

DIE SELLULÊRE VERDEDIGINGSMEGANISME BY DIE VARSWATERSLAK
BULINUS AFRICANUS

Estia Yssel, Honns. B.Sc., H.O.D.

Verhandeling goedgekeur as gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in Dierkunde in die Fakulteit Natuurwetenskappe van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Leier : Dr. C.T. Wolmarans

Hulpleier : Prof. G.C. Loots

Potchefstroom

1989

ABSTRACT

Certain aspects of the cellular immune mechanism of the freshwater snail *Bulinus africanus* were investigated. It was established by means of electronmicroscopy that mainly two cell types namely granulocytes and hyalinocytes circulate in the haemolymph. The in vitro morphological changes of the granulocytes were not dependent on the presence of snail serum. Although there was a correlation between snail mass and cell number no such correlation could be found between the size of either the granulocytes, or the hyalinocytes and snail mass.

Fluorescence microscopy was used to investigate the possibility of granulocyte subpopulations in the haemolymph of this snail. This was done by using lectins isolated from *Glycine max*, *Canavalia ensiformis*, *Ricinus communis* en *Triticum vulgare*. No subpopulations could be found.

The functional properties of the granulocytes and hyalinocytes were investigated by both light and electron microscopy. Only the granulocytes were involved in the phagocytosis of *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus* bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.

In the encapsulation of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* sporocysts only granulocytes were involved. Although the influence of humoral factors in these functions could not be excluded, it seems that hemagglutinin as a humoral factor was not involved.

In an investigation of the influence of oxygen-free water, snail excretion products, and immobilization conditions on leucocytosis only oxygen-free water led to such a reaction.

The granulocyte response upon trematode infection showed a decrease in the cell number two hours after infection, which in the case of a first

infection returned to normal after 42 days. In the case of a second infection with a non-compatible parasite this recovery was evident after only 14 days showing the possible existence of a memory mechanism.

Two techniques, namely ^{51}Cr -radiolabelling and histological processing were performed in order to confirm the penetration of trematode larval stages into the snail. Although it was established that ^{51}Cr could not be used in the radio-labelling of the parasites, the parasites were observed in the snail's headfoot tissue by means of histological processing.

INHOUDSOPGAWE

1. INLEIDING	1
2. MATERIAAL EN METODES	8
2.1. Herkoms en versorging van die varswaterslakke	8
2.2. Herkoms en instandhouding van schistosoomparasiete	9
2.2.1. Besmetting en aanhouding van muise	10
2.2.2. Besmetting van gasheerslakke	11
2.3. Die isolering van schistosoomeiers en versameling van mirasidioms	11
2.4. Stimulering van mirasidioms tot sporosistvorming	12
2.5. Versameling van hemolimfmonsters	14
2.6. Voorbereiding van hemosiet-enkellae	15
2.7. Bepaling van hemosietgetalle	16
2.8. Bereiding van serum	16
2.9. Bereiding van albumienklierekstrak	16
2.10. Bereiding van hemagglutinienvrye serum en hemagglutinienvrye albumienklierekstrak	17
2.11. Voorbereiding van materiaal vir ligmikroskopie	17
2.11.1. Slakweefselsnitte	17
2.11.2. Hemosiete	19
2.12. Voorbereiding van hemosiete vir fluoressensiamikroskopie	19
2.13. Voorbereiding van materiaal vir skanderelektronmikroskopie	20
2.13.1. Mirasidioms en sporosiste	20
2.13.2. Hemosiete	21
2.14. Voorbereiding van materiaal vir transmissie-elektronmikroskopie	21
3. 'N STUDIE VAN <u>B. AFRICANUS</u> -HEMOSIETE	23
3.1. Uitwendige morfologie	23
3.2. <u>In vitro</u> gedrag van hemosiete	25
3.3. Die verband tussen selgrootte en slakmassa	33
3.4. Verband tussen selgetal en slakmassa	35

3.5. Die gebruik van lektiene om moontlike granulosisubpopulasies te identifiseer.	37
4. FAGOSITOSE EN ENKAPSULASIE	41
5. PENETRASIESTUDIES VAN 'N VERENIGBARE EN ONVER- ENIGBARE PARASIT IN DIE GASHEERSLAK <u>B. AFRICANUS</u> . . .	48
5.1. Evaluering van Chroom-51 as radioaktiewe merker	48
5.2. Histologiese studies	64
6. SELLULÊRE RESPONS VAN <u>B. AFRICANUS</u>	68
6.1. Die invloed van geselekteerde abiotiese faktore op die sellulêre respons	68
6.2. Die invloed van schistosoominfeksie op die granulosisrespons	71
7. GEVOLGTREKKINGS	78
8. BEDANKINGS	80
9. LITERATUURLYS	82

1. INLEIDING

Dit is 'n algemene verskynsel dat die wisselwerking tussen gasheer en parasiete, na penetrasie van die parasiet in die gasheer, dikwels tot skadelike effekte by die gasheer lei. Dit is dus in die gasheer se belang dat indringing van die parasiet verhoed moet word. Die eerste verdedigingsmeganisme van 'n organisme is om met behulp van fisiese versperrings, byvoorbeeld 'n integument of mukussekrete, penetrasie van vreemde organismes te verhoed. Wanneer organismes egter daarin slaag om deur die versperrings van die eksterne verdedigingsmeganisme te dring, kom hulle met die interne verdedigingsmeganisme in aanraking. Hierdie meganisme wat by vertebrate as die immuunstelsel bekend staan, bestaan uit 'n sellulêre komponent (selle) en 'n humorale komponent (proteïene). Wanneer vreemde organismes die liggaam binnedring, word hulle selektief deur hierdie komponente aangeval en vernietig.

Dit is voor die hand liggend dat die verdedigingsmeganismes van soogdiere tot dusver prioriteit in studies van hierdie aard sou geniet het, aangesien dit tot voordeel van menslike gesondheid kan strek.

'n Studie van die verdedigingsmeganisme van invertebrate hou egter ook voordele in wat soos volg saamgevat kan word:

1. Kennis van die relatief eenvoudige funksionering van die inwendige verdedigingsmeganisme van invertebrate kan tot 'n beter begrip van die basiese werking van die meer komplekse immuunstelsel van die vertebrate lei.
2. Invertebrate is van ekonomiese belang deurdat dit 'n invloed op beide die landbou en die industrie mag hê. Deur die verdedigingsmeganisme van hierdie diere te verstaan, kan die kennis aangewend word om die organismes na goëddunke te bestry of te beskerm.

3. Net so 'n belangrike motivering vir 'n studie van hierdie aard is die feit dat die gesondheid van miljoene mense jaarliks benadeel word omdat die verdedigingsmeganisme van sekere invertebraat-tussengashere nie daarin slaag om die medies-belangrike parasiete wat hulle binnedring, te vernietig nie. Die invertebrate dien dus as 'n belangrike skakel in die transmissie van die parasiet na die mens.

Dit is veral laasgenoemde verskynsel wat as motivering dien vir 'n studie van die immuunmeganisme van varswaterslakspesies wat as tussengashere vir verskeie parasiete optree. In teenstelling met die teenwoordigheid van duidelik gedefinieerde sellulêre en humorale interne verdedigingskomponente by vertebrate is slegs 'n sellulêre komponent, hoofsaaklik in die hemolimf, by varswaterslakke onomwonde bewys. Die volgende komponente van hierdie sellulêre immuunstelsel van varswaterslakke het al aandag geniet.

Die morfologie van die sirkulerende selle in die hemolimf van varswaterslakke is reeds deur Jeong & Heyneman (1976), Cheng & Auld (1977), en Yoshino & Granath (1985) by *Biomphalaria glabrata*, deur Sminia & van der Knaap (1981), van der Knaap, Boots, van Asselt & Sminia (1983), Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1984), Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1985) en Dikkeboom, van der Knaap, Maaskant & de Jonge (1985) by *Lymnaea stagnalis* en deur Krupa, Lewis & Del Vecchio (1977) by *Bulinus guernei* bestudeer. Uit hierdie studies is dit duidelik dat daar hoofsaaklik twee denkrigtings ten opsigte van die benaming van die sirkulerende hemosiete by varswaterslakke bestaan. Volgens die outeurs wat op *B. glabrata* en *B. guernei* navorsing gedoen het, word hierdie selle in granulosiete en hialinosiete verdeel, terwyl die outeurs by *L. stagnalis* slegs een tipe sirkulerende sel naamlik amoebosiete aantoon.

Krupa et al. (1977), Yoshino (1981) en Yoshino & Granath (1985) het ook die gedrag van die selle wanneer dit met vreemde stowwe in aanraking kom bestudeer.

Sover bekend is die meerderheid van morfologiese en selgedragstudies egter met behulp van ligmikroskopie uitgevoer. Dit het tot die bestaande kontroversie aangaande die beskrywing van die seloppervlak en die vorming van sitoplasmiese uitlopers by selle wanneer dit met vreemde stowwe in aanraking kom, aanleiding gegee.

Wat die verband tussen selgrootte en slakgrootte betref, bestaan daar ook verskille. Dikkeboom et al. (1984) het gevind dat daar by *L. stagnalis* 'n toename in selgrootte met 'n toename in slakgrootte en slakouderdom bestaan. Cheng & Auld (1977) en Krupa et al. (1977) het egter onderskeidelik by *B. glabrata* en *B. guernei* hemosiete van twee groottes gevind en kon geen verband tussen selgrootte en slakgrootte aantoon nie.

Volgens Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1985) is die sellulêre immuunstelsel, bestaande uit sirkulerende hemosiete, van klein sowel as jong *L. stagnalis*-slakke kwantitatief en kwalitatief swakker ontwikkel as by volwasse slakke. Stumpf & Gilbertson (1978) het in soortgelyke studies by *B. glabrata* waargeneem dat hemosietgetalle per μ l hemolimf toeneem met 'n toename in slakgrootte.

Renwrantz & Cheng (1977), Schoenberg & Cheng (1980) en Yoshino (1981) het deur van die lektienaffiniteite van die suikerreseptore op hemosietoppervlakke gebruik te maak, die sirkulerende hemosietpopulasies van varswaterslakke in subpopulasies verdeel. Hierdie subpopulasies toon moontlik ook 'n mate van funksionele differensiasie. Dikkeboom, van der Knaap, Maaskant & de Jonge (1985) het deur monoklonale antiliggamme aan die oppervlakdeterminante van die hemosiete te koppel, vier selsubpopulasies by volwasse en twee subpopulasies by onvolwasse *L. stagnalis*-slakke aangetoon. Weens die feit dat hierdie tegnieke, sover bekend, op hierdie terrein beperk toegepas is, bestaan daar nog talle probleme met betrekking tot die vertolking van resultate wat gevind is.

