

I simbiotici batterici (*Wolbachia*) delle filarie: implicazioni per il trattamento e la patologia delle filariosi

Chiara BAZZOCCHI (a), Fabrizio CECILIANI (b) e Norbert BRATTIG (c)

(a) Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, (b) Sezione di Biochimica e Fisiologia, Università degli Studi, Milano

(c) Department of Clinical Chemistry, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany

Riassunto. - Varie specie di nematodi filaridi ospitano batteri intracellulari Gram-negativi appartenenti al genere *Wolbachia*. In particolare, le specie di filaria di maggiore importanza medica e veterinaria sono interessate dalla simbiosi con *Wolbachia*. La presenza di questi batteri suggerisce che essi giochino un ruolo nella biologia del nematode e che possano partecipare alla patogenesi delle filariosi. *Wolbachia* potrebbe quindi rappresentare un target per il controllo delle infezioni da filarie ed una chiave per una migliore comprensione delle patologie ad esse associate. Nei fatti, trattamenti con tetracicline su filarie di varie specie, oltre a determinare la riduzione/eliminazione della popolazione di *Wolbachia*, sono risultati dannosi per le stesse filarie, confermando l'ipotesi che l'associazione *Wolbachia*/filaria sia obbligata. Inoltre, è stato dimostrato che proteine di *Wolbachia* sono riconosciute dagli anticorpi di ospiti infetti da filarie e che molecole di questo batterio (ad es. LPS) sono in grado di attivare i meccanismi dell'immunità innata nell'ospite vertebrato (ad es. produzione di citochine come IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ da parte di macrofagi).

Parole chiave: *Wolbachia*, filariosi, citochine, immunità innata, patogenesi.

Summary (*The Wolbachia endosymbionts of filarial nematodes: implications for the treatment and pathogenesis of filarial diseases*). - Filarial nematodes harbour intracellular, Gram-negative bacteria belonging to the genus *Wolbachia*. These bacteria have been observed in various species of filariae, including the main filariasis agents of humans and animals. It has been suggested that *Wolbachia* could play an important role in the biology of filarial nematodes and could be implicated in the pathogenesis of filarial diseases. *Wolbachia* could thus represent a target for the control of filariasis and a key to the understanding of these diseases. Indeed, in various species of filariae, tetracycline treatments have been shown both to reduce/eliminate the *Wolbachia* population and to determine detrimental effects on the nematodes. In addition, proteins of *Wolbachia* have been shown to determine specific IgG responses in animals infected by filariae and some *Wolbachia* molecules (e.g. LPS) have been shown to stimulate innate-immunity responses (e.g. production of cytokines such as IL1, IL6, IL10, TNF- α and IFN- γ by macrophages).

Key words: *Wolbachia*, filariasis, cytokine, innate immunity, pathogenesis.

Wolbachia nei nematodi filaridi

Le filariosi causate dai nematodi *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa* e *Onchocerca volvulus* si inseriscono fra le principali parassitosi dell'uomo nei paesi tropicali [1]. Nei paesi temperati, *Dirofilaria immitis* è causa della filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto. Le principali aree di ricerca nel campo delle filariosi riguardano la biologia dei parassiti, l'immunologia, la patologia ed il controllo. Recentemente, queste aree di studio hanno visto nuovi ed imprevisi sviluppi, derivanti da una focalizzazione della ricerca sui batteri simbiotici (*Wolbachia*) presenti nel corpo delle filarie. La prima parte di questo articolo prenderà in rassegna aspetti di base della biologia di *Wolbachia* e dell'associazione *Wolbachia*-filaria. La seconda parte

discuterà il possibile ruolo di *Wolbachia* nell'immunologia (e quindi nell'immunopatologia ed immunomodulazione) delle filariosi. Vale la pena di sottolineare che i fenomeni immunopatologici giocano un ruolo chiave nella patologia delle filariosi, ad esempio nel determinare l'insorgenza dell'elefantiasi tropicale (tipicamente associata alle infezioni da *B. malayi* e *W. bancrofti*) e della cecità dei fiumi (causata da *O. volvulus*). Inoltre, si ritiene che la cronicità e la lunga durata delle infezioni da filarie derivino dalla "capacità" dei parassiti di modulare a proprio vantaggio la risposta immunitaria. In questo senso, lo studio dell'immunologia delle filariosi rappresenta un prerequisito essenziale per la comprensione sia della patologia, sia dei meccanismi attraverso cui il parassita evade la risposta immunitaria.

Caratteristiche generali e distribuzione di Wolbachia nelle filarie

All'inizio degli anni settanta, studi ultrastrutturali sull'embriogenesi dei nematodi hanno mostrato la presenza di corpuscoli negli oociti e negli embrioni del nematode filaride *D. immitis* [2, 3]. La natura batterica di questi corpuscoli venne riconosciuta nel 1975 e la loro presenza venne evidenziata anche in altre specie di filarie tra le quali *O. volvulus* e *B. malayi* [4-6]. Studi di microscopia elettronica hanno evidenziato la presenza di questi batteri nel citoplasma delle cellule delle corde laterali sia dei maschi che delle femmine. Nelle femmine, i batteri sono presenti anche negli oogoni, negli oociti e negli embrioni [4-6]. Al contrario, batteri non sono ancora stati osservati nel sistema riproduttore maschile. Batteri sono stati osservati anche nelle microfilarie e nelle larve all'interno degli insetti vettori [5]. Questa distribuzione dei batteri nel corpo delle filarie ne suggerisce la possibile trasmissione transovarica dalla madre alla prole.

