklischen Larven sollen die Phänomene der Wirtsspezifität auf molekularer und biochemischer Ebene, über die Charakterisierung exkretorischer und sekretorischer Produkte, untersucht werden. Für die Beantwortung immunologischer Fragen ist die Gewinnung von infektiösen Larven des Parasiten eine wesentliche Voraussetzung.

Die Filarien des Menschen sind ausgesprochen wirtsspezifisch, d. h. ihr Zyklus läßt sich nicht über Surrogatwirte im Labor aufrechterhalten. Schwierigkeiten begegnen uns auch bei der Zucht der Überträgerinsekten, vor allem bei denen von *Onchocerca volvulus*. Daher versuchen wir wenigstens einzelne Phasen der Filarienzyklen im Labor zu etablieren, wobei wir uns Filarien bedienen, die dem menschlichen Parasiten nahestehen und für die wir auch nach einfachen Surrogatvektoren suchen. Die uns interessierenden Arten wie *O. volvulus*, die Rinderfilarien *O. gutturosa*, *O. lienalis*, *O. ochengi*, *O. armillata*, die Hirschfilarien *O. flexuosa*, *O. tarsicola* und die Humanfilarien *Mansonella perstans* und *M. ozzardi* werden spezifisch von Simuliiden oder Ceratopogoniden der Gattung *Culicoides* auf den Endwirt übertragen. Simuliiden sind im Labor nur mit großem Geschick zu züchten, wohingegen Ceratopogoniden der Art *Culicoides nubeculosus* mit geringem Aufwand kontinuierlich im Labor gehalten werden können (6).

Diese Gnitze stellt einen Surrogatvektor für einheimische Tierfilarien, afrikanische Rinderfilarien und möglicherweise auch für die Humanfilarien *M. perstans* und *M. ozzardi* dar (1, 2, 8), denn die bei Felduntersuchungen bestimmten natürlichen Vektoren von *M. perstans* gehören ebenfalls zur Gattung *Culicoides*, und für die einheimische Rinderfilarie *O. gutturosa* wurde *C. nubeculosus* bereits erfolgreich als Laborvektor eingesetzt (4).

Die natürliche Infestation des Überträgers über eine Verfütterung von Mikrofilarien in Blutsuspension an einer Latexmembran, bei der stets größere Mengen an lebenden Mikrofilarien vorhanden sein müssen, wurde durch die intrathorakale Injektion der Mikrofilarien ersetzt. Dabei wird die Darmpassage in der Mücke umgangen und die Mikrofilarien werden direkt an den Ort ihrer Entwicklung, die Thoraxmuskulatur, gebracht. Für diese exakte Applikation genügt eine viel geringere Mikrofilariendosis als bei der Membraninfestation, da dort die Mikrofilarien zuerst die peritrophische Membran und das Darmepithel durchbohren müssen und der Entwicklungserfolg auf diesem natürlichen Infektionsweg nur wenige Prozent beträgt.

## Material und Methoden

### Isolierung von Mikrofilarien:

Hautmikrofilarien wurden gewonnen, indem kleingeschnittene Hautstücke von frischen Rinderfellen in Gewebemedium RPMI 1640 mit 10% FCS und 200 iu/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin eingelegt wurden. Während einer 4- bis 6-stündigen Inkubation bei 25° C wanderten die Mikrofilarien aktiv aus und konnten mit dem Medium abgenommen werden. Zur Reinigung wurde die Mikrofilariensuspension anschließend entweder durch einen Schwamm filtriert oder auf eine mit Sephadex G 25 in RPMI 1640 gefüllte Säule zur Trennung von Erythrozyten gegeben. Eine mögliche gleichzeitige Infektion mit *O. lienalis* konnte durch eine intrathorakale Injektion in ihren natürlichen Überträger *Odagmia ornata* nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Blutmikrofilarien von *M. perstans* wurde Patienten aus einem endemischen Gebiet in Togo venös Blut abgenommen, dieses heparinisiert und nach einer Lyse der Erythrozyten durch einen Membranfilter der Porengröße 3 µm gepreßt. Der Polykarbonatfilter konnte dann direkt unter dem Mikroskop nach Mikrofilarien abgesehen und so die Mikrofilariämie bestimmt werden. Durch die Filtration wurden die Mikrofilarien allerdings geschädigt und waren auch nur schwer wieder vom Filter zu entfernen. Deswegen wurden alternative Methoden zur Isolierung eingesetzt.