Studies wat tot dusver uitgevoer is om die funksionele aspekte van die sellulêre verdedigingsmeganisme op te klaar, het aangetoon dat hierdie

selle hoofsaaklik by wyse van fagositose (aktiewe verswelging van 'n deeltjie deur 'n enkele sel) en enkapsulasie (die omringing van 'n vreemde stof deur 'n multisellulêre skede van hemosiete) funksioneer. Jeong & Heyneman (1976) het in ondersoeke van granulosiete en hialinosiete van *B. glabrata* gevind dat slegs die granulosiete in vitro fagosities aktief is. Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1985) daarenteen het gevind dat daar slegs een hemosietgroep by *L. stagnalis* teenwoordig is en dat die volwasse hemosiete in die groep by fagositose betrokke is.

Anderson & Good (1976) en Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1985) het onderskeidelik by *Otala lactea* en *L. stagnalis* 'n hemagglutinin in die hemolimf wat opsonies aktief is en vreemde stowwe meer herkenbaar maak, aangetoon.

Wat enkapsulasie betref, het ligmikroskopiese ondersoeke filamentagtige selle by molluske wat helmintlarwes enkapsuleer, aangetoon (Krupa et al., 1977). Na aanleiding van in vivo elektronmikroskoopstudies het Krupa et al. (1977) en Loker, Bayne, Buckley & Kruse (1982) ook twee sirkulerende hemosietipes by onderskeidelik *B. geurnei* en *B. glabrata* waarvan slegs een tipe by enkapsulasie van die schistosoomparasiete betrokke was aangetoon. Bayne, Buckley & DeWan (1980) het 'n in vitro model vir enkapsulasie gebruik en gevind dat onverenigbare *B. glabrata*-hemosiete die oppervlaktegument van *S. mansoni*-sporosiste vernietig, terwyl dit nie die geval by die verenigbare slak-parasietkombinasie was nie. Serum alleen het ook geen invloed op die sporosiste gehad nie.

Groot variasie bestaan ook ten opsigte van leukositose soos gevind, by die sellulêre immuunstelsel na indringing van vreemde materiaal. Michelson (1975) en Stumpf & Gilbertson (1980) het 'n tweevoudige toename in hemosietgetalle getoon nadat *B. glabrata*-slakke met *S. mansoni*-mirasidiums geïnfekteer is. Volgens van der Knaap, Tensen, Kroese & Boerrigter-Barendsen (1982) en van der Knaap et al. (1983) was daar egter 'n afname in *L. stagnalis* sirkulerende hemosiete na infeksie met 'n verskeidenheid van bakterieë en gisselle. Feng (1965),

Sminia (1972), Stumpf & Gilbertson (1978) en Wolmarans & Yssel (1988a) het egter onderskeidelik gevind dat hartkloptempo, meganiese stimulasie, temperatuur en suurstofkonsentrasie faktore is wat ook tot leukositose aanleiding kan gee.

Die bestaan en funksionering van 'n immunologiese geheue by die vertebratimmuunstelsel is van kardinale belang en die sukses van hierdie immuunstelsel is grootliks van die funksionering van hierdie geheue afhanklik. Die bestaan van 'n sodanige immunologiese geheue by varswaterslakke is nog nie onomwonde bewys nie. Die moontlikheid van 'n sodanige stelsel is deur Lie & Heyneman (1976) by *B. glabrata*, Bayne (1983) by *Helix*-spesies en deur van der Knaap, Boots, van Asselt & Sminia (1983) by *L. stagnalis* aangetoon.

Wanneer ondersoeke op die in vivo reaksie van die sellulêre immuunstelsel van slakke na penetrasie van parasiete uitgevoer word, is dit essensieël dat penetrasie wel positief bevestig kan word. Die feit dat daar tans geen tegnieke beskikbaar is om penetrasie direk na blootstelling by lewende slakke te bevestig nie, het tot die kontroversie aangaande die sellulêre reaksie bygedra.

In die huidige studie is geselekteerde aspekte van die sellulêre komponent van die verdedigingsmeganisme van die varswaterslak *Bulinus africanus* (Krauss, 1848) ondersoek. Hierdie slak is hoofsaaklik verantwoordelik vir die instandhouding en verspreiding van die trematoodparasiet *Schistosoma haematobium* in Suid-Afrika. Hierdie parasiet is verantwoordelik vir die siekte urinêre schistosomiase (urinêre bilharziase) wat die gesondheid van beide mens en dier nadelig beïnvloed en neem veral in tropiese gebiede epidemiese afmetings aan.

Aangesien hierdie slak tot Afrika beperk is en sover bekend geen inligting aangaande die verdedigingskomponent daarvan bekend is nie, is navorsing op hierdie terrein relevant. Die belangrikheid van hierdie ondersoek word verder beklemtoon deur die bestaande kontroversie betreffende die sellulêre komponent van varswaterslakke. Daar is aan die

volgende aspekte van die sellulêre immuunstelsel van *B. africanus* aandag geskenk:

1. Elektronmikroskopiese ondersoeke is uitgevoer om:
 - a. die uitwendige morfologie van hemosiete te ondersoek
 - b. die in vitro gedrag van die selle op glas in die teenwoordigheid van serum te bestudeer en die rol van serum in die gedrag van die selle op te klaar en
 - c. die verband tussen selgrootte en slakgrootte na te gaan.
2. Ligmikroskopiese studies is gedoen om die verband tussen selgetal en slakmassa te bepaal.
3. Fluoresensiemikroskopie is aangewend om die moontlikheid van selsubpopulasies by hierdie slak te ondersoek.
4. In ondersoeke om die funksionele aspekte van die sellulêre immuunstelsel van hierdie slak op te klaar, is aandag geskenk aan:
 - a. die rol van beide die granulosiete en hialinosiete
 - b. die betrokkenheid van hemagglutinien as humorale faktor en
 - c. die reaksie van hemosiete op beide verenigbare en onverenigbare parasietkombinasies.
5. Tegnieke om parasietpenetrasie te bevestig met die oog op gebruik in sellulêre responsstudies is geëvalueer.
6. Sellulêre respons ondersoeke is uitgevoer en:
 - a. die rol van abiotiese faktore,

- b. die invloed van 'n eerste en 'n herinfeksie op hemosietgetalle en
- c. die bestaan van 'n immunologiese geheue is nagegaan.

2. MATERIAAL EN METODES

2.1. HERKOMS EN VERSORGING VAN DIE VARSWATERSLAKKE

Eksemplare van *B. africanus*-slakke wat in al die eksperimente gebruik is, is in die Sterkstroomspruit, 'n sytak van die Schoonspruit, op die plaas Sterkstroom 216 in die distrik Ventersdorp (ruitverwysing 2626 BC) versamel. Versameling van die slakke het vanaf Oktober tot April in die 1986-87 en 1987-88 jaarperiodes plaasgevind. Die slakke is direk na versameling oorgeplaas in termiesgeïsoleerde fesse gevul met habitatwater en na die laboratorium vervoer waar hulle in akwariums soos beskryf deur de Kock & van Eeden (1986) aangehou is.

Voordat die slakke in akwariums vir eksperimentele gebruik gevestig is, is hulle vir schistosoomparasiete ondersoek. Dit is gedoen deur die slakke oor 'n periode van 40 dae twee maal per week vir drie ure per dag afsonderlik in 10 ml gefiltreerde akwariumwater (in 25 ml proefbuise) in direkte sonlig te laat. Die water is daarna vir serkariëe ondersoek. Slakke wat na hierdie periode nie serkariëe afgeskei het nie, is as onbesmet beskou en vir eksperimente gebruik.

Verouderde boorgatwater afkomstig vanuit 'n dammetjie in die botaniese tuin van die PU vir CHO is as akwariumwater gebruik. Hierdie water is voordat die akwariumstelsel weekliks daarmee aangevul is, deur 'n sif met 'n maasgrootte van 45 μm gefiltreer. Dit het daartoe bygedra dat die organiese partikels in die water grootliks geëlimineer is. Die geleidingsvermoë van die water is tussen 350 en 450 μS gereguleer deur periodiek gedistilleerde water by te voeg. Volgens de Kock & van Eeden (1981) val hierdie geleiding binne die grense van verdraagsaamheid vir *B. africanus*.

Die watertemperatuur van die akwariums is konstant op 25 \pm 1°C gehou wat volgens de Kock (1973) optimaal vir groei en eierproduksie van *B.*

africanus-slakke is. Die slakke is te alle tye aan 'n normale dag-nagbeligtingsiklus onderwerp. Deur die water in hierdie akwariums voortdurend met perslug te belug, is 70-90% suurstofversadiging in die water verkry. Belugting van die water dra volgens Frank (1963) daartoe by dat skadelike metaboliete geoksideer kan word.

Die slakke is in die akwariums in bakke aangehou. Elke bak het bestaan uit 'n Perspex-ring met 'n deursnee van 16 cm en 'n diepte van 10 cm. Die bodem van hierdie ring was bedek met perlonaas met 'n maasgrootte van 375 μm en 'n deurlaatoppervlak van 43%. Die bakke is met behulp van aluminiumstafies in die akwariums gesuspendeer.

Tydens eksperimente waar slakke afsonderlik aangehou moes word, is elke slak in 'n genommerde bakkie bestaande uit 'n Perspex-ring met 'n deursnee van 45 mm en 'n diepte van 39 mm, geplaas. Die bodem van die bakkie was met perlonaas, soos hierbo beskryf, bedek. Hierdie bakkies is ook met behulp van aluminiumstafies in die akwariums gesuspendeer. Elke bakkie is afsonderlik met 'n dekseltjie bedek om te voorkom dat die slakke die bakkies verlaat.

Die slakbakke is daaglik gereinig waarna vars Tetramin stapelvoedsel (Tetra Werke, Wes Duitsland) aan die slakke voorsien is.

2.2. HERKOMS EN INSTANDHOUDING VAN SCHISTOSOOMPARASIE TE

Twee parasietespesies naamlik *Schistosoma haematobium* Bitharz, 1852 en *S. mansoni* Sambon, 1907 wat onderskeidelik in *Saccostomus campestris* en *Mastomys coucha* as gashere aangehou is, is in hierdie studie gebruik. Hierdie muisspesies is gekies aangesien hulle goed met die onderskeie parasiete verenigbaar is. Beide parasietespesies is oorspronklik in die genoemde muisspesies van die Nasionale Instituut vir Siektes in 'n Tropiese Omgewing te Nelspruit verkry,

Die parasiete in hierdie muis is vir beide die plaaslike vestiging van elke parasietespesie en vir eksperimentele doeleindes gebruik.

