

Aus dem Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien
Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. J. BOCH)

SEROLOGISCHE STUDIEN AN MÄUSEN
NACH EXPERIMENTELLER INFEKTION
MIT EINEM TOXOPLASMASTAMM VOM HUND

Von

M. ROMMEL und I. MÜLLER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juni 1963)

Obwohl die Maus in der Toxoplasmoseforschung das am häufigsten benutzte Versuchstier ist, liegen nur wenige exakte Angaben über die Dynamik der Antikörperbildung in diesem Tier vor. Dies liegt wohl in erster Linie an der hohen Virulenz der meisten Laborstämme, die Mäuse in der Regel in wenigen Tagen töten. Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Toxoplasmose der Haustiere isolierten wir aus Hunden und Schweinen eine Reihe avirulenter Toxoplasmasträmme. Mit Hilfe des Hundestammes untersuchten wir den Antikörper-Titerverlauf bei der Komplementbindungsreaktion (KBR) und im Sabin-Feldman-Test (SFT) in NMRI-Mäusen nach intraperitonealer, oraler und konnataler Infektion sowie bei passiver Antikörperübertragung durch die Muttermilch.

Literatur

Den Antikörper-Titerverlauf (KBR und SFT) nach experimenteller Infektion bei einigen kleinen Versuchstieren untersuchte unter anderen VOLLBRECHTSHAUSEN (1954). Während Goldhamster rasch einer Infektion mit virulenten Toxoplasmen erlagen, blieben Ratten am Leben und die Titer über Wochen und Monate konstant. Bei Kaninchen wurde der SFT meist nach 8 Tagen positiv, erreichte nach 4 Wochen dann für Monate konstante Höchstwerte. Die KBR wurde 4 Wochen nach der Infektion positiv und 5—7 Monate später bei einigen Tieren wieder negativ. — KASS und STEEN (1951) hatten zuvor etwa dieselben Versuchsergebnisse an Kaninchen mitgeteilt, wobei die KBR erst dann positiv wurde, wenn der SFT 1:320 bis 1:640 erreicht hatte. DESMONTS und LE-TAN-VINH (1954) sahen bei Meerschweinchen 12—20 Tage nach der Infektion KBR-Titer und nach 30 Tagen Maximalwerte. Auch wenn die Titer unregelmäßig abfielen, waren selbst nach 18 Monaten noch alle Versuchstiere positiv. EYLES (1954) beobachtete am 4.—7. Tag nach i.p. Inokulation bei Ratten die ersten positiven SFT-Reaktionen, um den 15. Tag bereits Höchstititer (durchschnittlich 1:4000), nach 2 Monaten mittlere (1:256) und nach 2 Jahren niedere (1:16) Titer. Über ähnliche Ergebnisse an experimentell infizierten Ratten berichteten HELLBRÜGGE, SPIEGLER und GREWING (1956). Auch die KBR zeigte nach HEYBERGER und BOZDÉCH (1961) schon nach einer Woche niedrige, nach 5—7 Wochen Maximal-Titer. FRENKEL (1952 und 1953) fand bei chronisch infizierten Mäusen die ersten positiven Reaktionen im SFT nach 7 Tagen

und in der KBR nach 12 Tagen. Die Tiere wiesen nach 11—14 Monaten im SFT Titer von 1:8000—1:32000, in der KBR Titer von 1:448 auf. Bei akut erkrankten Mäusen wurde der SFT schon nach 3 Tagen positiv (FRENKEL 1956). Ein echter Vergleich zwischen den einzelnen Ergebnissen der genannten Autoren gelingt leider nicht, weil die Methoden der Antikörperbestimmung nicht miteinander übereinstimmen.