Bei einem für Nagetiermikrofilarien standardisierten Verfahren (5) wurden die Blutmikrofilarien durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll von anderen Blutbestandteilen getrennt. Blutmikrofilarien konnten außerdem durch eine Dextransedimentation aus heparinisiertem Blut isoliert werden. Dabei wurden 10 ml Blut mit 10 ml RPMI 1640 und 10 ml 5%iger Dextranlösung in HBSS gemischt und bei 25° C für 30 Minuten zur Sedimentation belassen, bis etwa  $\frac{1}{3}$  des Volumens als Sediment vorlag. Der Überstand wurde abgenommen, die Mikrofilarien abzentrifugiert und mehrmals gewaschen.

### Kryokonservierung der Mikrofilarien:

Hautmikrofilarien wurden für den Transport oder zur Lagerung im Zweistufenverfahren (7) mit Ethylenglykol als Gefrierschutzmittel in 15 µl-Portionen auf Deckglasstreifen eingefroren. *M. perstans*-Mikrofilarien wurden mit 10% DMSO-Endkonzentration in Suspension zu Portionen von 500 - 800 µl kryokonserviert.

### Intrathorakale Injektion:

*C. nubeculosus* ist zwar unproblematisch zu züchten, aber in der Handhabung wesentlich empfindlicher als die größeren Simuliiden. Deswegen wurden die Versuche zur intrathorakalen Injektion in einer kombinierten Betäubungs- und Injektionskammer durchgeführt (3) (Abb. 1a, 1b). Mit einem kontinuierlichen Strom aus wasserdampfgesättigtem CO<sub>2</sub> wurden die Ceratopogoniden im Rondell betäubt. Durch eine Öffnung im Deckel der Kammer wurde die Mücke mit einer feinen Pinzette an den Extremitäten fixiert und die Mikrofilarien mit einer feinen Glaskapillare mit einem Außendurchmesser von ca. 40 µm und einem Kapillarhalter mit Gummiballaufsatz in den Thorax injiziert (Abb. 1c). Sofort nach der Injektion wurden die Ceratopogoniden in einen mit Gaze bespannten Styroporbecher (3) mit hoher Luftfeuchtigkeit gebracht, um ein Austrocknen durch die Wunde zu vermeiden. 30 - 50 Ceratopogonidenweibchen wurden in einem 500 ml Styroporbecher gesammelt, die Temperatur betrug 25° C, die Luftfeuchtigkeit zu Beginn 95 - 100%, nach 24 Stunden 85%. Zur Ernährung wurde eine 10%ige Glukoselösung mit Antibiotika und frisches Wasser angeboten.