2.2.1. BESMETTING EN AANHOUDING VAN MUISE

Die parasietespesies is plaaslik gevestig deur muis wat ongeveer ses weke oud was, te infekteer. Beide *S. campestris* en *M. coucha*-muis is onderskeidelik aan 50±2 *S. haematobium* en *S. mansoni*-serkariëë by kamertemperatuur blootgestel. Hierdie serkariëë is verkry vanaf *B. africanus* en *Biomphalaria pfeifferi*-slakke wat onderskeidelik met *S. haematobium* en *S. mansoni* besmet was.

Eksemplare van die twee slakspesies is afsonderlik in 100 ml Millipore gefiltreerde akwariumwater in direkte sonlig geplaas. Die serkariëë wat vervolgens deur die slakke afgeskei is, is oorgeplaas in aparte petribakkies. 'n Disseksiemikroskoop en 'n nematoodsuigapparaat (Jordaan, 1984) is gebruik om 50 serkariëë van elke spesie te isoleer en afsonderlik na 150 ml glasbekers met 80 ml akwariumwater, oor te plaas. Die muis is hierna afsonderlik vir twee ure aan die serkariëë van die onderskeie parasietespesies in die aparte glasbekers blootgestel. 'n Rooster is oor die opening van elke glasbeker geplaas om te sorg dat die muis nie ontsnap nie, maar tog vrylik kon asemhaal.

Hierna is die muis in 'n batterystelsel van muisbakke by 'n konstante temperatuur van 20±2°C aangehou. Die bodem van hierdie bakke was met saagsels bedek wat grootliks verhoed het dat die muis met gepas-seerde urine en feses in aanraking kon kom. Die muisbakke is al om die ander dag met skoon bakke vervang waartydens die muis ook van vars kraanwater en voedsel (Epol muispille) voorsien is.

2.2.2. BESMETTING VAN GASHEERSLAKKE

Schistosoom-vrye veldeksemplare van *B. africanus* en laboratoriumge-teelde eksemplare van *B. pfeifferi* is onderskeidelik met *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidioms geïnfekteer. Elke slak is afsonderlik aan vyf mirasidioms in 1 ml akwariwmwater in 'n multiselhouer by kamer-temperatuur vir 'n periode van twee ure blootgestel. Hierna is die slakke uit die water verwyder en versorg. Die blootstellingswater is deursoek vir enige vryswemmende mirasidioms om seker te maak dat indringing wel plaasgevind het. Beide parasiete het ongeveer 37 dae geneem om in die gasheerslak na serkarië te transformeer wat dan deur die slakke afgeskei is en gebruik is om muis te besmet.

2.3. DIE ISOLERING VAN SCHISTOSOOMEIERE EN VERSAMELING VAN MIRASIDIOMS

Eiere is uit die lewer van gedissekteerde muis, 3-12 maande na bloot-stelling, geïsoleer. Die muis is met 60 mg natriumpentobarbitoon (Sagatal) (per gram muis) wat intraperitoneaal ingespuut is, gedood. Die lewers is hierna uit die muis verwyder en in 100 ml 1,7% natriumchloriedoplossing vir vyf minute, met 'n Osterizer-elektriese versapper teen hoogste spoed, gehomogeniseer. Hierdie soutkonsen-trasie het verhoed dat die eiere tydens homogenisering uitbroei en die mirasidioms beskadig word. Oliver-González & Vásquez (1983) beweer dat eiere tot 60 dae in hierdie medium lewenskragtig bly. Die homogenaat is vervolgens met gefiltreerde akwariwmwater deur 'n helmintfilter (Visser & Pitchford, 1972) gespoel. Hierdie filter het daartoe bygedra dat die eiere grootliks van die gehomogeniseerde lewerweefsel geskei kon word waarna die eiere met behulp van 'n kraan aan die onderkant van die filter in 'n 250 ml glasbeker afgetap is.

Die eiers is hierna in akwariumwater by 'n temperatuur van 25±2°C en kunsmatige koue beligting gelaat om uit te broei. Hierdie beligtingswyse is verkies omdat ultravioletlig 'n verkorte lewensverwagting by die mirasidiums tot gevolg het (Prah & James, 1977). Hierdie outeurs het ook bevind dat uitbroeitemperature bo 45°C en onder 10°C essensiële lewensfunksies nadelig beïnvloed, terwyl by uitbroeitemperature van 18-30°C 70-100% infeksie met 'n verenigbare gasheer-parasietkombinasie moontlik was.

Sterkswemmende mirasidiums is versamel deur die lig van 'n koue ligbron op 'n bepaalde punt op die oppervlak van die water waarin die mirasidiums rondgeswem het, te konsentreer. Omdat mirasidiums positief fototaksies is, het hulle na hierdie punt beweeg en is met behulp van 'n 1 ml insulien spuit, voorsien van 'n spuitnaald, versamel. Mirasidiums is in alle gevalle binne drie ure nadat dit uitgebroei het in eksperimente gebruik. Hierdie periode is gekies na aanleiding van bevindinge van Prah & James (1977) dat beide *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums by temperature van 5-30°C vir minstens drie ure na uitbroeiing hoogs aktief gebly het.

2.4. STIMULERING VAN MIRASIDIUMS TOT SPOROSISTVORMING

Mirasidiums is drie maal met steriele medium F (tabel 1) gespoel deur hulle met 'n nematoodsuier te versamel en in skoon medium F te plaas. Die proses is in 'n positiewe drukkabinet by kamertemperatuur uitgevoer. Hierna is die mirasidiums vir 'n periode van 48 ure by 25°C gelaat om na sporosiste te transformeer.

Tabel 1. Samestelling van medium F vir in vitro sporosistvorming (Basch & DiConza, 1974).

BME* vitamieene 100x(gekon.) (Gibco no 104, Sigma)	1,0 ml
BME* aminosure 50x(gekon.) (Gibco no 105, Sigma)	2,0 ml
Aminosure en organiese sure (tabel 2)	1,0 ml
L-Glutamien 200 mM (Gibco no 503)	1,0 ml
Soute en suikers (tabel 3)	95,0 ml
Hepes 2 M	1,25 ml
Fetale kalfserum	10 g
Gentamisien	10 mg

*BME (Basal Medium Eagle)

Tabel 2. Samestelling van aminosure en organiese sure vir medium F.

	mg/l
Serien	60,0
Prolien	29,0
L-Alanien	24,0
Aspartiensuur	28,0
Glutamiensuur	47,0
Glisien	24,0
α -Alanien	24,0
Appelsuur	400,0
α -Ketoglutamiensuur	300,0
Suksiensuur	100,0
Fumaarsuur	50,0
Sitroensuur	100,0

Tabel 3. Samestelling van soute en suikers vir medium F.

	mg/l
NaCl	1500,0
Na ₂ HPO ₄	70,0
KCl	150,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	450,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	530,0
Galaktose	4500,0
Glukose	1000,0

2.5. VERSAMELING VAN HEMOLIMFMONSTERS

Hemolimfmonsters is verkry deur van die Bekius-effek (Lever & Bekius, 1965) gebruik te maak. Hierdie metode van hemolimfversameling is ook toegepas deur Coertze & Van Aardt (1978), Van Aardt & Frey (1981), Wolmarans (1984) en Wolmarans & Yssel (1988a) wat hemolimf onderskeidelik by *B.(B.) tropicus*, *B.(P.) globosus*, *B.(B.) tropicus* en *B. glabrata* versamel het.

Die slak is vooraf met die ventraalvoetoppervlak na onder, deeglik op handdoekpapier gedroog. Dit is gedoen om die water en mukus wat op die slakvoet teenwoordig was, te verwyder. Hierdie werkwyse het verseker dat die hemolimf onverdund versamel is, terwyl die opsuig daarvan deur die opsuigkapillêr ook vergemaklik is. Die slak is hierna met die skulpopening na bo in posisie gehou waarna 'n 20 µl glaskapillêr, gekoppel aan 'n rubber suigbuis, gebruik is om die ventraalvoetoppervlak en mantelrand van die slak meganies te prik. Hierdie aanraking het tot gevolg gehad dat die slak vinnig in die skulp teruggetrek het wat tot die vrystelling van hemolimf deur die hemaalporie (Lever & Bekius, 1965) aanleiding gegee het. Die hemolimf versamel vervolgens op die teruggetrekte ventraalvoetoppervlak waar dit met

behulp van die glaskapillêr opgesuig word. Die hemolimf is in al die eksperimente met 'n gelyke volume fosfaatgebufferde salienoplossing (PBS) (tabel 4) met 'n pH van 7,2 en 'n osmolariteit van 119 mOsm (Cheng & Auld, 1977) verdun. Dit is gedoen om te verseker dat die selle in die hemolimf nie deur veranderende pH en osmotiese konsentrasie beïnvloed word nie.

Tabel 4. Samestelling van fosfaatgebufferde salienoplossing (PBS).

Na_2HPO_4	8,35 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,65 mM
NaCl	45 mM

2.6. VOORBEREIDING VAN HEMOSIET-ENKELLAE

Die voorbereiding van hemosiet-enkellae is op glasoppervlakke, soos geselekteer vir spesifieke eksperimente, uitgevoer. Hierdie oppervlakke is vooraf gereinig met absolute etanol, herhaaldelik gespoel met gedistilleerde water en met handdoekpapier gedroog.

Hemolimf wat gebruik is vir die bereiding van hemosiet-enkellae is soos reeds beskryf, versamel en met 'n gelyke volume PBS verdun. Twintig mikroliter van hierdie hemolimfoplossing is vervolgens op die gereinigde glasoppervlakke geplaas en in 'n dampkamer (Stumpf & Gilbertson, 1980) by $25 \pm 2^\circ\text{C}$ vir wisselende periodes, ook geselekteer vir spesifieke eksperimente, geïnkubeer. Die dampkamers het bestaan uit 'n petribakkie met 'n deursnee van 8,5 cm waarvan die bodem met 'n nat filtreerpapier (Whatman nr 1) bedek was. Gedurende die inkubasiëperiode versamel en adsorbeer die leukosiete in die hemolimf op die glasoppervlak. Die selvrye hemolimf is na hierdie periode verwyder deur die glasoppervlak met 'n hoek van 45° ten opsigte van die horisontale vlak te hou en PBS met behulp van 'n 1 ml pipet oor die selle te spuit.

2.7. BEPALING VAN HEMOSIETGETALLE

Hemolmf is versamel en met 'n gelyke volume 0,05 kristalviolet in PBS (pH 7,2 ; 119 mOsm) verdun. Tien mikroliter van hierdie verdunning is op 'n Improved Neubauer-hemosietometer (Hawksley Cristalite) geplaas en met 'n dekglasie bedek waarna die selle onder 'n Zeiss-ligmikroskoop (model 473405) by 100x olie-emersie getel is. Die selgetalle is uitgedruk as die aantal selle per mikroliter hemolmf.