Solo nel 1994, i batteri simbiotici di *D. immitis* sono stati identificati come appartenenti al gruppo 2 degli alpha-proteobatteri [7] e sono stati mostrati essere filogeneticamente affini ai batteri intracellulari simbiotici degli artropodi del genere *Wolbachia* [8]. *Wolbachia*, inizialmente riscontrata negli artropodi (principalmente negli insetti), è stata in seguito trovata in quasi tutte le specie di filarie fino ad ora analizzate [9-12] (Tab. 1). Tra le filarie risultate positive per la presenza di

Wolbachia si possono ricordare *O. volvulus*, *O. ochengi* (e altre specie appartenenti al genere *Onchocerca*), *D. immitis*, *D. repens*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *Mansonella ozzardi* e *Litomosoides sigmodontis*. *Acanthocheilonema viteae* ed *O. flexuosa* sono due esempi di filarie risultate invece prive del batterio [9,10]. Nelle specie di filarie oggetto di studi approfonditi e positive per la presenza di *Wolbachia* (ad es. *D. immitis*, *D. repens*, *O. ochengi*, *O. volvulus*, *B. malayi*), tutti gli individui analizzati sono risultati infetti [9,13,14]. Non è possibile escludere che nella medesima specie o popolazione di filaria ci sia un polimorfismo per la presenza di *Wolbachia*. Tuttavia, basandosi sui dati fino a ora raccolti, la prevalenza di *Wolbachia* nelle specie infette risulta del 100%.

Filogenesi di Wolbachia e sua relazione con la filogenesi dell'ospite

Attraverso l'analisi del gene *ftsZ*, sono state studiate le relazioni filogenetiche tra la *Wolbachia* dei nematodi filaridi e quella degli artropodi. E' stata infatti proposta una suddivisione di *Wolbachia* in quattro differenti gruppi: A e B per gli artropodi [15] e C e D per i nematodi [9]. Questo risultato è stato confermato da successive analisi filogenetiche basate su altri geni batterici come per esempio i geni *wsp*, 16S rDNA e *GroEL* [14,16-19].

Sulla base dei geni sequenziati, si stima che la separazione tra i gruppi C e D di *Wolbachia* dei nematodi sia avvenuta circa 100 milioni di anni fa [9]. Analoga-

Tabella 1. - Specie di filaria in cui si è riscontrata la presenza di batteri intracellulari

| Specie di filaria | PCR e sequenziamento | Microscopia elettronica | Immuno-istochimica |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>Dirofilaria immitis</i> | Si | Si | Si |
| <i>D. repens</i> | Si | Si | nd |
| <i>Onchocerca armillata</i> | nd | nd | Si |
| <i>O. fasciata</i> | nd | Si | Si |
| <i>O. flexuosa</i> | nd | No | No |
| <i>O. jakutensis</i> | nd | Si | nd |
| <i>O. gibsoni</i> | Si | Si | Si |
| <i>O. gutturosa</i> | Si | nd | nd |
| <i>O. lienalis</i> | Si | nd | nd |
| <i>O. ochengi</i> | Si | Si | Si |
| <i>O. tarsicola</i> | nd | nd | Si |
| <i>O. volvulus</i> | Si | Si | Si |
| <i>Loa loa</i> | Si | No | nd |
| <i>Mansonella ozzardi</i> | Si | Si | nd |
| <i>Brugia malayi</i> | Si | Si | nd |
| <i>B. pahangi</i> | Si | Si | nd |
| <i>Wuchereria bancrofti</i> | Si | Si | nd |
| <i>Litomosoides sigmodontis</i> | Si | No/Si | Si |
| <i>Dipetalonema setariosum</i> | nd | No | nd |
| <i>Acanthocheilonema viteae</i> | No | No | nd |

Le informazioni sulla presenza di batteri intracellulari nei nematodi filaridi sono state derivate da [69, 70]. La PCR (*polymerase chain reaction*) ed il sequenziamento degli amplificati hanno consentito l'identificazione dei batteri come appartenenti al genere *Wolbachia*.

mente, la separazione tra le *wolbachiae* degli artropodi (A e B) e quelle dei nematodi (C e D) potrebbe essere avvenuta 100 milioni di anni fa. Sebbene queste stime siano molto approssimative, esse suggeriscono che tra nematodi e artropodi non siano avvenuti, in tempi recenti, fenomeni di trasmissione orizzontale di *Wolbachia*. Comunque, risalendo la separazione tra artropodi e nematodi ad oltre 600 milioni di anni fa (quindi molto prima rispetto alla separazione dei loro batteri simbiotici), è chiaro che deve essere avvenuta a un certo punto una trasmissione “*interphylum*” di *Wolbachia*, oppure che sia gli artropodi che i nematodi abbiano acquisito *Wolbachia* a partire da una terza fonte.

Un limite delle ricostruzioni filogenetiche finora ottenute è l'impossibilità di definire quali, tra le *wolbachiae* di nematodi e di artropodi, siano ancestrali. La risoluzione delle relazioni tra i quattro gruppi di *Wolbachia* trova infatti due grossi ostacoli: il primo è dovuto al fatto che i diversi “*outgroups*” possibili (*Anaplasma marginale*, *Ehrlichia* spp., *Cowdria* spp.) sono troppo distanti da *Wolbachia* e quindi non idonei per la definizione di una radice attendibile degli alberi filogenetici [12]. Il secondo ostacolo deriva dal tasso di evoluzione molecolare dei geni presi in esame, apparentemente troppo elevato per la risoluzione della radiazione evolutiva dei quattro gruppi di *Wolbachia*.

Oltre ad esaminare le relazioni fra i gruppi principali di *Wolbachia*, la ricerca filogenetica si è occupata di confrontare la filogenesi degli ospiti (artropodi o nematodi filaridi) a quella dei simbiotici (*Wolbachia*). Nel caso delle filarie, la filogenesi di *Wolbachia* risulta consistente con la filogenesi degli ospiti [12]. Questo indica che *Wolbachia* e i relativi ospiti filaridi hanno subito un lungo processo coevolutivo, con trasmissione almeno prevalentemente verticale. Al contrario, negli artropodi *Wolbachia*, oltre ad essere distribuita in modo irregolare tra diverse popolazioni e specie, presenta una filogenesi non sempre congruente con la filogenesi degli ospiti [15-17, 20]. Questo suggerisce che potrebbero essere avvenuti fenomeni di trasmissione orizzontale.