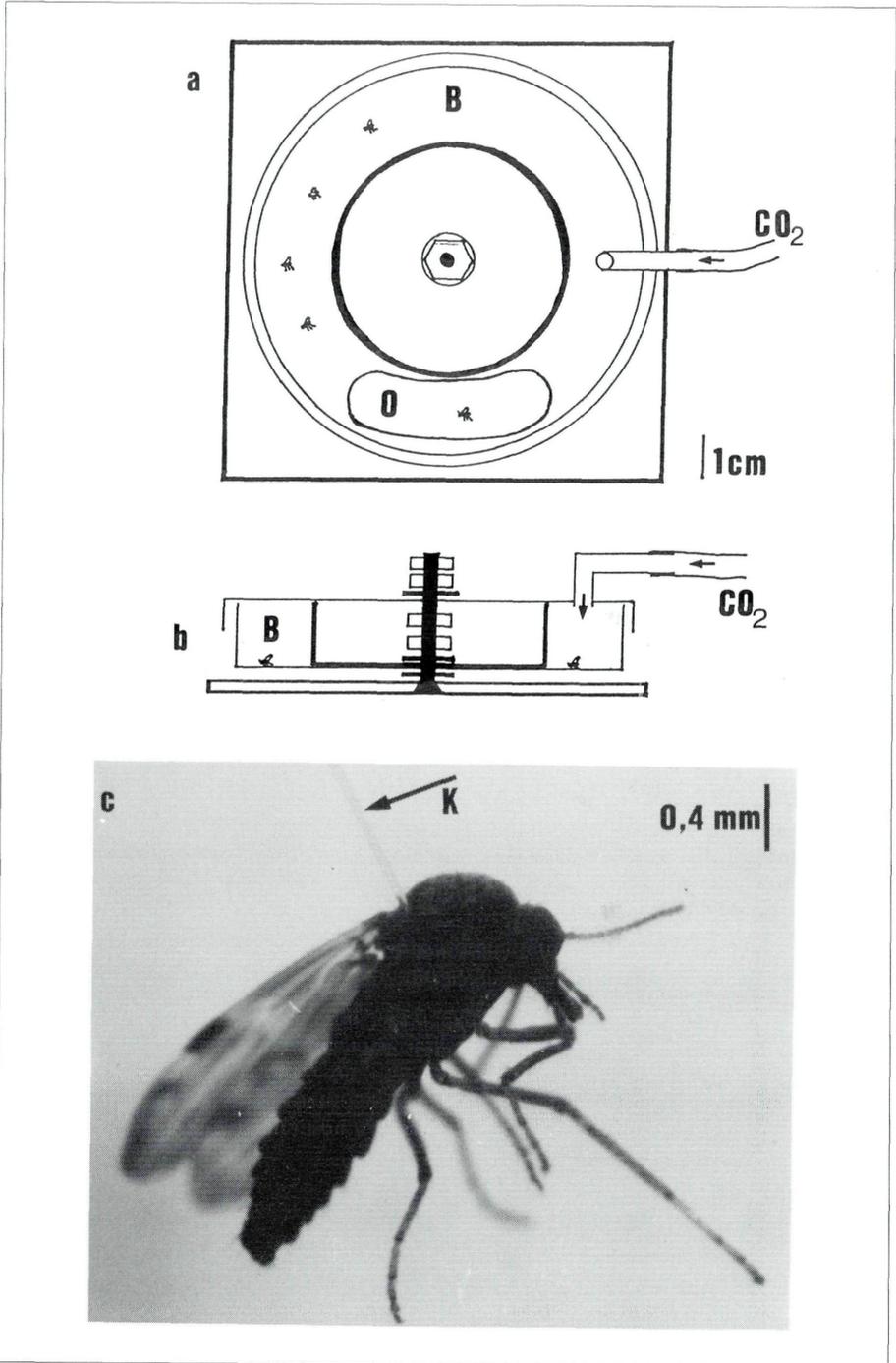


Abb. 1:

Kombinierte Betäubungs- und Injektionskammer.

a = von oben · b = von vorne · c = Einstich der Kapillare in die Ceratopogonide  
B = Betäubungsrondell · O = Injektionsöffnung · K = Kapillare

#### Gewinnung von Parasitenstadien:

Täglich wurden die gestorbenen Ceratopogoniden abgesammelt und die drei Tagmata Kopf, Thorax und Abdomen getrennt in physiologischer Kochsalzlösung feinpräpariert und nach Parasitenstadien untersucht.

### Ergebnisse

#### Überlebensrate von *C. nubeculosus* nach intrathorakaler Injektion:

Bei der gewählten Temperatur von 25° C dauerte die Entwicklung von der ersten Larve, der Mikrofilarie, zur infektiösen dritten Larve im Überträger etwa zehn Tage. Durch eine äußerst schonende Behandlung der Ceratopogoniden, die Ermittlung einer optimalen Temperatur und Luftfeuchtigkeit gelang es, 30 - 40% der Mücken nach Injektion über diesen Zeitraum am Leben zu erhalten (Abb. 2).

#### Entwicklung von Rindermikrofilarien der Art *O. gutturosa*:

Ein bis zwei Tage nach der Injektion konnte bei frisch präparierten Mücken das Eindringen der Mikrofilarien in die Thoraxmuskulatur beobachtet werden (Abb. 3a). Anschließend begann sich die Mikrofilarie zum sogenannten Wurststadium (Abb. 3b) zu verkürzen und zu verdicken. Die Häutung zum zweiten Larvenstadium (Abb. 3c) erfolgte nach fünf Tagen und vom zehnten Tag an wurden infektiöse dritte Larven aus dem Kopf isoliert (Abb. 3d). Die Entwicklungsrate, bezogen auf die injizierte Mikrofilariendosis, betrug 12%.