2.8. BEREIDING VAN SERUM

Hemolmf is versamel en by 'n gelyke volume PBS in 'n kuvetjie geplaas. Hierna is die hemolmf by kamertemperatuur vir 30 minute by 75 g gesentrifugeer om die selle te presipiteer. Die supernatant (serum) is direk na die 30 minute verwyder en in ondersoeke gebruik.

2.9. BEREIDING VAN ALBUMIENKLIEREKSTRAK

Albumienkliere van 10 slakke is deur middel van 'n disseksie verwyder en in 100 µl PBS met behulp van 'n Virtis model 45 homogeniseerder gehomogeniseer. Die homogenaat is hierna by kamertemperatuur vir 30 minute by 75 g gesentrifugeer waarna die supernatant (albumienkliererektrak) versamel en gebruik is.

2.10. BEREIDING VAN HEMAGGLUTINIENVRYE SERUM EN HEMAGGLUTINIENVRYE ALBUMIENKLIEREKSTRAK

Een milliliter serum of albumienklierekstrak is by 2 ml gepakte Sephadex G 100 gevoeg en vir 45 minute by 4°C gemeng. Die konsentrasie was sodanig dat al die hemagglutiniene aan die Sephadex kon adsorbeer. Na hierdie periode is die oplossing vir 15 minute by 75 g gesentrifugeer. Die hemagglutinienvrye dryfvloeistof is verwyder en in verdere studies gebruik.

2.11. VOORBEREIDING VAN MATERIAAL VIR LIGMIKROSKOPIE

2.11.1. SLAKWEEFSELSNITTE

Slakke met 'n skulplengte van ≥ 7 mm is met 1% waterige Nembutal genarkotiseer. 'n Slak is as genarkotiseer beskou as dit nie meer op meganiese aanraking gereageer het nie.

Die skulp van die slak is vervolgens gekraak deur dit tussen twee voorwerpglasies te plaas en liggies druk op die boonste glasie uit te oefen. Hierdie slak is in 'n petribakkie gevul met PBS geplaas en die gekraakte skulpfragmente is met behulp van pinsette verwyder. Die slaksagtemateriaal is hierna vir 24 ure in 'n uitgestrekte posisie met Bouin se oplossing (tabel 5) gefikseer. Na hierdie fikseringsperiode is die slakke telkens vir een uur in 70, 95 en twee maal in 100% etanol gedehidreer. Die materiaal is vervolgens vir 30 minute in 'n 1:1 oplossing van etanol:chloroform en daarna twee maal vir dieselfde periode in chloroform geplaas. Hierna is die slakmateriaal vir 20 minute in paraffienwas by 'n temperatuur van 60°C gelaat, oorgeplaas in vars paraffienwas by dieselfde temperatuur waarna die chloroform, deur ge-

leidelik negatiewe druk (84-50 kPa) toe te pas, uit die weefsel onttrek is. Hierdie temperatuurstoestande het verseker dat daar goeie vermening van paraffienwas en chloroform plaasgevind het, aangesien hierdie twee stowwe by 56°C meng, terwyl die toegepaste negatiewe druk volledige verplasing van chloroform met paraffienwas in die weefsel tot gevolg gehad het (Lillie, 1965).

Tabel 5. Samestelling van Bouin se fikseermiddel (Lillie, 1965).

Pikriensuur (1,2% versadig)	75 ml
Formalien (40% formaldehyd)	25 ml
Ysasynsuur	5 ml

Die wasgeïmpregneerde weefsel is in 'n gietvorm, gevul met gesmelte, vars paraffienwas, gemonteer. Die inhoud van die gietvorms is vervolgens oornag gelaat om te stol.

Weefselsnitte met 'n dikte van 8 μ m is met behulp van 'n American Optical model no-820 Spencer-draaimikrotoom gemaak. Hierdie snitte is op water met 'n temperatuur van 35-37°C uitgestryk, met Haupt behandelde voorwerpglasies uit die water gehaal en vir een uur by 60°C gedroog.

Die voorwerpglasies met weefselsnitte is vervolgens vir 8 minute in xilol geplaas om die was te verwyder waarna dit opeenvolgend, telkens vir een minuut, in 100 (twee maal), 95, 90 en 70% etanol en twee maal in gedistilleerde water gehidreer is. Die snitte is hierna gekleur deur dit vir twee minute in hematoksilien te plaas, twee maal in kraanwater te was, vir ses minute in kraanwater te laat om te verblou en oornag in 'n oplossing van Eosien-Y Azur-2 (tabel 6) gekleur.

Tabel 6. Samestelling van Eosien-Y Azur-2 kleurstof (Lillie, 1965).

Eosien-Y (1:1000 oplossing)	5 ml
Azur-2 (1:1000 oplossing)	5 ml

Die snitte is hierna in 100% watervrye aseton (twee maal vir vier minute elk) gedehidreer en vir dieselfde periode in 'n 1:1 mengsel van xileen:asetoon gevolg deur 100% xileen, geplaas. Permanente montering van hierdie snitte is met Entellan-monteergom gedoen. Die snitte is hierna met 'n Zeiss-ligmikroskoop (model 473405) by 100x vergroting bestudeer.

2.11.2. HEMOSIETE

Na hemosiet-enkellaagbereiding is die selle vir vyf minute met 2% glutaaraldehyd in PBS gefikseer. Die fikseermiddel is hierna verwyder deur drie maal met PBS te spoel waarna die selle met 0,05% kristalviolet in PBS gekleur, met 'n dekglasie bedek en bestudeer is.

2.12. VOORBEREIDING VAN HEMOSIETE VIR FLUORESENSIEMIKROSKOPIE

Hemosiet-enkellaag is vir 'n periode van vyf minute met 2% glutaaraldehyd gefikseer waarna die selle drie maal met PBS gewas is. Die aldehydgroepe op die hemosiete is hierna vir vyf minute met 100 mM lisien geblokkeer waarna die lisien verwyder is deur drie maal met PBS te was. Twintig µl van 'n lektiën is hierna by die hemosiet-enkellaag geplaas en vir 30 minute in die donker by die selle gelaat. Tydens die periode kon die lektiëne aan die suikers op die oppervlak van die selle, waarvoor dit 'n affiniteit het, koppel. Die lektiëne is hierna verwyder deur drie maal met PBS te was waarna die granulosiete met 'n Leitz Orthoplan (model MP 155) fluoressensiemikroskoop, toegerus met 'n 12/3 lig insidensie filter, bestudeer is. Die eksperimentele prosedure is by 25±2°C uitgevoer. Alhoewel die fluoresserende eienskappe van lektiëne by 4°C beter behoue bly, het Yoshino (1981) bewys dat koppeling tussen

die leukosietsuikerreseptore en die lektiene ongeveer tienvoudig beter by 'n temperatuur van 22°C as by 'n temperatuur van 4°C is.

2.13. VOORBEREIDING VAN MATERIAAL VIR SKANDEERELEKTRONMIKROSKOPIE

2.13.1. MIRASIDIUMS EN SPOROSISTE

Materiaal vir skanderelektronmikroskopie (SEM) voorberei, is oornag in Karnovski-fikseermiddel (tabel 7) gefikseer. Postfiksering is uitgevoer met 2% osmiumtetroksied en 2% uranielasetaat (Boyde & Boyde, 1980). Die monsters is hierna, soos bespreek vir ligmikroskopie, deur etanol (70-100%) gedehidreer en opeenvolgend vir 30 minute in 'n 1:1 mengsel van etanol:freon en 100% freon gelaat. Die monsters is hierna in 'n hoëdrukkamer geplaas wat gevul word met vloeibare koolstofdioksied (CO₂) waartydens die freon uitgewas word. Die temperatuur is verhoog tot 35°C (kritieke drogingspunt) waartydens die vloeistof in gas verander wat dan stadig uitgelaat word. Die monsters is met behulp van elektriesgeleidende gom op aluminiumknopies gemonteer en met 'n 60:40 mengsel van goud:palladium tot 'n dikte van 0,2-0,5 nm bedamp. Die studie is met 'n elektronmikroskoop (Cambridge model SEM 250) by 'n spanning van 10-20 kV uitgevoer.

Tabel 7. Samestelling van Karnovski-fikseermiddel (Bullock, 1984).

Formaldehyd 8%	25 ml
Glutaaraldehyd 25%	10 ml
PBS	100 ml
CaCl ₂	50 mg
Pikriensuur	1 ml

2.13.2. HEMOSIETE

Hemosiete is met Karnovski-fikseermiddel (tabel 7) vir 'n periode van een uur gefikseer. Hierna is dit in glasbakkies met 'n hoogte van 4 mm en 'n deursnee van 10 mm, waarin vooraf 10 μ l 0,1% poli-L-lisien hidrokloried (MW = 21,000) gelaat is om te droog, geplaas. Hierdie glasbakkie is vervolgens in 'n dampkamertjie geplaas en vir vyf minute by 50 g gesentrifugeer sodat die selle op die poli-L-lisien hidrokloried versamel het. Die dampkamertjie het in hierdie geval bestaan uit 'n poliëteleenhouertjie met 'n hoogte van 8 mm en 'n deursnee van 15 mm voorsien van 'n digsluitende dekseltjie. Die bodem van die houertjie was met 'n nat Whatman nr 1 filtreerpapier uitgevoer. Na sentrifugering is die selvrye hemolimf, soos reeds bespreek, verwyder. Die hemosiete is hierna op dieselfde manier as die mirasidiums en sporosiste voorberei. In die geval is die glasbakkies egter met elektriesgeleidende gom op aluminiumknopies gemonteer en vir skandeerelektronmikroskopie voorberei.

2.14. VOORBEREIDING VAN MATERIAAL VIR TRANSMISSIE-ELEKTRONMIKROSKOPIE

Materiaal vir hierdie ondersoek is oornag by kamertemperatuur in 2% glutaaraldehyd (in 0,1 M natrium-kakodilaatbuffer) by 'n pH van 7,4 (Garcia, Lozano & Agulleira, 1987) gefikseer. Hierna is dit twee maal vir tien minute elk in natrium-kakodilaatbuffer gewas, waarna dit vir een uur in 1% osmiumtetroksied (in gedistilleerde water) gepostfikseer en vir 30 minute met uranielasetaat gekleur is (Bullock, 1984). Die materiaal is hierna deur 'n 50-100% etanolreeks gedehidreer waarna dit in 'n 1:1 mengsel van aseton:Spurr en daarna twee maal in skoon Spurr (tabel 8) gelaat is om af te sak. Die monsters is hierna in skoon Spurr-hars in 'n gietblokkie by 'n temperatuur van 80°C vir 8-12 ure gelaat om te polimeriseer. 'n Reichert Ultracut ultramikrotroom met 'n

glaslem toegerus, is gebruik om weefselsnitte met 'n dikte van silwer tot goud (60-80 nm) te maak. Die snitte is op gedistilleerde water gesuspendeer, met behulp van xilol-dampe laat uitsprei en op 'n loodkopperroostertjie (G200TT) geplaas. Die snitte is hierna vir vyf minute by 70°C in 2% uranielasetaat gekleur waarna dit goed met gedistilleerde water gespoel en vir 1-2 minute met loodsitraat (0,5 g in 50 ml gedistilleerde water) by kamertemperatuur gekleur en met 'n Phillips (CM 10, PW 6020) transmissie-elektronmikroskoop (TEM) bestudeer is.