In conclusione, le dinamiche evolutive di *Wolbachia* negli artropodi e nei nematodi sono differenti, a indicare eventi di perdita dell'infezione ed eventi di trasmissione orizzontale negli artropodi e un'infezione stabile e una lunga storia coevolutiva nei nematodi [12].

La relazione Wolbachia-filaria: un possibile esempio di mutualismo obbligato

Ci si aspetta che una lunga coevoluzione fra ospiti (filaria) e simbiotici (*Wolbachia*) porti ad un coadattamento reciproco e ad una reciproca dipendenza. Nei fatti, è noto sin dall'inizio degli anni '70 che la tetraciclina (che ora sappiamo essere attiva su *Wolbachia*) può avere effetti profilattici nei confronti dell'infezione da parte di *B. malayi* e *L. sigmodontis* in roditori [21]. Esperimenti paralleli hanno mostrato anche

che la tetraciclina non ha effetto profilattico nei confronti di *A. viteae*, filaria che non risulta infetta da *Wolbachia* [10, 21]. Altri studi su *B. pahangi* hanno messo in evidenza un effetto inibitorio della tetraciclina sullo sviluppo larvale nell'ospite vettore [22] e sulla produzione di microfilarie da parte di adulti ospitati da roditori [23]. Recentemente è stata evidenziata un'inibizione dell'embriogenesi in *D. immitis* come conseguenza della somministrazione di tetraciclina [24]. Queste osservazioni preliminari sugli effetti della tetraciclina su filarie ospitanti *Wolbachia* avvalorano l'ipotesi che la simbiosi con *Wolbachia* sia obbligata, soprattutto se si considera la non efficacia della tetraciclina nei confronti di *A. viteae*. Non si può comunque escludere la possibilità che la tetraciclina abbia un effetto diretto sul verme, non mediato da un effetto sul batterio simbiotico. Recentemente, esperimenti su tre specie di filarie, *B. pahangi*, *D. immitis* e *L. sigmodontis* hanno mostrato che trattamenti con tetraciclina portano a una degenerazione di *Wolbachia* e/o a una mancata trasmissione del batterio [10, 25]. Inoltre, in *O. ochengi* il trattamento con tetraciclina ha portato, oltre alla rimozione di *Wolbachia*, alla morte dei vermi adulti [26].

Non è comunque facile interpretare questi dati. La spiegazione più semplice è quella che il sistema filaria/*Wolbachia* costituisca una simbiosi obbligata e che la tetraciclina vada in qualche modo ad interferire con questa simbiosi. Una parte dei risultati ottenuti potrebbe essere interpretata invocando eventi di incompatibilità citoplasmatica (alterazione riproduttiva che *Wolbachia* determina negli artropodi; [27]). Per esempio, la degenerazione embrionale del nematode filaride in seguito a trattamenti con tetraciclina potrebbe derivare dalla fusione di spermatozoi prodotti prima dell'inizio del trattamento e conservati nella spermateca (quindi “alterati” da *Wolbachia*) con oociti prodotti dopo l'inizio del trattamento (quindi privi di *Wolbachia* e incapaci di “riparare” gli spermatozoi “alterati”; per una descrizione del fenomeno, vedere [25]). Se questa ipotesi fosse corretta, trattamenti con tetraciclina per lunghi periodi dovrebbero portare a generare maschi e femmine di filaria entrambi liberi da *Wolbachia*, con produzione di spermatozoi non “alterati”. Come conseguenza di questo, l'embriogenesi dovrebbe riprendere. Studi in proposito sono stati portati avanti trattando pazienti infetti con *O. volvulus* per lunghi periodi, senza tuttavia ottenere risultati che indicassero una ripresa dell'embriogenesi [28]. L'inibizione dell'embriogenesi determinata dal trattamento con tetraciclina sembra quindi essere a lungo termine.

Implicazioni per il trattamento delle filariosi

I risultati ottenuti attraverso trattamenti con tetraciclina aprono interessanti prospettive per il controllo delle filariosi, in particolare per quanto riguarda

il trattamento di pazienti affetti da oncocercosi. Infatti, le patologie oculari tipiche di questi pazienti sono determinate dalle microfilarie. Un'inibizione a lungo termine dell'embrionogenesi (e quindi della produzione di microfilarie) rappresenterebbe un risultato di notevole valore per la terapia dell'oncocercosi. Infatti, i trattamenti correnti non determinano inibizione a lungo termine della produzione di microfilarie. Si deve infine ricordare che l'effetto macrofilaricida determinato dal trattamento con tetracicline su *O. ochengi* apre la prospettiva di ottenere simili effetti in pazienti infettati da *O. volvulus*. Anche in questo caso, si deve ricordare come non sia ancora disponibile un trattamento macrofilaricida utilizzabile nell'oncocercosi umana. Un ulteriore aspetto da considerare, riguarda il possibile ruolo di *Wolbachia* negli effetti collaterali dei trattamenti filaricidi. Infatti, una preventiva riduzione della carica di *Wolbachia* mediante trattamenti con antibiotici potrebbe portare ad una riduzione degli effetti collaterali di successivi trattamenti filaricidi.

Ruolo di *Wolbachia* nell'immunologia e patogenesi delle filariosi

La scoperta della presenza di *Wolbachia* all'interno delle filarie potrebbe portare ad una rivalutazione complessiva dei meccanismi patogenetici delle filariosi. In primo luogo, *Wolbachia* può essere considerata come un aggregato di antigeni somatici e potrebbe rappresen-

tare un'ulteriore fonte di antigeni secretori/escretori. Inoltre, una particolare attenzione dovrebbe essere rivolta alla possibilità che *Wolbachia* determini fenomeni immunopatologici legati a meccanismi di immunità innata. Si deve sottolineare che *Wolbachia* è stata assegnata al gruppo alpha 2 dei proteobatteri, tipici rappresentanti dei Gram-negativi. Come tale, ci si può aspettare che *Wolbachia* condivida con gli altri Gram-negativi particolari strutture molecolari, come per esempio i lipopolisaccaridi (o LPS). Vale la pena di sottolineare che, mentre i meccanismi di immunità innata nei confronti di eucarioti metazoi (inclusi i nematodi) sono sostanzialmente ignoti, lo studio dell'immunità innata nei confronti dei batteri ha ormai portato alla comprensione di una serie di meccanismi fondamentali. In Tab. 2 sono indicati alcuni esempi di risposte dei sistemi dell'immunità innata e acquisita osservate in corso di filariosi attribuibili a molecole di *Wolbachia*. E' quindi possibile reinterpretare una parte dei fenomeni immunopatologici ed immunomodulatori osservati in corso di filariosi sulla base del fatto che le filarie hanno una componente batterica non trascurabile, rappresentata da *Wolbachia*.