Rindermikrofilarien der Art *O. gutturosa* aus Togo haben sich nach intrathorakaler Injektion nur bis zum Wurststadium entwickelt.

#### Vorläufige Infestationsversuche mit Mikrofilarien von *M. perstans*:

Zunächst wurde versucht, *C. nubeculosus* an der Latexmembran über eine Blutmahlzeit mit Mikrofilarien zu infestieren. Es wurden bei allen 60 präparierten Mücken keine weiterentwickelten Parasitenstadien im Thorax gefunden. Ob die Mikrofilarien dabei schon an der Darmpassage durch die peritrophische Membran gescheitert sind, muß noch durch intrathorakale Injektion von Mikrofilarien überprüft werden.

### Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Technik der intrathorakalen Injektion von Mikrofilarien zur Gewinnung von infektiösen Filarienlarven gut geeignet ist. Werden bei der Kryokonservierung von Mikrofilarien Kryoprotektantien wie Ethylenglykol oder DMSO verwendet, so erhält man nach dem Auftauen bis zu 80% vitale und entwicklungsfähige Mikrofilarien. Damit kann von schwer zugänglichen Filarien wie *M. perstans* und *O. gutturosa* ein Vorrat an Mikrofilarien gesammelt und für längere Zeit aufbewahrt werden.

Einheimische Rindermikrofilarien lassen sich routinemäßig und in ausreichenden Mengen am Schlachthof Tübingen aus Hautproben von Weidetieren gewinnen. Die Mikrofilarien der in Mitteleuropa endemischen Rinderfilarien *O. lienalis* und *O. gutturosa* sind jedoch morphologisch und auch nach einer Anfärbung mit Saurer Phosphatase nicht unterscheidbar. Daher kann zu Beginn eines Versuches mit intrathorakaler Injektion nur von einer undefinierten Mischprobe der beiden bovinen Mikrofilarien ausgegangen werden. Eine qualitative Zuordnung zu den Arten kann erst retrospektiv anhand der Entwicklungsrate von infektiösen Larven bei einer Parallelinjektion in *C. nubeculosus* und in *O. ornata* erfolgen, in denen die Arten sich jeweils spezifisch entwickeln.

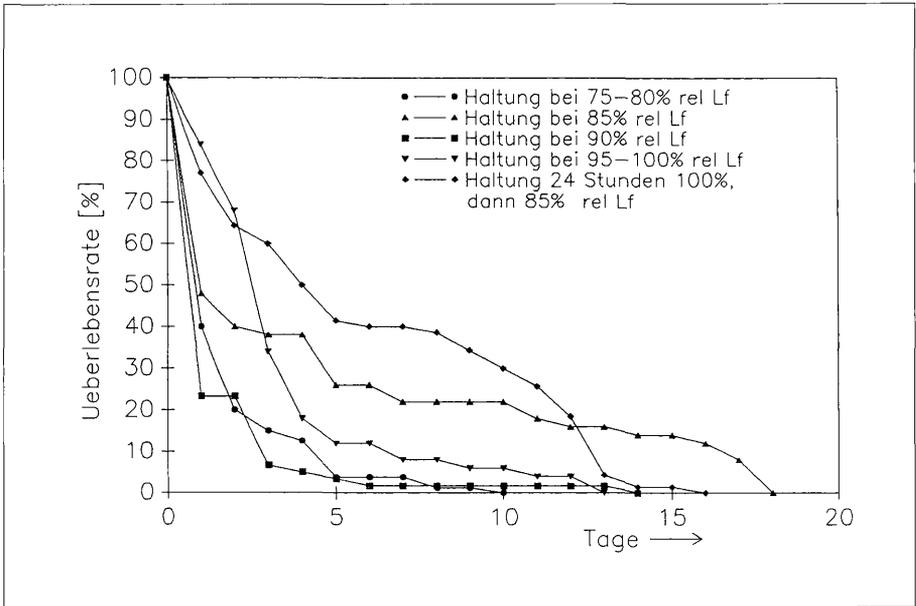


Abb. 2:

Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit in den Haltungsgefäßen auf die Überlebensrate von *C. nubeculosus* nach intrathorakaler Injektion von Rindermikrofilarien.