Tabel 8. Samestelling van Spurr-hars (Spurr, 1969).

Venielsiklohekseendioksied (ERL) 4206	10,0 g
Diglikedieleter van polipropileenglukol (DER) 736	4,0 g
Nonenielsuksienanhydried (NSA)	26,0 g
Dimetielaminoetanol (S-1)	0,4 g

3. 'N STUDIE VAN B. AFRICANUS-HEMOSIETE

Volgens Jeong & Heyneman (1976) en Cheng & Auld (1977) bestaan daar by varswaterslakke twee sirkulerende hemosietgroepe, naamlik granulosiete en hialinosiete. Tot dusver is die meeste morfologiese en selgedragstudies met behulp van ligmikroskopie uitgevoer wat tot kontroversie aangaande die uitwendige morfologie aanleiding gegee het. In die huidige studie is daar van SEM-studies gebruik gemaak om die oppervlak van selle te bestudeer. Daarbenewens is SEM gebruik om die moontlike bestaan van hemosietpopulasies op grond van uitwendige morfologie en ook die moontlike verband tussen selgrootte en slakmassa aan te toon. Ligmikroskopie is in hierdie studie gebruik om die moontlike verband tussen selgetal en slakmassa te bepaal, terwyl lektiene gebruik is om op molekulêre vlak die moontlike bestaan van granulosietsubpopulasies aan te toon.

3.1. UITWENDIGE MORFOLOGIE

Die doel van die ondersoek was om a) die uitwendige morfologie van B. africanus-hemosiete te bestudeer b) die hemosiete op grond van uitwendige morfologie te groepeer en c) die verband tussen slakmassa en hemosietgrootte te bepaal. In hierdie studie is van vier groepe van ses slakke elk gebruik gemaak. Die gemiddelde massa van die ses slakke in elke groep was onderskeidelik 0,05; 0,2; 0,5 en 0,9 g. Hemolimf van die ses slakke in elke groep is versamel, bymekaar gevoeg en onmiddellik daarna vir 'n periode van een uur gefikseer en vir SEM-studies voorberei.

Resultate en bespreking

In hierdie studie kon daar op grond van die uitwendige morfologie tussen twee sirkulerende hemosietgroepe naamlik granulose en hialinose onderskei word. Geen morfologiese verskille kon egter tussen beide die granulose en hialinose-selpopulasies van die vier verskillende slakgroepe wat ondersoek was, aangetoon word nie.

Die hialinose (H) kan as klein sferiese selletjies met 'n gladde oppervlak sonder enige protoplasmiese uitlopers beskryf word (fig. 1). Die feit dat geen protoplasmiese uitlopers by hierdie selle teenwoordig was nie, is in ooreenstemming met waarnemings wat in verskeie ander studies gemaak is. Cheng & Auld (1977) het direk na hemolimfversameling soortgelyke selle by *B. glabrata* waargeneem. Hierdie outeurs het hierdie selle as tipies sferies sonder protoplasmiese invaginasies beskryf. Krupa et al. (1977) wat die morfologie van die sirkulerende selle van *B. guernei* soos dit in vivo voorkom, bestudeer het, het ook ronde selle sonder protoplasmiese uitlopers waargeneem. Sminia & van der Knaap (1981) en Dikkeboom, van der Knaap, Maaskant & De Jonge (1985) wat die sirkulerende selle van *L. stagnalis* bestudeer het, het die selle wat hulle waargeneem het as soortgelyk aan dit wat deur Krupa et al. (1977) waargeneem is, beskryf.

Die granulose (G) bestaan uit groter sferiese selle met 'n onreëlmatige uitwendige oppervlak wat aan talle pseudopoodagtige uitlopers te wyte is (fig. 1). 'n Soortgelyke sel tipe is ook by 'n verskeidenheid van ander varswaterslakspesies aangetoon. Jeong & Heyneman (1976) het hierdie sel tipe, in 'n onuitgespreide toestand, by *B. glabrata* bestudeer. Hulle het die selle as sferies, met protoplasmiese invaginasies, beskryf, terwyl Jeong en Heyneman (1976) hierdie onreëlmatige oppervlak as membraanagtige voue beskou het. Krupa et al. (1977) het in studies met *B. guernei* 'n sel met 'n ameboïede voorkoms wat waarskynlik met bogenoemde selle ooreenstem, aangetoon. In ondersoeke op die sirkulerende amoebosiete van *L. stagnalis* het Sminia & van der Knaap (1981) en Dikkeboom, van der Knaap, Meuleman & Sminia (1985) waarskynlik ook na hierdie sel tipe verwys met wat hulle respektiewelik

as amoebosities aktief met protoplasmiese uitlopers en as goed gedifferensieerd en immunologies aktief, beskryf het.

Die bevinding dat daar slegs op grond van uitwendige morfologie tussen twee seltipes onderskei kan word, stem ooreen met bevindinge deur Harris (1975), Jeong & Heyneman (1976) en Cheng & Auld (1977) by *B. glabrata*, Krupa et al. (1977) by *B. guernei*, Yssel & Wolmarans (1988) by *B. africanus* en deur Sminia & van der Knaap (1981) en Dikkeboom, van der Knaap, Maaskant & de Jonge (1985) by *L. stagnalis*. In teenstelling met onder andere Harris (1975), Jeong & Heyneman (1976) en Yssel & Wolmarans (1988) wat hierdie twee seltipes as granulosiëte en hialinosiëte benaam, verwys Sminia en van der Knaap (1981) daarna as amoebosiete. Laasgemoende outeurs is van mening dat die kleiner seltipe onvolwasse selle is wat met volwassewording wel die eienskappe en morfologie van volwasse selle sal verkry. In die huidige studie kon daar egter geen morfologiese tussenvorme tussen die genoemde twee morfologiese seltipes gevind word nie.

3.2. IN VITRO GEDRAG VAN HEMOSIETE

Die doel van hierdie studie was om die in vitro gedrag van *B. africanus*-hemosiëte en die invloed van serum op hierdie gedrag te bepaal.

Die in vitro gedrag van die hemosiëte is nagegaan deur hemolimf van slakke van wisselende groottes te versamel, en dit met 'n gelyke volume PBS te verdun. Deelvolumes van hierdie hemolimf is in poli-L-lisien behandelde glasbakkies geplaas, in dampkamertjies vir tydsintervalle van 0, 15, 30, 60 en 90 sekondes en 2, 4 en 10 minute geïnkubeer, gefikseer en vir SEM-studies voorberei.

Die invloed van serum op die in vitro gedrag van die hemosiëte is nagegaan deur hemolimf te versamel, met PBS te verdun en deelvolumes

daarvan in vier poli-L-lisien behandelde glasbakkies vir 10 minute in dampkamertjies te laat om uit te spreid. Die selle in een van die bakkies is hierna gefikseer. Die serum in die oorblywende bakkies is met behulp van handoekpapier gedreineer waarna die selle drie maal versigtig met PBS gespoel is. Die hemosiete teenwoordig in die tweede bakkie is vervolgens gefikseer terwyl die selle in die oorblywende twee bakkies vir vyf minute onderskeidelik met PBS en selvrye serum bedek is. Die selle in hierdie bakkies is na die genoemde tyd ook gefikseer. Al die gefikseerde selle is hierna vir SEM-studies voorberei.

Resultate en bespreking

Die in vitro uitspreiding van hemosiete word in figure 2-9 uiteengesit. Dit is duidelik dat die granulosiete wat vanaf nul tot vier minute op die glasplaatjie gelaat is, aansienlik van vorm verander het (fig. 2-8). In teenstelling hiermee het die selle wat langer as vier minute gelaat is geen verdere vormverandering ondergaan nie (fig. 8 en 9).

Pseudopoodagtige uitlopers (P) kan op die granulosietoppervlak waargeneem word indien die sel direk na hemolimfversameling gefikseer word (fig. 2). Na 15 sekondes begin die filopodia (F) aan die kant waar die sel met die glasoppervlak in aanraking is, ontwikkel (fig. 3). Na 30 sekondes is filopodia (F) waar die sel met die glasoppervlak in aanraking kom, goed ontwikkel (fig. 4) en na 60 sekondes is die filopodia (F) oor die hele seloppervlak sigbaar (fig. 5). Filopodia stem ooreen met soortgelyke morfologiese strukture by fibroblaste waar die strukture 'n sensoriese funksie vervul (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts & Watson, 1983). Hierdie strukture is waarskynlik inisieel in die vorming van lamellipodia. Lamellipodia (L) word reeds na 60 sekondes, waar die sel met die glasoppervlak in aanraking kom, waargeneem (fig. 5) maar is eers na 90 sekondes goed ontwikkel (fig. 6). Na twee minute is die lamellipodia (L) steeds goed sigbaar en begin die eens sferiese selliggaam (S) afplat (fig. 7). By granulosiete wat vier minute geïnkubeer was, het die selliggame toenemend vervaag en op die glasoppervlak uitgesprei (fig. 8). Die selle wat egter vir tien minute op die glasoppervlak gelaat

is het geen verdere veranderinge ondergaan nie (fig. 9) en soos die selle wat vir vier minute gelaat is vertoon (fig. 8).

Figuur 1. 'n Elektronmikrograaf wat die uitwendige morfologie van granulose (G), met pseudopoodagtige uitlopers (P), en hialinosiete (H) wat onmiddelik na hemolimfversameling gefikseer is, aantoon.