Die konnatale Übertragung von *Toxoplasma gondii* in Mäusen untersuchte erstmals EICHENWALD (1948). Während bei akut erkrankten Müttern 36% der Jungmäuse intrauterin infiziert waren, blieben im chronischen Stadium alle Jungen toxoplasmafrei. Weiter beobachteten COWEN und WOLF (1950) die konnatale Infektion der Nachkommen akut erkrankter, intravaginal infizierter Mäuse. BEVERLEY (1959) gelang es, einen avirulenten Toxoplasma Stamm über mehrere Generationen durch konnatale Übertragung in Mäusen fortzuzüchten. Dagegen war eine Ansteckung durch Speichel, Faeces, Urin oder Kopulation nie möglich. Auch REMINGTON, JACOBS und MELTON (1961) konnten in latent infizierten Tieren die Infektion über mehrere Generationen fortführen, die Zahl infizierter Nachkommen war bei den einzelnen Toxoplasma Stämmen jedoch sehr unterschiedlich. Ebenso beobachteten NAKAYAMA und MATSUBAYASHI (1961) konnatal infizierte Nachkommen von Mäusen mit latenter Toxoplasmose. VAN DER WAAIJ (1960) zeigte schließlich, daß die Häufigkeit konnataler Infektionen von der Zahl der Zysten im Muttertier abhängt. Je geringer die Zahl der Zysten war, desto häufiger fand eine Übertragung statt.

Eigene Untersuchungen

Methodik. Für alle Versuche wurden mit Altromin-Standard-Diät ernährte NMRI-Mäuse aus eigener toxoplasmosefreier Zucht benutzt. Den SFT und die KBR führten wir nach der üblichen Technik durch. Das Antigen wurde uns in dankenswerter Weise von Herrn Prof. Dr. PIEKARSKI zur Verfügung gestellt. Wegen der geringen Serumengen setzten wir nur die sog. „Kleine KBR“ (Einheit 0,04 ml) an. Der benutzte Toxoplasma Stamm war aus einem klinisch gesunden, serologisch positiven Hund isoliert worden (BOCH und ROMMEL 1963) und hatte in 10 Mäusepassagen seine ursprüngliche geringe Virulenz für Mäuse unverändert beibehalten. Für die intraperitoneale Infektion wurden 2 Gehirne auf 20 Mäuse verimpft. Die orale Infektion erfolgte durch Verfütterung zystenhaltiger Gehirne latent infizierter Mäuse. Die notwendigen Blutmengen entnahmen wir aus der Schwanzvene. Da es nicht möglich war, einer Maus häufiger als einmal wöchentlich genügend Blut für SFT und KBR zu entnehmen, wurden für das Studium des Titerverlaufs je 20 Mäuse infiziert und täglich bei mindestens 2 Tieren, später in größeren Zeitabständen, Blutproben zur serologischen Untersuchung gewonnen. Zysten wurden in Hirnquetschpräparaten direkt (Abb. 1) oder nach PAS-Färbung von Hirnschnitten histologisch nachgewiesen. Durch die von SALFELDER (1961) modifizierte PAS-Färbung erscheinen Toxoplasmazysten sehr kontrastreich und lassen sich daher mit größerer Sicherheit diagnostizieren.

Ergebnisse

Intraperitoneal oder oral infizierte Mäuse zeigten vom 7.—12. Tag nach der Infektion mehr oder weniger deutliche Krankheitserscheinungen, einige Tiere starben. Lediglich bei i.p. infizierten Tieren konnten regelmäßig Toxoplasmen im Bauchhöhlenexsudat nachgewiesen werden.

Der SFT wurde sowohl bei i.p. als auch oraler Infektion bei allen Tieren am 8. Tag mit niedrigen Titern positiv, stieg bis zum 15. Tag

bis auf Werte von 1:64000 an und hielt sich im Verlauf der 313tägigen Beobachtungszeit in den Grenzen 1:4000 bis 1:16000000. Dabei blieben nach schwacher oraler Infektion die Titer an der unteren Grenze der angegebenen Spanne. Alle interkurrent gestorbenen oder planmäßig getöteten Versuchstiere beherbergten Toxoplasmazysten im Gehirn.