*O. gutturosa* konnte ebenfalls aus Rindern, die im Schlachthaus in Sokode/Togo geschlachtet wurden, in größeren Mengen isoliert werden. Die Überträger dieses afrikanischen Stammes von *O. gutturosa* sind zu denen in Europa verschieden. Daher stellt sich die interessante Frage, ob diese afrikanische Art für den europäischen Überträger noch empfänglich ist. Eine eindeutige Antwort konnten wir jedoch bisher nicht erhalten, da unser Mikrofilarienmaterial aus Togo anfangs nicht optimal kryokonserviert worden war.

Mikrofilarien der Humanfilarie *M. perstans* sind schwieriger zu gewinnen. Da eine Infektion mit *M. perstans* meist symptomlos verläuft, sind die Träger von *M. perstans*-Mikrofilarien meist nicht bekannt und werden zufällig bei Blutuntersuchungen entdeckt. Während einer klinischen Studie mit Ivermectin zur Behandlung der Onchozerkose in Togo wurden die Blutmikrofilarien von *M. perstans* gleichzeitig erfaßt (9), da diesen Patienten für Untersuchungen zur humoralen und zellulären Immunität Blut abgenommen wurde. Dieses Blut konnte nach einer Isolierung von PBMC für die Gewinnung von Mikrofilarien weiterverwendet werden. Dabei mußte die für die Diagnose übliche Methode der Blutfiltration mit einem Membranfilter durch ein Sedimentationsverfahren mit Dextran T 500 ersetzt werden, da die Mikrofilarien nicht in ihrer Vitalität und Entwicklungsfähigkeit geschädigt werden durften.

Bei der intrathorakalen Injektion von Mikrofilarien in *C. nubeculosus* mußten die sehr kleinen und empfindlichen Ceratopogoniden schonend behandelt werden, damit eine ausreichende Anzahl von ihnen die Entwicklungsdauer bis zur dritten Larve überlebte. Dies ist uns mit unserer Technik inzwischen gelungen. In der kombinierten Betäubungs- und Injektionskammer konnte zum einen die Luftfeuchtigkeit hoch gehalten und die Dauer der Operation verkürzt werden, zum anderen erlaubte diese Methode eine

quantitative Infestation des Vektors, und durch die Umgebung der peritrophischen Membran genügten geringere Mengen an Mikrofilarien als bei einer Blutfütterung. Die anschließende Haltung der Ceratopogoniden nach der Injektion konnten wir in bezug auf Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Haltungsverfäße optimieren.

## Zusammenfassung

Mikrofilarien von *O. gutturosa* aus einheimischen und afrikanischen Rindern und der Humanfilarie *M. perstans* wurden durch Inkubation von Hautstücken bzw. durch Dextransedimentation aus Venenblut isoliert und für den Transport mit verschiedenen Gefrierschutzmitteln kryokonserviert.

Nach dem Auftauen wurden die Mikrofilarien intrathorakal in Weibchen der Laborzucht von *C. nubeculosus* injiziert. Der Einsatz einer Injektions- und Betäubungskammer und die schonende Haltung reduzierten die Mortalität, und nach zehn Tagen konnten 30 - 40% der Ceratopogoniden zur Gewinnung von infektiösen Filarienlarven präpariert werden. Der Entwicklungserfolg für *O. gutturosa* aus einheimischen Weiderindern konnte gegenüber der Membraninfestation deutlich auf 12% gesteigert werden. Afrikanische Rindermikrofilarien der Art *O. gutturosa* haben sich nur bis zum Wurststadium entwickelt. Nach Membranverfütterung von *M. perstans*-Mikrofilarien an *C. nubeculosus* konnten keine weiterentwickelten Parasitenstadien gefunden werden. Die Technik der intrathorakalen Injektion von Mikrofilarien eignet sich einerseits zum Nachweis der Empfänglichkeit eines potentiellen Surrogatvektors und andererseits zur routinemäßigen Gewinnung von infektiösen Larven für immunologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen.

## Schlüsselwörter

Intrathorakale Injektion, Membranfütterung, infektiöse Larven, Laborvektor.