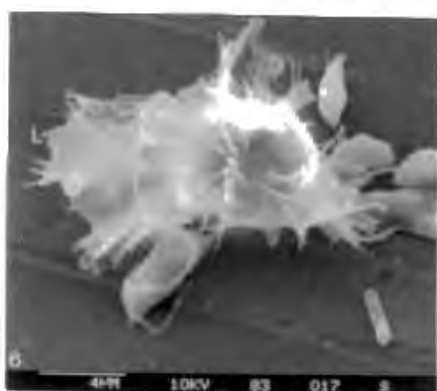
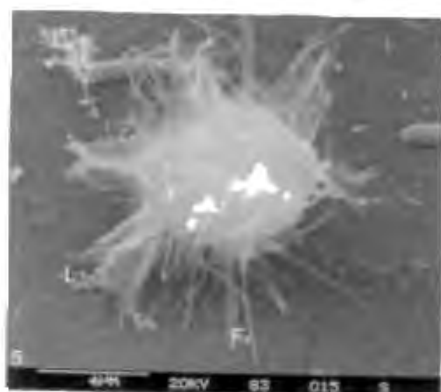
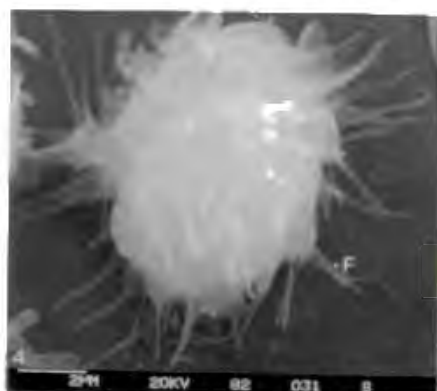
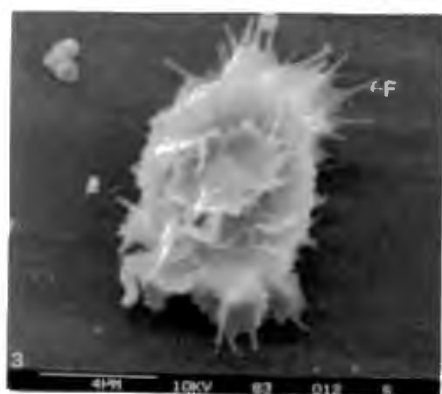
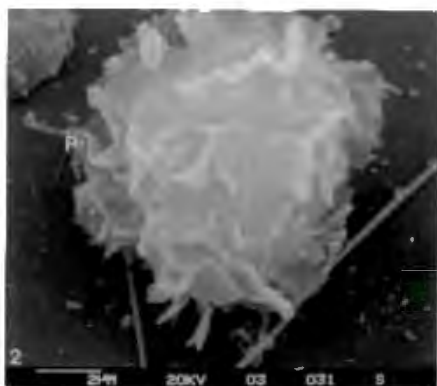
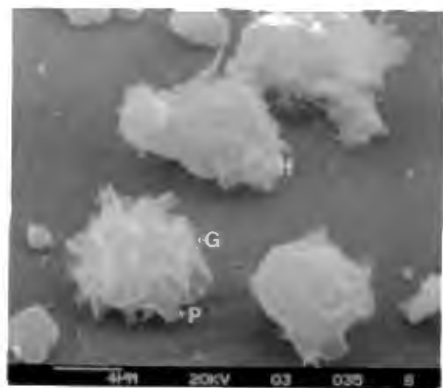
Figuur 2. 'n Elektronmikrograaf wat die uitwendige morfologie van 'n enkele granulose, met pseudopoodagtige uitlopers (P), wat onmiddelik na hemolimfversameling gefikseer is, aantoon.

Figuur 3. 'n Elektronmikrograaf wat die uitwendige morfologie van 'n granulose, met kort filopodia (F), nadat dit 15 sekondes met 'n glasoppervlak in aanraking was, aantoon.

Figuur 4. 'n Elektronmikrograaf wat die uitwendige morfologie van 'n granulose, met filopodia, nadat die sel 30 sekondes met 'n glasoppervlak in aanraking was, aantoon.

Figuur 5. 'n Elektronmikrograaf wat die uitwendige morfologie van 'n granulose, 60 sekondes nadat dit met 'n glasoppervlak in aanraking was, aantoon. Goed ontwikkelde filopodia (F) en die eerste lamellipodia (L) is sigbaar.

Figuur 6: 'n Elektronmikrograaf wat 'n granulose met lamellipodia (L), nadat die sel 90 sekondes met 'n glasoppervlak in aanraking was, aantoon.



Sover bekend is alle studies om die in vitro uitspreiding van selle te bestudeer met behulp van ligmikroskopie gedoen. Volgens Cheng & Auld (1977) vorm granulose, wat toegelaat word om op glas uit te spreid, aksiaalstaafondersteunde ektoplasmiëse filopodia wat uit die periferie van die selle ontstaan. Jeong & Heyneman (1976) beskryf die uitlopers wat die selligame vorm, nadat die granulose op glas uitgespreid het, as filamentagtige pseudopodia wat verander in lamelliagtige voue. Yoshino & Granath (1985) beskryf hierdie strukture as speekagtige filopodia, terwyl Yoshino (1981) na sitoplasmiese "skirts" verwys. Krupa et al. (1977) wat *B. guernei*-leukosiete in vivo met behulp van 'n elektronmikroskoop bestudeer het, het gevind dat pseudopodia slegs by granulose wat in kontak met sporisiste is, voorkom.

Uit bogenoemde resultate blyk dit dat granulose slegs uitspreid wanneer dit met vreemde stowwe in aanraking kom.

In die huidige studie is ook gevind dat hialinosiete in al die getoetste gevalle sferies bly en nie van vorm verander nie. Hierdie bevinding staaf die van Cheng & Auld (1977). Volgens hierdie outeurs vorm hialinosiete nie filopodia wanneer hulle met 'n glasoppervlak in aanraking kom nie maar plat wel af. Krupa et al. (1977) het ook bevind dat *B. guernei*-hialinosiete, wanneer dit in vivo bestudeer word, altyd rond vertoon en nie met sporisiste in aanraking kom nie.

Na aanleiding van die bevinding dat hialinosiete geen vormverandering ondergaan wanneer dit met 'n glasoppervlak in aanraking kom nie, sal slegs die invloed wat serum op granuloseuitspreiding, het bespreek word.

In figuur 9 is dit opvallend dat die selle in serum na 10 minute op die glasplaatjie grootliks afgeplat en uitgespreid is. Dit is egter in figuur 10 duidelik dat die uitgespreide selle wanneer dit in isosmotiese PBS gespoel word weer 'n sferiese vorm verkry. Indien hierdie teruggetrekte granulose vir 'n verdere periode van vyf minute in PBS (fig. 11) of serum (fig. 12) geïnkubeer word, spreid beide groepe selle weer uit.

Figuur 7. 'n Elektronmikrograaf wat 'n granulosiet en hialinosiete twee minute nadat dit met 'n glasoppervlak in aanraking was, aantoon. Goed ontwikkelde lamelipadia (L) en 'n afplattende selliggaam (S) is by die granulosiet sigbaar.

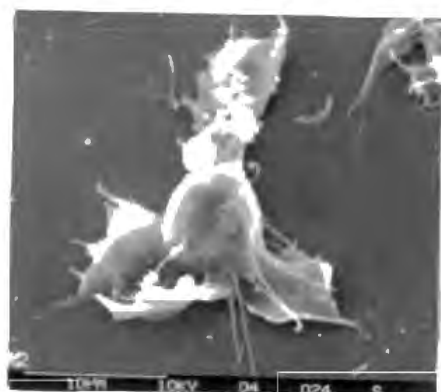
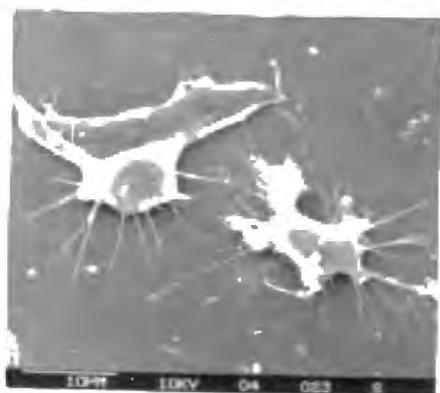
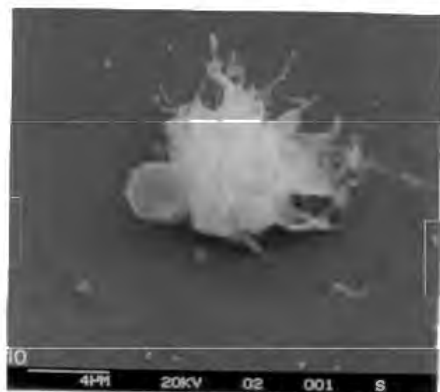
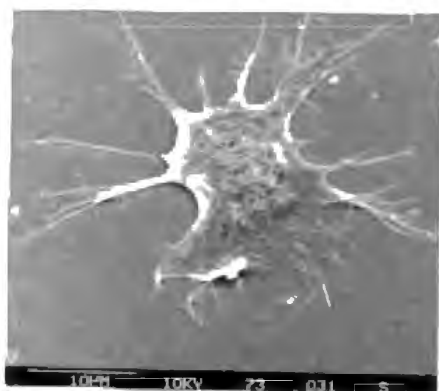
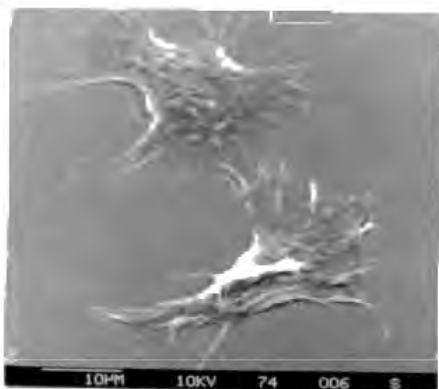
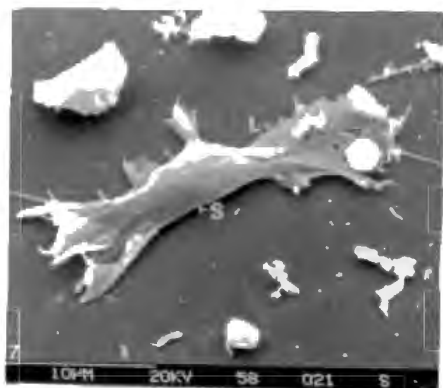
Figuur 8. 'n Elektronmikrograaf wat 'n afgeplatte granulosiet, nadat dit vir vier minute op 'n glasoppervlak gelaat is, aantoon.

Figuur 9. 'n Elektronmikrograaf wat 'n granulosiet nadat dit vir tien minute op 'n glasoppervlak gelaat is aantoon.

Figuur 10. 'n Elektronmikrograaf wat 'n granulosiet nadat dit vir tien minute in serum op 'n glasoppervlak gelaat is om uit te spreid daarna met PBS gespoel en gefikseer is, aantoon.

Figuur 11. 'n Elektronmikrograaf wat granulosiete, vyf minute nadat dit met PBS gespoel en daarin gelaat is om weer op die glasoppervlak uit te spreid, aantoon.