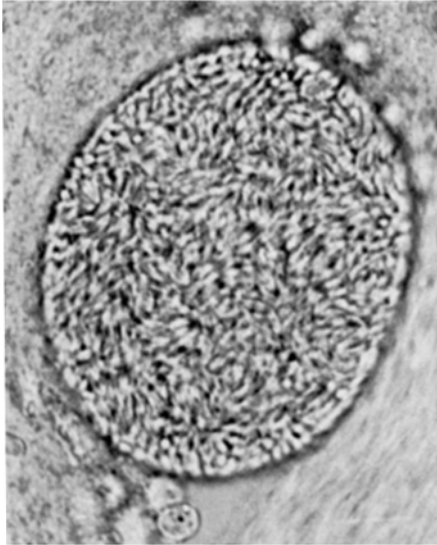


Abb. 1. Toxoplasmazyste aus Gehirnquetschpräparat der Maus. Orig. 960mal vergr.

In der KBR wurden bei Mäusen nach i.p. Infektion die ersten schwach positiven Reaktionen nach dem Verschwinden von Krankheits-symptomen am 14. Tag beobachtet. Die Titer stiegen bis zum 35.—40. Tag auf Werte bis zu 1:640 an und schwankten dann im Verlauf der 313tägigen Beobachtungszeit zwischen 1:80 und 1:2560 (Abb. 2). Ein Titerabfall konnte auch in der KBR nicht beobachtet werden.

Während die Titerkurve im SFT nach starker und schwacher oraler sowie nach i.p. Infektion im wesentlichen übereinstimmte, sahen wir in der KBR von der Infektions-

stärke abhängige und auch individuell stark unterschiedliche Reaktionen (Abb. 3). Die ersten positiven Titer wurden nach i.p. Infektion am 14., die letzten negativen am 36. Tag beobachtet. Nach starker oraler Infektion ($\frac{1}{2}$ Gehirn pro Maus) wurde die KBR bei den wenigen überlebenden Tieren um den 12. Tag positiv und erreichte rasch (nach 21 Tagen) hohe Werte. Bei schwacher oraler Infektion blieb die KBR bis zum 33. Tag negativ und erreichte nur niedrige bis mittlere Titer (1:5—1:40).

Die durch passive Übertragung von Antikörpern durch die Muttermilch entstandenen SFT-Titer junger Mäuse, die zum Teil die gleiche Titerhöhe wie das Muttertier erreichten, verschwanden bis zum Alter von 50—75 Tagen. Die komplementbindenden Antikörper sanken noch rascher ab. Schon im Alter von 29 Tagen wurden negative Reaktionen beobachtet, die letzten schwach positiven Reaktionen (1:5+) im Alter von 60 Tagen (Abb. 4). Auch die Jungen negativer Mütter, die an positiven Ammen gesaugt hatten, reagierten im Alter von 4 Wochen im SFT und in der KBR positiv (SFT = 1:256—1:1000, KBR = 1:10 bis 1:20), waren jedoch frei von Toxoplasmen. Dagegen war der kon-

natal nicht infizierte Teil der Nachkommenschaft serologisch positiver Mäuse, der an negativen Ammen gesaugt hatte, im Alter von 4 Wochen in beiden Reaktionen negativ.

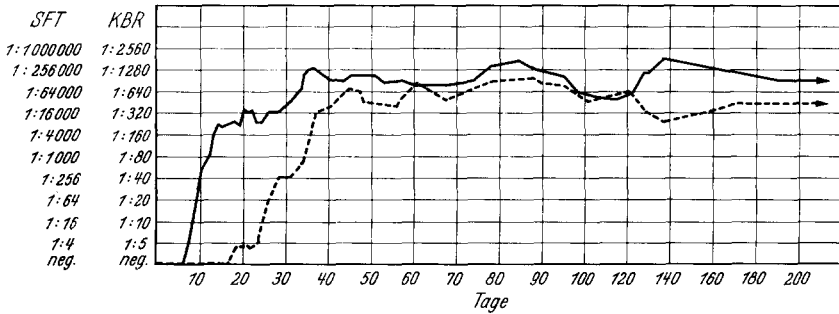


Abb. 2. SFT (—) und KBR (-----) Durchschnitts-Titerkurven i. p. infizierter Mäuse