## Summary

### Production of infective filarial larvae by intrathoracic injection of microfilariae into *Culicoides nubeculosus*

A technique is presented for the development of extrinsic filarial stages in *Culicoides nubeculosus* after intrathoracic inoculation of microfilariae. Skin microfilariae of *Onchocerca gutturosa* were isolated from hides of pasture cattle at the abattoirs of Tübingen, South West Germany, and in Sokode, Togo, West Africa, by incubation of fresh skin samples in tissue medium. Blood microfilariae of *Mansonella perstans* were isolated from Togolese patients using a sedimentation technique with Dextran T 500. Viable microfilariae were cryopreserved either with ethandiol on glass slices or with DMSO in solution.

Female *C. nubeculosus* were anaesthetized and intrathoracically inoculated with microfilariae in a special isolation chamber. 12% of European *O. gutturosa* microfilariae developed to infective third-stage larvae after inoculation. This indicates a significant increase of development in comparison with the membrane feeding technique. The growth of cryopreserved microfilariae of *O. gutturosa* from cattle in Togo was arrested at the sausage stage. No developing larvae of *M. perstans* could be found after infestation of midges at an artificial membrane.

Intrathoracic injection of microfilariae provides a very suitable method for the production of infective larvae for biochemical and immunological studies.

## Key words

Intrathoracic injection, membrane feeding, infective stage larvae, surrogate vector.