L'immunità innata nei confronti dei batteri

La strategia della risposta innata non è tanto quella di riconoscere ogni possibile antigene quanto piuttosto di focalizzare l'attenzione su poche strutture, chimicamente differenti, ma conservate fra estesi gruppi di organismi.

Tabella 2. - Risposte infiammatorie e anti-infiammatorie di ospiti vertebrati nei confronti di nematodi filaridi che si ritiene essere determinate da molecole di *Wolbachia*

| Ospite vertebrato | Risposta dell'ospite | Molecole prodotte | Ospite di <i>Wolbachia</i> | Molecole di <i>Wolbachia</i> |
|-------------------|---|---|----------------------------|------------------------------|
| Gatto | produzione di anticorpi | IgG | <i>D. immitis</i> | WSP [67] |
| Topo | risposta dei macrofagi (pro-infiammatoria) | TNF- α IL-1 NO | <i>B. malayi</i> | LPS [37] |
| Uomo | risposta dei macrofagi (pro/anti-infiammatoria) | TNF- α IL-8 IL-10 HLA-DR | <i>O. volvulus</i> | LPS [65] |
| Uomo | chemotassi dei neutrofili | IL-8 | <i>O. volvulus</i> | candidati: LPS [40] |
| Uomo | reazione al trattamento con dietilcarbamazina | TNF- α IL-1 IL-6 IL-10 LBP sTNF-R | <i>B. malayi</i> | sospetti: LPS [45, 46] |

La strategia consiste quindi nel rilevare marcatori che indichino la presenza di un particolare tipo di patogeno. Molecole capaci di indurre risposte di tipo innato sono note in particolare per i batteri. Alcuni esempi di queste molecole batteriche sono i dinucleotidi CpG non metilati, la *heat shock protein 60* (HSP 60), i gruppi formilmetioninici e gli LPS, questi ultimi presenti nella membrana esterna della parete cellulare dei batteri Gram-negativi [29-32].

Il riconoscimento di queste molecole permette all'organismo di rilevare la presenza di batteri. I meccanismi dell'immunità innata si sono evoluti chiaramente come prima linea di difesa nei confronti di agenti patogeni. Tuttavia, le risposte di tipo innato, laddove eccessive o protratte nel tempo, possono dar luogo a fenomeni immunopatologici come per esempio lo *shock* settico scatenato dagli LPS. Nel torrente circolatorio gli LPS vengono legati ad una proteina serica, la *LPS-binding protein* (LBP), una proteina della fase acuta [33]. La LBP trasferisce la molecola di LPS al recettore CD-14 presente sulla superficie dei macrofagi e delle cellule B [34]. Il CD-14 da solo non è ancora sufficiente per l'attivazione del segnale, ma sono necessarie almeno altre due proteine, TLR-4 (*Toll like receptor 4*) e MD-2. Si ritiene che TLR-4 e MD-2 siano associate costitutivamente, mentre il CD-14 si aggiunge al complesso solo dopo il legame con gli LPS [35]. Il TLR-4 attivato induce a sua volta, attraverso una serie di meccanismi intermedi, la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta immune e nell'infiammazione. In particolare, la stimolazione dei macrofagi CD-14⁺ da parte degli LPS determina la produzione di NO (*nitric oxide*), della chemochina IL-8 (ad attività chemoattraente per i granulociti neutrofili e basofili) e di una serie di citochine fra cui TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ (coinvolte nella risposta infiammatoria) ed IL-10 (implicata nella regolazione della funzione linfocitaria e nella modulazione della risposta infiammatoria).

Quando sono presenti in quantità ridotte, gli LPS inducono i macrofagi a produrre TNF- α , che a sua volta induce la produzione di IL-1. Entrambi attivano le cellule endoteliali a produrre altre molecole, come per esempio IL-8 [36]. TNF- α ed IL-1 stimolano il rilascio di V-CAM (*vascular-cell adhesion molecule*) che blocca il "rotolamento" dei granulociti lungo la parete endoteliale in prossimità della zona interessata dall'invasione dei patogeni. L'endotelio attivato rilascia inoltre anche altre molecole coinvolte nell'infiammazione, l'NO ed il PAF (*platelet activating factor*): NO è un potente vasodilatatore, mentre PAF è un potente bronco-costrittore e vasocostrittore.

Se presenti in quantità più elevata, come si può verificare per esempio nel corso di una infezione acuta da batteri Gram-negativi, la produzione di TNF- α ed IL-1 viene estesa a tutto l'apparato cardiovascolare. L'attivazione sistemica dei macrofagi provoca l'immissione

di grandi quantità di NO e PAF la cui azione combinata è alla base della ipotensione provocata da una vasodilatazione sistemica e della diffusa sofferenza endoteliale caratteristica dello *shock* settico. L'ipossia tissutale che ne consegue può inoltre aggravare ulteriormente la DIC (*disseminated intravascular coagulation*), anche essa caratteristica dello *shock* settico.