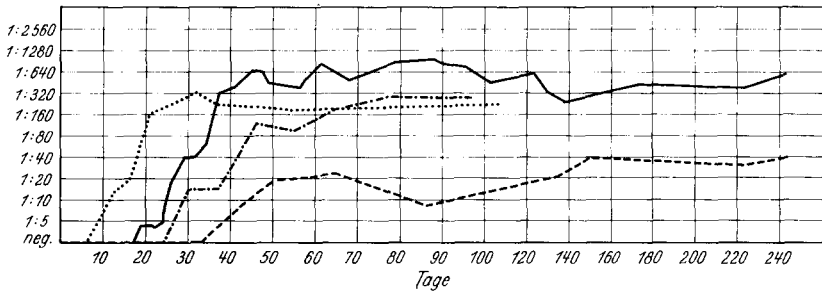


Abb. 3. KBR-Durchschnitts-Titerkurve i. p. infizierter Mäuse (—). Titerkurven nach starker (.....), mittlerer (-----) und schwacher (----) oraler Infektion

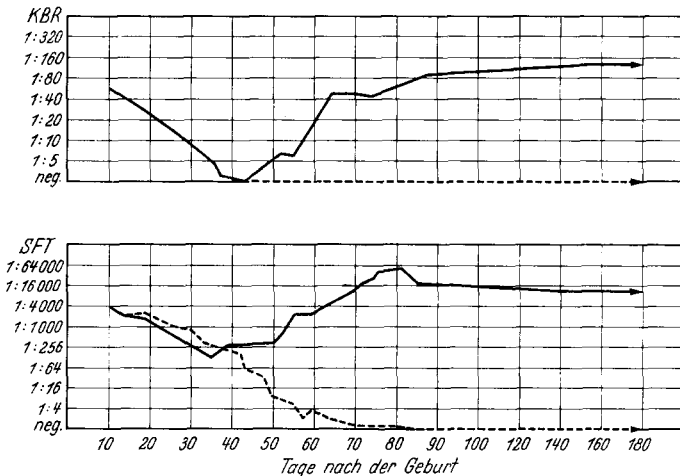


Abb. 4. Durchschnitts-Titerkurven konnatal infizierter Mäuse (—) und ihrer nicht infizierten Wurfgeschwister (-----)

Bei den stets völlig gesund erscheinenden, konnatal aber infizierten Mäusen fielen die SFT-Titer bis zum Alter von 35—40 Tagen in gleicher Weise wie bei ihren nicht infizierten Geschwistern, stiegen dann jedoch bis etwa zum 70. Tag auf Werte von durchschnittlich 1:16000 an (Abb. 4). Bei 8 konnatal infizierten Tieren, die an negativen Ammen gesaugt hatten, erreichte die aktive Antikörperbildung bis zum 35. Tag eine durchschnittliche Titerhöhe von 1:256 (1:16—1:1000), bis zum 72. Tag 1:16000 (1:4000—1:256000). Die Titer blieben bei einer Beobachtungszeit von 242 Tagen auf gleicher Höhe (durchschnittlich 1:16000). Die Ammen waren auch nach Beendigung des Versuches negativ.

Auch die KBR-Titer sanken bei konnatal infizierten Jungtieren zunächst ab und wurden teilweise am 39.—64. Tag sogar negativ. Der aktive Titeranstieg erfolgte zeitlich recht unterschiedlich. Waren im Alter von 64 Tagen noch einige Tiere negativ, so hatten andere bereits Titer von 1:640 erreicht. Im Alter von 73 Tagen wurden Titer von 1:5—1:1280 oder höher festgestellt. Von den 8 konnatal infizierten Mäusen, die von negativen Ammen gesäugt wurden, waren 7 Tiere im Alter von 35 Tagen in der KBR negativ, ein Tier hatte einen Titer von 1:5+. Im Alter von 72 Tagen hatten alle Tiere Titer von 1:20—1:80 oder höher entwickelt.

Bei allen Tieren, bei denen serologisch eine konnatale Infektion festgestellt wurde, konnten mikroskopisch im Gehirn Toxoplasmazysten nachgewiesen werden. Bei 30 serologisch als nicht infiziert erkannten Geschwistern verlief der Tierversuch negativ. Es genügt also zum Erkennen einer konnatal erworbenen Toxoplasmose bei Mäusen eine einmalige Untersuchung mit dem SFT im Alter von 70—80 Tagen.