Figuur 12. 'n Elektronmikrograaf wat 'n granulosiet vyf minute nadat dit met PBS gespoel, daarna weer met serum bedek en gelaat is om op 'n glasoppervlak uit te spreid, aantoon.



Hierdie bevinding stem grootliks ooreen met resultate van Yoshino (1981) en Yoshino & Granath (1985) by *B. glabrata* verkry. Laasgenoemde outeurs het egter gevind dat die selle nadat die serum verwyder is eers na 15 minute in PBS volledig tot hulle oorspronklike vorm teruggetrek het.

Die verskynsel dat granulosiete terugtrek na hulle oorspronklike vorm nadat hulle met PBS gespoel is, kan nie verklaar word nie. Die moontlikheid dat fisiese veranderinge in die omgewing hierdie verskynsel veroorsaak, is onwaarskynlik aangesien uitgespreide selle nie op meganiese aanraking gereageer het nie (Wolmarans & Yssel, 1988b).

Uit die resultate is dit duidelik dat granulosiete pseudopodia, filopodia en lamellipodia vorm wanneer dit met 'n glasoppervlak in aanraking kom en dat serum nie vir die vorming van hierdie strukture noodsaaklik is nie.

3.3. DIE VERBAND TUSSEN SELGROOTTE EN SLAKMASSA

Die doel van hierdie studie was om 'n moontlike verband tussen selgrootte en slakmassa te bepaal.

Vier groepe van ses slakke elk is gebruik. Die gemiddelde massa van die ses slakke in elke groep was onderskeidelik 0,05; 0,2; 0,5 en 0,9 g. Hemolimf van die ses slakke in elke groep is versamel, bymekaar gevoeg, onmiddellik daarna vir een uur gefikseer en vir SEM-studies voorberei.

Resultate en bespreking

Die deursnee van 30 selle van elke sel tipe is by elk van die slakgroepe bepaal en word in tabel 9 weergegee. Geen betekenisvolle verskille kon volgens die Studente-t-toets tussen die gemiddelde granulosietgroottes

by die verskillende slakgroepe aangetoon word nie ($P>0,05$). 'n Soortgelyke bevinding is ook ten opsigte van hialinosiete gemaak. Hierdie bevinding verskil van die van Dikkeboom et al. (1984) wat 'n toename in selgrootte van 8-10 μm by slakke met 'n lengte van 10 ± 1 mm (4-5 weke oud) en van 10-12 μm by slakke van 25 ± 1 mm lank (12-13 weke oud) gevind het. 'n Betekenisvolle verskil ($P<0,05$) is egter tussen die granulosiet- en hialinosietdeursnee van al vier die slakgroepe gevind.

Die gemiddelde granulosietdeursnee van die slakke met 'n massa van 0,05-0,9 g was $6,37\pm 1,76$ μm terwyl die gemiddelde hialinosietdeursnee $2,48\pm 1,21$ μm was. 'n Soortgelyke bevinding is deur Cheng & Auld (1977) by *B. glabrata*-slakke met 'n skulplengte van 8-10 mm gemaak. Volgens hierdie outeurs was die deursnee van die lewende granulosiete direk na hemolimfversameling $9,45\pm 1,78$ μm terwyl die hialinosietdeursnee $3,52\pm 0,83$ μm was. Krupa et al. (1977) het egter met 'n ondersoek na selgrootte by *B. guernei* gevind dat die granulosiete van hierdie slakke kleiner as die hialinosiete was. Uit gegewens in die huidige studie verkry, is dit duidelik dat *B. africanus*-hemosiete waarskynlik slegs op grond van selgrootte in twee groepe verdeel kan word.

Tabel 9. Die gemiddelde granulosiet- en hialinosietdeursnee van 30 selle elk wat onmiddellik na hemolimfversameling, by vier slakgroepe met wisselende massas, gefikseer is.

Gemiddelde massa van slakgroep (g)	Gemiddelde seldeursnee (μm)	
	Granulosiete SA	Hialinosiete SA
0,05	$6,32\pm 1,52$	$2,75\pm 1,35$
0,2	$6,00\pm 2,08$	$2,40\pm 1,18$
0,5	$6,48\pm 1,32$	$2,58\pm 1,08$
0,9	$6,69\pm 2,17$	$2,19\pm 1,24$

3.4.VERBAND TUSSEN SELGETAL EN SLAKMASSA

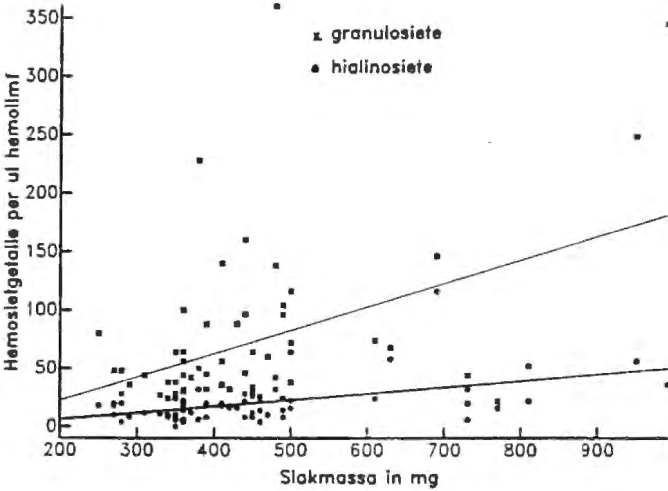
In hierdie studie is die verband tussen slakmassa en hemosietgetal (granulosiete en hialinosiete) van *B. africanus* bepaal. Sestig slakke met massas wat van 0,29-0,90g gevarieer het, is gebruik. Nadat die slakke afsonderlik geweeg is, is hemolimf versamel en met 'n gelyke volume 0,05% kristalviolet in PBS (pH 7,2 119 mOsm) verdun. Hierdie hemolimfverdunding is gebruik om hemosiet-enkellae voor te berei. Die granulosiet- en hialinosietgetal van elke slak is hierna afsonderlik bepaal.

Resultate en bespreking

Daar bestaan 'n groot variasie in granulosiet- en hialinosietgetalle by slakke met dieselfde massa (fig. 13). Ten spyte van hierdie variasie is daar wel 'n betekenisvolle verband tussen beide granulosiet- en hialinosietgetal en slakmassa. In die geval van die hialinosietgetal teenoor slakmassa is 'n helling van 0,06 met 'n korrelasiekoëffisiënt van 0,28 ($P < 0,05$) verkry. Die verband tussen granulosietgetal teenoor slakmassa daarenteen het 'n helling van 0,26 met 'n korrelasiekoëffisiënt van 0,41 ($P < 0,05$). In beide die gevalle is die Studente-t-toets gebruik om die betekenisvolheid te bepaal. Aangesien die granulosietgetal vinniger as die hialinosietgetal tydens massatoename van die slakke toeneem, is 'n toename in granulosietpersentasie met 'n toename in slakmassa voor die hand liggend.

Die resultate in hierdie studie steun die resultate van Stumpf & Gilbertson (1978) tot 'n mate, wat 'n logaritmiëse toename in hemosietgetal met 'n toename in slakgrootte by *B. glabrata* aangetoon het. Alhoewel Cheng (1975) en Cheng & Auld (1977) bevind het dat die granulosiete onderskeidelik $86,6 \pm 12,8\%$ en $93,3 \pm 4,04\%$ van *B. glabrata* se hemosietpopulasie uitmaak, kan dit nie direk met die bevindinge in hierdie studie vergelyk word nie aangesien die massas van hierdie *B. glabrata*-slakke nie bekend is nie.

Die bevindinge van die huidige ondersoek toon aan dat daar wel 'n verband tussen hemosietgetal en slakmassa bestaan. Hierdie verskynsel sal in gedagte gehou moet word wanneer die sellulêre respons by varswaterslakke bestudeer word.



Figuur 13. Die verband tussen granulose- en hialinosegetal (hemosegetal) en slakmassa van die varswaterslak *B. africanus*

3.5. DIE GEBRUIK VAN LEKTIENE OM MOONTLIKE GRANULOSIETSUBPOPULASIES TE IDENTIFISEER.

Uit voorlopereksperimente met *B. africanus*-hemosiete is gevind dat slegs granulosite direk by sellulêre verdediging betrokke is. Hierdie gegewens staaf die bevindinge van Cheng (1975) en Yoshino & Granath (1985) wat by *B. glabrata* gevind het dat slegs granulosite in direkte kontak met vreemde materiaal kom en fagosities aktief is.

Na aanleiding van hierdie bevindinge is lektiene gebruik om op 'n molekulêre vlak te bepaal of die *B. africanus*-granulosietpopulasie uit subpopulasies bestaan en indien wel, of hulle verskillende verdedigingsfunksies vervul.

Hemolimf van 15 slakke met 'n gemiddelde massa van $0,45 \pm 0,05$ g is afsonderlik versamel en met 'n gelyke volume PBS verdun. Vier hemosiet-enkellae is uit die hemolimf van elke slak berei, onderskeidelik met 20 μ l van een van vier lektiene waarvan die besonderhede in tabel 10 weergegee word, behandel en vir fluoressensiemikroskopie voorberei.

Tabel 10. Lektiene waaraan 'n fluoresserende verbinding fluoreskein isotiasinaat (FITS) gekoppel is en gebruik is om moontlike granulosisubpopulasies aan te toon.

Plante waaruit lektiene geïsoleer is	Lektien konsentrasie (µg/ml)	Suikers waarvoor lektiene 'n affiniteit het	Mole FITS per mole lektien
<i>Glycine max</i>	64	N-Asetiel-D-glukosamien D(+)-Galaktose	1
<i>Ricinus communis</i>	1,0	D(+)-Galaktose α-Laktose	6,7
<i>Triticum vulgare</i>	64	N-Asetiel-D-glukosamien	2,3
<i>Canavalia ensiformis</i>	32	N-Asetiel-D-glukosamien D(+)-Glukose D(+)-Mannose Metiel-α-D-mannopiranosied	5,9

Resultate en bespreking

Uit die omstandigheid dat lektiene affiniteit vir spesifieke suikers het, kan afgelei word dat dit slegs aan selle wat hierdie spesifieke suikers op hulle oppervlak vertoon, sal koppel. In die huidige studie is slegs die koppeling tussen granulosisete en lektiene in ag geneem.

Uit tabel 11 is dit duidelik dat slegs lektiene geïsoleer uit *Triticum vulgare* en *Canavalia ensiformis* (Con A) aan feitlik al die granulosisete van die ondersoekte *B. africanus*-slakseksemlare bind. Aangesien *T. vulgare*-lektien slegs 'n affiniteit vir N-asetiel-D-glukosamien (tabel 10) besit, is dit duidelik dat hierdie suikerreseptore op die oppervlak van al die granulosisete teenwoordig is. Con A het egter 'n affiniteit vir vier suikers (tabel 10) en slegs een van die vier suikers is op die granulosisetoppervlak nodig om koppeling te weeg te bring.