Induzione della risposta innata da parte di Wolbachia

Per quanto fosse attesa la presenza di LPS nella parete cellulare di *Wolbachia*, dati sperimentali a sostegno di tale ipotesi e comprovanti l'effettivo potere evocativo di una risposta da parte degli LPS di *Wolbachia* sono stati pubblicati solo recentemente [37]. È stato dimostrato che estratti di *B. malayi* sono in grado di indurre la produzione, da parte dei macrofagi CD-14⁺, di TNF- α , IL-1 ed NO, molecole generalmente prodotte in risposta agli LPS (Tab. 2). La presenza di LPS in estratti di filarie è stata ulteriormente evidenziata mediante LAL test (*Limulus amoebocyte lysate test*). La dipendenza della risposta dei macrofagi dalla presenza di *Wolbachia* è avvalorata anche dal fatto che estratti di *A. viteae* (una filaria priva di *Wolbachia*) non inducono la produzione di citochine. Una conferma di questi risultati è stata ottenuta stimolando i macrofagi con estratti di una linea cellulare di insetto infetta con *Wolbachia* o con estratti della stessa linea cellulare ottenuti dopo trattamento con tetraciclina per l'eliminazione del batterio [37].

Esiste un'altra popolazione cellulare coinvolta nella risposta nei confronti delle filariosi, i granulociti neutrofili, che partecipano alla formazione dei noduli che si formano attorno agli adulti di *O. volvulus*, sia sulla superficie delle filarie che come cellule predominanti degli oncocercomi [38]. Più in generale, i neutrofili rivestono un ruolo molto importante nella risposta infiammatoria che si scatena dopo il trattamento antifilaricida [39]. È possibile ipotizzare un ruolo di *Wolbachia* nell'attivazione o perlomeno nella chemotassi dei neutrofili? In effetti, in pazienti infetti con *O. volvulus* il trattamento con doxiciclina (antibiotico utilizzato per eliminare *Wolbachia*), riduce la presenza dei neutrofili in prossimità dei parassiti. I neutrofili sono inoltre assenti attorno agli adulti di *O. flexuosa*, una filaria del cervo nota per essere priva di *Wolbachia* [40]. Ricordiamo da ultimo come la presenza degli LPS di per sé stessa abbia una attività chemotattica nei confronti dei neutrofili, attività indotta da IL-8.

Un'ulteriore conferma del possibile coinvolgimento di *Wolbachia* può essere dedotta dalla valutazione delle risposte collaterali ai trattamenti microfilaricidi. Dietilcarbamazina (DEC) ed ivermectina sono due farmaci in grado di agire sulla vitalità delle microfilarie e di attivare i meccanismi di difesa dell'ospite. Il risultato è un'alterazione dell'interazione tra ospite e parassita

ed un aumento della capacità complessiva del sistema immunitario di distruggere le microfilarie mediante opsonizzazione, attivazione del complemento, degranulazione di polimorfonucleati (eosinofili e neutrofili) o fagocitosi da parte dei macrofagi [41-43]. La conseguenza più immediata è il rilascio di grosse quantità di molecole del parassita, e quindi anche di molecole appartenenti a *Wolbachia*.

L'effetto collaterale che spesso si riscontra in seguito a un trattamento con DEC o ivermectina nell'uomo e negli animali affetti da filariosi, in particolare in soggetti con alte cariche di microfilarie, è una reazione infiammatoria caratterizzata da eventuali eruzioni cutanee (nell'oncocercosi umana) e, nei casi più gravi, *shock*. L'entità di questi effetti è proporzionale alla quantità di microfilarie presenti [44-46].

Nel paziente affetto da oncocercosi, il trattamento con DEC porta ad un aumento di IL-5 circolante ed è seguito da eosinofilia e da una "up-regulation" di proteine cationiche rilasciate dagli eosinofili [47, 48]. Questo processo di reazioni si inserisce nel quadro di una risposta di tipo Th2 e di un danno legato a reazioni di ipersensibilità di tipo I. Tuttavia, sono stati evidenziati anche alti livelli di TNF- α e IL-6, due citochine prodotte dai macrofagi [45, 49]. Questo effetto è paragonabile alla reazione che avviene dopo una somministrazione sperimentale di LPS [45, 46]: il rilascio di IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ che si evidenzia dopo il trattamento con DEC è infatti simile a quello determinato dalla presenza di batteri Gram-negativi [50, 51]. Alcuni degli effetti collaterali dei trattamenti microfilaricidi potrebbero quindi essere provocati dalle wolbachiae rilasciate dalle microfilarie. Questa ipotesi è avvalorata dall'osservazione che in pazienti microfilaricidi si nota un aumento del livello di IL-6 molto presto dopo il trattamento con DEC (il culmine è raggiunto tra le 8 e le 24 ore dopo il trattamento) ed anche un aumento della LBP, la proteina della fase acuta tipicamente prodotta in corso di infezioni sostenute da batteri Gram-negativi [46].

Possibile ruolo degli LPS nella filariosi cardiopolmonare del cane

Oltre che in medicina umana, la filariosi rappresenta un grave problema sanitario anche per quello che riguarda la medicina veterinaria. Nonostante la presenza di parassiti adulti e/o di microfilarie in elevata quantità sia di per sé sufficiente a spiegare la maggior parte dei meccanismi patogenetici alla base della filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto, sarebbe possibile ipotizzare un coinvolgimento di *Wolbachia* e dei relativi LPS? In effetti, due patologie sistemiche, la DIC e lo *shock*, che saltuariamente vengono riscontrate in corso di filariosi, possono essere correlate patogeneticamente alla presenza degli LPS, ed in particolare alla produzione delle citochine TNF- α ed IL-1. Per quello che riguarda