Sämtliche 6 i.p. (SFT = 1:4000—1:64000, KBR = 1:80—1:320) und 9 konnatal infizierten Muttertiere hatten wenigstens einen toxoplasmatragenden Wurf. Die ersten Würfe waren häufiger infiziert als die folgenden, doch waren auch bei einigen Tieren mehrere Würfe nacheinander positiv; bei anderen wechselten infizierte und nicht infizierte Würfe unregelmäßig ab. Die Zahl der positiven Tiere schwankte in den einzelnen Würfen sehr (1 Tier von 9 bis 8 Tiere von 9), lag aber bei den ersten Würfen in der Regel höher als bei den folgenden. Insgesamt waren von 279 Nachkommen (41 Würfe) 77 Tiere = 27,6% infiziert. Von 14 ersten Würfen waren 44,3%, von 11 zweiten Würfen 29,6%, von 8 dritten Würfen 10,2%, von 6 vierten Würfen 19,4% und von 2 fünften Würfen 6,7% der Tiere angesteckt. Die Väter blieben toxoplasmosefrei.

Nach dem Beimpfen mit Organsuspensionen eines serologisch hochpositiven Hundes wiesen einige Tiere 4—5 Monate lang anhaltend niedrige SFT-Titer auf. Diese Tiere waren nicht infiziert. Auch die 35 Nachkommen aus 4 Würfen solcher Mütter und positiver Väter waren toxoplasmosefrei. 228 Nachkommen i.p. oder konnatal infizierter Böcke

und negativer Weibchen waren frei von Toxoplasmen, obwohl diese Tiere bis zum Absetzen mit ihren Vätern im gleichen Käfig gehalten wurden. Auch die Muttertiere blieben in dieser Versuchsreihe negativ.

Besprechung

Beobachteten VOLLBRECHTSHAUSEN, DESMONTS u. Mitarb., HELLBRÜGGE u. Mitarb. und EYLES bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten einige Monate nach der Infektion in der KBR bzw. im SFT teilweise einen deutlichen Titerabfall, so blieben die Titer bei Mäusen in unseren Versuchen in beiden Reaktionen auf gleicher Höhe. Die KBR wurde, ähnlich wie es VOLLBRECHTSHAUSEN sowie KASS und STEEN bei Kaninchen feststellten, nach i.p., oraler und konnataler Infektion erst einige Tage nach dem SFT positiv. Bei passiver Antikörperübertragung durch die Muttermilch wurde die KBR vor dem SFT negativ.

Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit der von WESTPHAL und PALM (1953) beschriebenen kombinierten Methode zur Parasitenisolation, so können wir die mit verdächtigem Material beimpten Mäuse meist mit einer einmaligen Untersuchung im SFT nach 16—20, besser nach 25 Tagen, als infiziert oder nicht infiziert erkennen: Alle Tiere mit Titern über 1:4000 sind positiv, Titer von 1:4—1:1000 gelten als zweifelhaft; diese Tiere sind daher, um passiv übertragene Antikörper auszuschließen, in 14tägigen Abständen solange zu untersuchen, bis ihre Titer entweder negativ geworden oder auf 1:4000 gestiegen sind. Der Antikörperrnachweis kann in der Regel durch den Zystennachweis bestätigt werden. Die KBR eignet sich nicht für die kombinierte Methode zur Parasitenisolation, da sie zu unregelmäßig und zu spät positiv wird. Im Gegensatz zu DEANE und NUSSENZWEIG (1959), die nach dem Verimpfen oder Verfüttern toxoplasmainfizierter Arthropoden an Mäuse sehr häufig im Gehirn Zysten nachweisen konnten, obwohl der SFT negativ ausgefallen war, konnten wir bei i.p., oral oder konnatal infizierten Tieren nur bei positivem SFT Toxoplasmazysten finden.

Bemerkenswert ist, daß die konnatale Infektion allein die serologisch positive Reaktion einer ganzen Tierpopulation bedingen kann.