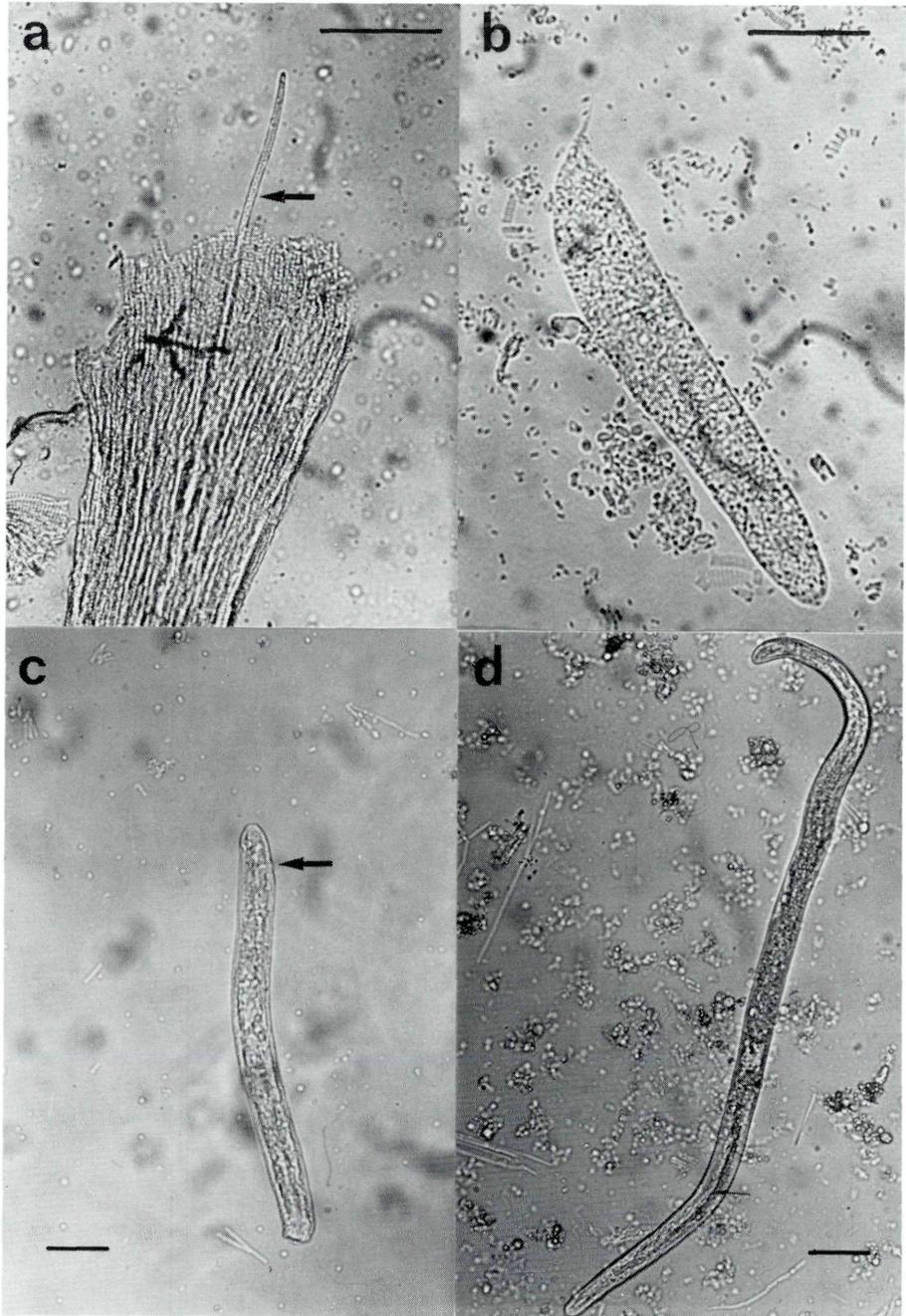


Abb. 3:

Entwicklung der injizierten Rindermikrofilarien von *O. gutturosa* in *C. nubeculosus*.  
a = Eindringen der Mikrofilarie in die Thoraxmuskulatur · b = Wurststadium · c = zweites  
Larvenstadium (→: Lage des Analpfropfes) · d = infektiöse dritte Larve  
Maßstab entspricht 40 µm.

## Literatur

1. BAIN, O. (1979):  
Transmission de l'Onchocerca bovine, *Onchocerca gutturosa*, par *Culicoides*.  
*Ann. Parasit. Hum. Comp.* 54, 483-488.
2. BAIN, O., PETIT, G., POULAIN, B. (1978):  
Validité des deux espèces *Onchocerca lienalis* et *O. gutturosa* chez les Bovins.  
*Ann. Parasit. Hum. Comp.* 53, 421-430.
3. BIANCO, A. E., HAM, P. J., TOWNSON, S., MUSTAFA, M. B., NELSON, G. S. (1989):  
A semi-automated system of intrathoracic injection for the large-scale production of *Onchocerca lienalis* infective larvae.  
*Trop. Med. Parasit.* 40, 57-64.
4. BLINN, J., DOHNAL, J., WAHL, G. (1990):  
Empfänglichkeit von *Culicoides nubeculosus* und *Odagmia ornata* für Mikrofilarien von *Onchocerca gutturosa* und *Onchocerca lienalis*.  
*Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 12, 95-102.
5. CHANDRASHEKAR, R., RAO, U. R., RAJASEKARIAH, G., R., SUBRAHMANYAM, D. (1984):  
Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients.  
*J. Helminthol.* 58, 69-70.
6. FAHRNER, J., BARTHELMESS, C. (1988):  
Rearing of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) by natural or artificial feeding in the laboratory.  
*Vet. Parasitol.* 28, 307-313.
7. HAM, P. J., TOWNSON, S., JAMES, E. R., BIANCO, A. E. (1981):  
An improved technique for the cryopreservation of *Onchocerca* microfilariae.  
*Parasitol.* 83, 139-146.
8. MELLOR, P. S. (1976):  
Infection of *Culicoides variipennis*, *C. nubeculosus*, *C. riethi* and *Aedeas aegypti* with *Mansonella ozzardi*.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70 (4), 352-353.
9. SCHULZ-KEY, H., ALBRECHT, W., HEUSCHKEL, C., WOLF, H., AWISSI, D. (1990):  
Unterschiedliche Wirkung von Mectizan auf Mikrofilarien von *Onchocerca volvulus* und *Mansonella perstans* in Patienten.  
*Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 12, 179-184.

KORRESPONDENZADRESSE:

Priv. Doz. Dr. H. Schulz-Key

Wilhelmstraße 31

D-7400 Tübingen · 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: 1991

Band/Volume: [13](#)

Autor(en)/Author(s): Weiß Bettina, Soboslay P. T., Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: [Entwicklung von infektiösen Filarienlarven nach intrathorakaler Injektion von Mikrofilarien in \*Culicoides nubeculosus\*. 151-158](#)