la DIC, la lesione provocata dal parassita adulto è di per sé stessa sufficiente a provocare il rilascio di *tissue factor* (TF), la promozione dell'aggregazione piastrinica e l'attivazione dei meccanismi del sistema intrinseco della coagulazione [52]. È stata però anche ipotizzata una capacità intrinseca dei parassiti, indipendente dalla lesione meccanica da essi provocata, di indurre un'attivazione della cascata coagulativa, tanto che in passato è stata proposta la presenza di una molecola non ben definita in grado di attivare il plasminogeno [53]. In effetti la presenza di LPS nelle wolbachiae delle filarie, e la loro liberazione massiva, potrebbe giustificare l'insorgenza di una DIC. Le endotossine batteriche aumentano infatti la sintesi, l'esposizione sulla membrana ed anche il rilascio di TF da parte dei monociti. Inoltre, sia IL-1 che TNF- α sono in grado sia di aumentare l'espressione del TF sulle membrane delle cellule endoteliali, che contemporaneamente diminuire l'espressione di trombomodulina, l'attivatore della proteina ad attività anticoagulante Proteina C [54]. Come già descritto, il TNF- α è in grado di up-regolare l'espressione di I-CAM e V-CAM, le molecole di adesione delle cellule endoteliali. Ne consegue un aumento della adesione dei leucociti, che aggrava ulteriormente lo stato di sofferenza endoteliale liberando localmente sia radicali dell'ossigeno che proteasi attivate. Nel complesso quindi il meccanismo patogenetico degli LPS si può configurare nella duplice forma di attivazione della cascata della coagulazione e nella inibizione dei meccanismi di controllo della coagulazione stessa [55].

Per quello che riguarda lo *shock*, è stato dimostrato che l'inoculazione di un estratto di parassiti adulti, come del resto anche una morte improvvisa di microfilarie, provocano uno *shock* di grave entità [56]. Nonostante sia stata ipotizzata una base anafilattica, il meccanismo patogenetico alla base dello *shock* in corso di dirofilariosi non è stato ancora chiarito. La liberazione massiva di *Wolbachia* e conseguentemente dei suoi LPS, potrebbe essere alla base dello *shock* descritto da Kitoh *et al.* [56] mediante i meccanismi patogenetici descritti in precedenza.

Possibile ruolo anti-infiammatorio di Wolbachia

Oltre che come potenziale fonte di molecole che promuovono la risposta innata è possibile individuare per *Wolbachia* un ruolo non secondario nell'ambito della depressione della risposta immunitaria. È stato dimostrato che le filarie sono in grado di deprimere sia la risposta dei linfociti che la risposta infiammatoria cellulo-mediata [57, 58]. Sebbene la risposta cellulare in corso di filariosi sia consistente già nei primi stadi dell'infezione [59], si è evidenziata una diminuzione di tale risposta con l'aumentare della carica parassitaria.

La depressione della risposta cellulo-mediata potrebbe essere causata dall'IL-10, il cui rilascio è stato documen-

tato sia durante l'infezione da *O. volvulus* [60-63], che in corso di filariosi linfatica [64]. E' stato dimostrato [65] come IL-10 venga effettivamente prodotta dai macrofagi a seguito di stimolazione con estratti di *O. volvulus* (Tab. 2). I monociti/macrofagi, oltre ad essere implicati in processi infiammatori, potrebbero quindi rivestire anche un ruolo anti-infiammatorio in pazienti affetti da oncocercosi. Questi effetti sono coerenti con la presenza di LPS; l'esposizione prolungata agli LPS determina infatti una ipo-reattività che risulta essere mediata da IL-10 [65]. In ultima analisi, quindi, *Wolbachia* potrebbe essere responsabile sia di effetti pro-infiammatori, sia di effetti anti-infiammatori.

Il fatto che la depressione della risposta infiammatoria possa essere dovuta ad una produzione di IL-10 viene ulteriormente confermato dal trattamento mediante farmaci microfilaridi. Il trattamento con DEC provoca infatti sia il rilascio di mediatori dell'infiammazione, ma anche di IL-10 [45, 46], il cui livello risulta più elevato in soggetti microfilaricidi rispetto a soggetti amicrofilaricidi. In particolare, il picco massimo di IL-10 viene raggiunto successivamente (tra le 8 e le 48 ore) rispetto a quello dell'IL-6, il cui culmine ricordiamo essere raggiunto tra le 8 e le 24 ore dopo il trattamento.

Sono state inoltre rilevate elevate concentrazioni del recettore solubile del TNF- α , il cosiddetto sTNF-R75, la cui funzione si ritiene essere quella di neutralizzare le potenziali attività dannose del TNF- α stesso (Tab. 2). Il fatto che in pazienti che presentano una forte reazione infiammatoria venga rilevata una alta concentrazione di IL-10 e sTNF-R75 e che negli stessi soggetti l'aumento della concentrazione di IL-6 sia in correlazione con l'aumento di IL-10, è indicativo del fatto che i mediatori anti-infiammatori possano essere indotti come conseguenza della presenza di citochine pro-infiammatorie. Questi risultati suggeriscono che la forte risposta infiammatoria che si sviluppa dopo trattamento microfilaricida venga nello stesso tempo controllata da un processo anti-infiammatorio. E' interessante notare come il rilascio di sTNF-R75 possa essere ottenuto anche mediante una stimolazione dei monociti con LPS [66].

Wolbachia entra in contatto con il sistema immunitario dell'ospite?

Un aspetto importante da chiarire per comprendere l'eventuale ruolo di *Wolbachia* nella patologia delle filariosi riguarda l'effettivo rilascio di tali batteri e/o delle relative molecole e l'entità dell'interazione degli stessi con l'ospite. Infatti, anche assumendo che *Wolbachia* contenga molecole potenzialmente importanti sul piano immunopatologico, questo non implica che tali molecole siano presenti e vengano rilasciate in quantità tali da avere effetti reali sull'ospite. In prima istanza, possiamo assumere che la morte e la degenerazione delle microfilarie in corso di filariosi, quale si verifica nel

turnover quotidiano, porti ad un continuo rilascio di *Wolbachia* e delle relative molecole. Dobbiamo inoltre considerare il rilascio che potrebbe verificarsi con la morte dei parassiti adulti o di vermi ad altri stadi di sviluppo, così come la morte determinata da trattamenti micro- e macro-filaricidi. D'altra parte, possiamo comunque ipotizzare un rilascio di *Wolbachia* o di molecole associate da parte dei vermi nel corso del loro sviluppo o della loro sopravvivenza agli stadi di adulto o di microfilaria.