Zusammenfassung

Der SFT- und KBR-Titerverlauf in Mäusen nach i.p., oraler und konnataler Infektion mit einem schwach virulenten Hundetoxoplasma-stamm sowie bei passiver Antikörperübertragung wird beschrieben. Von den völlig gesund erscheinenden Nachkommen experimentell latent infizierter Mäusemütter waren 27,6% konnatal infiziert. Bei allen serologisch als Parasitenträger erkannten Tieren konnten im Gehirn Zysten nachgewiesen werden.

Literatur

- BEVERLEY, J. K. A.: Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature (Lond.)* **183**, 1348—1349 (1959).
- BOCH, J., u. M. ROMMEL: Serologische Untersuchungen an Berliner Hunden auf Toxoplasmose. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* **76**, 292—296 (1963).
- COWEN, D., and A. WOLF: Experimental congenital toxoplasmosis. II. Transmission of toxoplasmosis to the placenta and fetus following vaginal infection in the pregnant mouse. *J. exp. Med.* **92**, 403—416 (1950).
- — Experimental congenital toxoplasmosis. III. Toxoplasmosis in the offspring of mice infected by the vaginal route. Incidence and manifestation of the disease. *J. exp. Med.* **92**, 417—429 (1950).
- DEANE, M. P., and R. S. NUSSENZWEIG: Observations on the diagnosis of chronic toxoplasma infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **1**, 119—128 (1959).
- DESMONTS, G., et LE-TAN-VINH: Sur la réaction de fixation du complément au cours de la toxoplasmose du cobaye. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* **148**, 1000—1002 (1954).
- EICHENWALD, H.: Experimental toxoplasmosis. I. Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. *Amer. J. Dis. Child.* **76**, 307—315 (1948).
- EYLES, D. E.: Serological response of white rats to toxoplasma infection. *J. Parasit.* **40**, 77—83 (1954).
- FRENKEL, J. K.: Effect of vaccination and sulfonamide therapy on experimental toxoplasmosis. *Fed. Proc.* **11**, 468—469 (1952).
- Host strain and treatment variations as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* **2**, 390—415 (1953).
- Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling toxoplasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **64**, 215—251 (1956).
- HELLBRÜGGE, T., W. SPIEGLER u. W. GREWING: Klinische, morphologische und serologische Befunde bei der generalisierten Toxoplasmose der Ratte. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **165**, 495—506 (1956).
- HEYBERGER, K., u. V. BOZDÉCH: Dynamika komplementfixačních protilátek u experimentální toxoplasmosy krys. *Čs. Parasit.* **8**, 167—173 (1961).
- KASS, E., and E. STEEN: Serological investigations of rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol. scand.* **28**, 169—173 (1951).
- NAKAYAMA, I., and H. MATSUBAYASHI: Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* in mice. *Keio J. Med.* **10**, 163—179 (1961).
- REMINGTON, J. S., L. JACOBS and M. L. MELTON: Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J. infect. Dis.* **108**, 163—173 (1961).
- SALFELDER, K.: Über eine kontrastreiche Anfärbung von *Entamoeba histolytica* im Gewebe. *Z. Tropenmed. Parasit.* **12**, 273—275 (1961).
- VOLLBRECHTSHAUSEN, R.: Vergleichende Untersuchungen über den Sabin-Feldman-Farbstest und die Toxoplasma-Komplementbindungsreaktion nach WESTPHAL in Tierversuchen. *Z. Tropenmed. Parasit.* **5**, 401—421 (1954).
- WAAL, D., van DER: Congenital transmission of avirulent *Toxoplasma gondii* after experimental infection in mice prior to gestation. *Trop. geogr. Med.* **12**, 251—257 (1960).
- WESTPHAL, A., u. G. PALM: Latente Toxoplasmainfektionen im Tierversuch als diagnostisches Hilfsmittel. I. Technik und Anwendung der Methode bei epidemiologischen Untersuchungen. *Z. Tropenmed. Parasit.* **4**, 322—339 (1953).

Dr. M. ROMMEL und I. MÜLLER,

Institut für Parasitologie der Freien Universität, 1 Berlin 37, Königsweg 65