Proteine di *Wolbachia* vengono effettivamente riconosciute dal sistema immunitario dell'ospite. Il siero di gatti infetti con *D. immitis* presenta anticorpi circolanti contro la proteina di superficie di *Wolbachia* nota come WSP (*Wolbachia surface protein*, [67]). Infatti, in saggi di Western blot la proteina WSP, sovraespressa e purificata, è stata riconosciuta solo da sieri di gatti infettati sperimentalmente con *D. immitis* o di gatti risultati sieropositivi per *D. immitis*. La proteina non viene invece riconosciuta dai sieri di gatti non infetti, indicando così una risposta immunitaria specifica verso una proteina del batterio. Risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando, sempre in saggi di Western blot, sieri di pazienti infetti da *W. bancrofti* sulla proteina WSP della *Wolbachia* di *Brugia malayi* (filogeneticamente affine a *W. bancrofti*) [68].

Ringraziamenti

Si ringraziano Claudio Bandi e Laura Kramer per i sostanziali commenti fatti sul testo. C.B. ringrazia i professori Claudio Genchi e Luciano Sacchi per averla introdotta allo studio della parassitologia e della simbiosi. Gli studi sul ruolo immunologico di *Wolbachia* svolti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria Sezione di Patologia Generale e Parassitologia sono finanziati dal MURST.

Ricevuto il 1 gennaio 2001.

Accettato il 4 giugno 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Ottesen EA. Filarial infections. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7: 619-33.
- Harada R, Maeda T, Nakashima A, Sadakata M, Ando M, Yonomine K, Otsuji Y, Sato H. Electron-microscopical studies on the mechanism of oogenesis in *Dirofilaria immitis*. In: Sasa M (Ed.). *Recent advances in researches on filariasis and schistosomiasis in Japan*. Baltimore University Press, Baltimore: Maryland; 1970. p. 99-121.
- Lee C. *Dirofilaria immitis*: ultrastructural aspects of oocyte development and zygote formation. *Exp Parasitol* 1975;37:449-68.
- McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG. Microorganisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975;69:509-14.
- Kozek WJ. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol* 1977;63:992-1000.
- Kozek WJ, Figueroa M. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26:663-78.

7. Bandi C, Damiani G, Sacchi L, Bardin MG, Sironi M, Fani R, Magrassi L. Caratterizzazione molecolari e identificazione di simbionti. *Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia* 1994;37:53-7.
8. Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. A close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molec Biochem Parasitol* 1995;74:223-7.
9. Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B* 1998; 265:2407-13.
10. Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Büttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 1999;103:11-8.
11. Taylor MJ, Bilo K, Cross HF, Archer JP, Underwood AP. 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterisation of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B pahangi* and *Wuchereria bancrofti*. *Exp Parasitol* 1999;91:356-61.
12. Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 2001; 122:93-103.
13. Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A, Lazdins J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control? *Parasitol Today* 2000; 16:179-80.
14. Bazzocchi C, Jammongluk W, O'Neill S, Anderson TJC, Genchi C, Bandi C. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr Microbiol* 2000;41:96-100.
15. Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B* 1995; 261:55-63.
16. Masui S, Sasaki T, Ishikawa H. *groE*-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropod: a new approach to their phylogeny. *Zool Sci* 1997;14:701-6.
17. Zhou W, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 1998;265:509-15.
18. Van Meer MM, Witteveldt J, Stouthamer R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 1999;8:399-408.
19. Malloch G, Fenton B, Butcher RD. Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup of *Wolbachia* in the European raspberry beetle *Byturus tomentosus*. *Mol Ecol* 2000;9:77-90.
20. O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2699-702.
21. Mc Call JW, Jun JJ, Bandi C. *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. *Ital J Zool* 1999;66:7-10.
22. Sucharit S, Viraboonchai S, Panavut N, Harinasuta C. Studies on the effects of tetracycline on *Brugia pahangi* infection in *Aedes togoi* Southeast Asian. *J Trop Med Public Health* 1978;9:55-9.
23. Bosshardt SC, Mc Call JW, Coleman SH, Jones KL, Petit TA, Klei TL. Prophylactic activity of tetracycline against *Brugia pahangi* infection in jirds (*Meriones unguiculatus*). *J Parasitol* 1993;79:775-7.
24. Genchi C, Sacchi L, Bandi C, Venco L. Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. *Parassitologia* 1998;40:247-9.
25. Bandi C, Mc Call JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol* 1999;29:357-64.
26. Langworthy NG, Renz A, Mackenstedt U, Henkle-Duhrsen K, De Bronsvort MB, Tanya VN, Donnelly MJ, Trees AJ. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2000;267:1063-9.
27. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 1997; 42:587-609.
28. Hoerauf A, Volkmann L, Hamelmann C, Adjei O, Autenrieth IB, Fleischer B, Büttner DW. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet* 2000; 355: 1242-3.
29. Ridet PR, Dedet JP, Estrarre P. Macrophage function in patients with American cutaneous leishmaniasis: in vitro cytotoxicity and interleukin-1 production. *J Parasitol* 1987;73:769-73.
30. Chang W, Yeh SH, Drath DB. Innate immune properties of the immortalized macrophage cell line I-95. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31:67-70.
31. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2879-83.
32. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999;162:3212-9.
33. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-54.
34. Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 1989; 170:1231-41.
35. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.
36. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-44.
37. Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *J Exp Med* 2000;191:1429-36.
38. Rubio De Krömer MT, Krömer M, Luersen K, Brattig NW. Detection of a chemotactic factor for neutrophils in extracts of female *Onchocerca volvulus*. *Acta Trop* 1998;71:45-56.
39. Gutiérrez-Pena EJ, Knab J, Büttner DW. Neutrophil granule proteins: evidence for the participation in the host reaction to skin microfilariae of *Onchocerca volvulus* after diethylcarbamazine administration. *Parasitology* 1996;113:403-14.
40. Brattig NW, Büttner DW, Hoerauf A. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect* 2001;3:1-8.

41. Piessens WF, Beldekas M. Diethylcarbamazine enhances antibody-mediated cellular adherence to *Brugia malayi* microfilariae. *Nature* 1979;282:845-7.
42. Medina-De La Garza CE, Brattig NW, Tischendorf FW, Jarrett JM. Serum-dependent interaction of granulocytes with *Onchocerca volvulus* microfilariae in generalized and chronic hyper-reactive onchocerciasis and its modulation by diethylcarbamazine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:701-6.
43. Maizels RM, Denham DA. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology* 1992;105Suppl:S49-60.
44. Francis H, Awadzi K, Ottesen EA. The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine: clinical severity as a function of infection intensity. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:529-36.
45. Haarbrink M, Terhell AJ, Abadi GK, Mitsui Y, Yazdanbakhsh M. Inflammatory cytokines following diethylcarbamazine (DEC) treatment of different clinical groups in lymphatic filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:665-72.
46. Haarbrink M, Abadi GK, Buurman WA, Dentener MA, Terhell AJ, Yazdanbakhsh M. Strong association of interleukin-6 and lipopolysaccharide-binding protein with severity of adverse reactions after diethylcarbamazine treatment of microfilaremic patients. *J Infect Dis* 2000;182:564-9.
47. Ackerman SJ, Kephart GM, Francis H, Awadzi K, Gleich GJ, Ottesen EA. Eosinophil degranulation: An immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *J Immunol* 1990;144:3961-9.
48. Limaye AP, Abrams JS, Silver JE, Awadzi K, Francis HF, Ottesen EA, Nutman TB. Interleukin-5 and the post-treatment eosinophilia in patients with onchocerciasis. *J Clin Invest* 1991;88:1418-21.
49. Turner PF, Rockett KA, Ottesen EA, Francis H, Awadzi K, Clark IA. Interleukin-6 and tumor necrosis factor in the pathogenesis of adverse reactions after treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *J Infect Dis* 1994;169:1071-5.
50. Wilson M, Seymour R, Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun* 1998;66:2401-9.
51. Kim HY, Rikihisa Y. Expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in human peripheral blood leukocytes exposed to human granulocytic ehrlichiosis agent or recombinant major surface protein P44. *Infect Immunol* 2000;68:3394-402.
52. Henry CJ, Dillon R. Heartworm disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:1148-51.
53. Kitoh K, Wato K, Chaya K, Kitagawa H, Sasaki Y. Clinical, hematologic, and biochemical findings in dogs after induction of shock by injection of heartworm extract. *Am J Vet Res* 1994;55:1535-41.
54. Thijs LG, De Boer JP, De Groot MC, Hack CE. Coagulation disorders in septic shock. *Intensive Care Med* 1993;19Suppl 1:S8-15.
55. Levi M, ten Cate H, Van der Poll T, van Deventer J. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993;270:975-9.
56. Kitoh K, Wato K, Kitagawa H, Sasaki Y. Blood coagulopathy in dogs with shock induced by injection of heartworm extract. *Am J Vet Res* 1994;55:1542-7.
57. Elkhalfi MY, Ghalib HW, Dafa' Alla T, Williams JF. Suppression of human lymphocyte responses to specific and non-specific stimuli in human onchocerciasis. *Clin Exp Immunol* 1991;86:433-9.
58. Rao UR, Nasarre C, Coleman SU, Bakeer M, Dennis VA, Horohov DW, Klei TR. Cellular immune responses of jirds to extracts of life cycle stages and adult excretory secretory products during the early development of *Brugia pahangi*. *Exp Parasitol* 1996;82:255-66.
59. Soboslay PT, Dreweck CM, Taylor HR, Brotman B, Wenk P, Greene BM. Experimental onchocerciasis in chimpanzees: Cell-mediated immune responses, and production and effects of IL-1 and IL-2 with *Onchocerca volvulus* infection. *J Immunol* 1991;147:346-53.
60. Elson LH, Calvopina M, Paredes W, Araujo E, Bradley JE, Guderian RH, Nutman TB. Immunity to onchocerciasis: putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*. *J Infect Dis* 1995;171:652-8.
61. Lüder CG, Schulz-Key H, Banla M, Pritze S, Soboslay PT. Immunoregulation in onchocerciasis: predominance of Th1-type responsiveness to low molecular weight antigens of *Onchocerca volvulus* in exposed individuals without microfilaridermia and clinical disease. *Clin Exp Immunol* 1996;105:245-53.
62. Brattig NW, Nietz C, Hounkpatin S, Lucius R, Seeber F, Pichlmeier U, Pogonka T. Differences in cytokine responses to *Onchocerca volvulus* extract and recombinant Ov33 and OvL3-1 proteins in exposed subjects with various parasitologic and clinical states. *J Infect Dis* 1997;176:838-42.
63. Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* 2000;12:623-30.
64. Mahanty S, Mollis SN, Ravichandran M, Abrams JS, Kumaraswami V, Jayaraman K, Ottesen EA, Nutman TB. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J Infect Dis* 1996;173:769-73.
65. Brattig NW, Rathjens U, Ernst M, Geisinger F, Renz A, Tischendorf FW. Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and anti-inflammatory responses of human monocytes. *Microbes Infect* 2000;2:1147-57.
66. Leeuwenberg JF, Dentener MA, Buurman WA. Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes: Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein. *J Immunol* 1994;152:5070-6.
67. Bazzocchi C, Ceciliani F, Mc Call JW, Ricci I, Genchi C, Bandi C. Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. *Proc R Soc Lond B* 2000;267:2511-6.
68. Tzertzinis G, Foster J, Punkosdy G, Slatko B. Cloning and expression of the *Wolbachia* surface protein (WSP) gene from *Brugia malayi*. In: *First International Wolbachia Conference*. Kolymbari, Crete 7-12 June 2000. p 127.
69. Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML. The *Wolbachia* endosymbionts of filarial nematodes. In: Kennedy MW, Harnett W. (Ed.). *Parasitic Nematodes*. CAB International. Wallingford: UK; 2001. p. 25-43.
70. Taylor MJ, Hoerauf AM. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 1999;15:437-42.