Dit is verder opvallend dat slegs 'n gemiddeld van 92,8±8,2% van die totale granulosisetpopulasie positief gereageer het nadat dit met lektien,

geïsoleer uit *Glycine max*, behandel is (tabel 11). Daarbenewens het $89,6 \pm 8,6\%$ van die getoetste granulosiete gefluoresseer nadat dit met FITS gekoppelde *Ricinus communis*-lektien behandel is. Volgens Yoshino (1981) wat 'n soortgelyke eksperiment met *B. glabrata* uitgevoer het, is slegs 'n positiewe reaksie met Con A en R *communis*-lektiene aangetoon.

Die bevindinge in hierdie studie dat R. *communis* en G. *max*-lektiene nie positief met alle granulosiete gereageer het nie, dui enersyds daarop dat daar selle bestaan wat nie hierdie spesifieke monosakkariedeterminante op hulle oppervlak besit nie. Andersyds is dit moontlik dat hierdie monosakkariede nie vir koppeling met die lektien toeganklik was nie. Die feit dat laasgenoemde twee lektiene na binding aan die selle ook swakker gefluoresseer het indien dit vergelyk word met die reaksie tussen die hemosiete en Con A en T. *vulgaris*-lektien, kan aan die volgende faktore, enkel of in kombinasie, toegeskryf word: a) 'n lae lektienkonsentrasie en b) 'n lae verhouding van mole FITS per mole lektien. Dit is dus voor die hand liggend dat hierdie faktore daartoe aanleiding kon gee dat nie alle selle wat met R. *communis* of G. *max* gekoppel het, waargeneem is nie. Die selle wat nie na lektien behandeling gefluoresseer het nie, kan dus nie onomwonde as 'n subpopulasie beskou word nie. Daar kon nie in hierdie ondersoek, deur van lektiene gebruik te maak, tussen verskillende granulosietsubpopulasies onderskei word nie.

In teenstelling hiermee het Dikkeboom, van der Knaap, Maaskant & de Jonge (1985) die bestaan van verskillende amoebosietsubpopulasies by *L. stagnalis* deur van monoklonale antiliggende gebruik te maak aangetoon. Daar sal egter nog in verdere studies vasgestel moet word of hierdie tegniek ook die teenwoordigheid van granulosietsubpopulasies by *B. africanus* kan aantoon.

Tabel 11. Persentasie van getoetste *B. africanus*-granulosiete wat gefluoresseer het nadat dit met 'n spesifieke FITS gekoppelde lektien behandel was.

Slaknommer	Lektien geïsoleer uit			
	<i>G. max</i>	<i>R. communis</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>C. ensiformis</i>
1	80	92	95	100
2	100	92	100	100
3	86	76	100	100
4	80	96	100	92
5	95	64	100	98
6	98	96	100	100
7	100	91	100	100
8	99	92	100	100
9	100	93	100	100
10	99	92	100	100
11	94	90	100	99
12	77	93	100	100
13	93	87	100	100
14	91	96	100	100
15	100	95	100	100
Gemiddeld	92,8±8,2	89,6±8,6	99,6±1,2	99,2±2,0

4. FAGOSITOSE EN ENKAPSULASIE

Die vernietiging van vreemde materiale by invertebraatdiere vind volgens die beskikbare literatuur hoofsaaklik deur die interaksie van hemosiete met die vreemde materiaal plaas (Sminia, van der Knaap en Edelenbosch, 1979; Bayne et al., 1980 en van der Knaap, Sminia, Kroese & Dikkeboom, 1981). Die betrokkenheid van humorale proteïene (hemagglutiniene) by fagositose en enkapsulasie is tans nog nie opgeklaar nie maar word volgens Anderson & Good (1976) wel as 'n moontlikheid beskou.

Die doel van hierdie ondersoek was a) om die mate van betrokkenheid van *B. africanus* sirkulerende hemosiete by fagositose en enkapsulasie na te gaan, b) om te bepaal of daar sekere humorale faktore waaronder hemagglutiniene in die hemolimf teenwoordig is wat by vernietiging van vreemde materiaal opsonies aktief is en c) of die herkenningspatrone van die *B. africanus*-hemosiete by die verenigbare (*S. haematobium*) en nie-verenigbare (*S. mansoni*) trematoodparasiete verskil.

In die ondersoek om te bepaal wat die betrokkenheid van hemosiete by fagositose is en of daar 'n faktor in die hemolimf (moontlik 'n hemagglutiniene) teenwoordig is wat opsonies aktief is, is hemosiet-enkellae berei deur hemolimf 30 minute op voorwerpglasies te inkubeer. Twee bakteriespesies naamlik *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* en een gisspesie naamlik *Saccharomyces cerevisiae* is vir hierdie studie geselekteer. Hierdie mikroörganismes is gebruik na aanleiding van die bevinding dat daar 'n ooreenkoms bestaan tussen die grootte van die mikroörganismes en die potensiaal van die hemosiete om dit te fagositeer (van der Knaap et al., 1981). Die mikroörganismes is afsonderlik in PBS, serum, hemagglutinienvrye serum, albumien-klierekstrak (wat volgens Anderson & Good, 1976 by molluske 'n hoë konsentrasie hemagglutiniene bevat) en hemagglutinienvrye albumien-klierekstrak gesuspendeer, afsonderlik op die hemosiet-enkellae geplaas en vir twee ure by 23°C in dampkamertjies geïnkubeer. Die oortollige mikroörganismes is hierna met PBS van die plaatjies afgespoel, waarna

die hemosiet-enkellae op die glasplaatjies met 100% metanol gefikseer, met 0,05% kristalviolet in PBS gekleur en met 'n dekglasie bedek is. Die aantal granuloseite betrokke by fagositose is met behulp van 'n ligmikroskoop by 100x olie-emersie bepaal. Elke eksperiment is in duplikaat uitgevoer.

Enkapsulasie is uitgevoer deur 300 mirasidioms elk van *S. haematobium* en *S. mansoni* afsonderlik vir 24 ure in vitro tot sporosistevorming te stimuleer. Na hierdie periode is 100 sporosiste van beide spesies afsonderlik gefikseer en vir SEM-studies voorberei. Die oorblywende sporosiste van beide spesies is afsonderlik in twee groepe verdeel en in kuvette uitgevoer met 1% agar, geplaas. Dit is gedoen aangesien sporosiste en veral hemosiete nie aan agar vassit nie (persoonlike mededeling deur Bayne) en was die maksimum hemosiete dus vir enkapsulasie van die sporosiste, indien dit sou plaasvind, beskikbaar. By die een groep sporosiste van beide parasiete is 'n 1 ml 1:1 oplossing van PBS:hemolimf en by die ander groep 'n 1 ml 1:1 oplossing van PBS:serum gevoeg en vir 24 ure by 25°C geïnkubeer. Die hemolimfoplossings is geselekteer om te bepaal of enkapsulasie wel by beide parasietgroepe kan plaasvind. Die serumoplossing daarenteen was om te verseker dat enige beskadiging wat by die sporosiste in die hemolimf voorkom wel aan die betrokkenheid van die hemosiete toegeskryf kan word. Om te verseker dat die pH en osmotiese konsentrasie konstant bly is PBS by die oplossings gevoeg sodat hierdie faktore nie 'n invloed op beide die sporosiste en hemosiete uitoefen nie. Die 24-ureblootstellingsperiode is geselekteer na aanleiding van bevindinge dat enkapsulasie en vernietiging in vivo reeds binne 12 ure plaasgevind het. Na die inkubasieperiode is al vier groepe sporosiste afsonderlik drie maal met PBS gespoel om die serum te verwyder, gefikseer en vir SEM-studies voorberei.

Resultate en bespreking

Alhoewel hemosiet-enkellae (granuloseite en hialinosiete) berei is, was slegs die granuloseite by fagositose betrokke. Die bevindinge steun

die resultate van Cheng (1975) wat by *B. glabrata* gevind het dat slegs granulose in direkte kontak met vreemde materiaal kom.

Uit die gegewens in tabel 12 is dit duidelik dat aansienlik meer granulose by fagositose van die kleiner bakterieë betrokke was as by die groter gisselle. Jeong & Heyneman (1976) het egter gevind dat *B. glabrata*-hemose nie lewende *S. marcescens* en *S. aureus*-bakterieë in vitro kon fagositêr nie maar dat 5% en 82% van die hemose wel fagosities aktief was wanneer hulle met hitte behandelde *S. marcescens* en *S. aureus*-bakterieë in aanraking was.

Die betrokkenheid van 'n opsoniese faktor in die hemolimf wat vreemde materiaal meer herkenbaar maak vir fagositose is in hierdie studie aangetoon. Dit word deur die bevindinge dat meer granulose mikroörganismes in serum as in PBS gefagositêr het, bevestig (tabel 12). Hierdie faktore is egter nie hemagglutiniene nie aangesien granulose mikroörganismes wat in hemagglutinienvrye serum was in dieselfde mate gefagositêr het as die in serum. Dit word verder bevestig deur die bevinding dat die persentasie granulose wat bakterieë wat in albumienklierekstrak teenwoordig was in dieselfde mate gefagositêr het as die granulose wat bakterieë in hemagglutinienvrye albumienklierekstrak gefagositêr het. Fagositose in beide die albumienklierekstrakte was ook aansienlik hoër indien dit met fagositose in PBS vergelyk word. Hierdie bevindinge steun die bevindinge van Anderson & Good (1976) wat gevind het dat *Otala lactea*-albumienklierekstrak in vitro 'n toename in fagositose by hemose tot gevolg het wanneer dit met fagositose in PBS vergelyk word. Die bewering deur hierdie outeurs dat die hemagglutiniene in die albumienklierekstrak vir die verhoogde aktiwiteit verantwoordelik was, kon nie in die huidige studie bevestig word nie.

Die betrokkenheid van *B. africanus*-hemose by enkapsulasie word in figure 14-19 uiteengesit. Dit is duidelik dat die mirasidiums van beide parasietespesies nie binne 24 ure volkome tot sporosiste getransformeer het nie aangesien daar wel nog siliaatplate (S) op die organismes teenwoordig was (fig. 14 en 15). Uit figuur 16 is dit egter opvallend

dat *S. haematobium*-mirasidiëms na 'n verdere 24 ure in serum al die siliaatplate verloor het terwyl daar nog siliaatplate op die *S. mansoni*-larwes teenwoordig was (fig. 17). Die geringe beskadiging wat op die *S. mansoni*-larwes (fig. 17) sigbaar is, kan nie op hierdie stadium verklaar word nie maar die betrokkeheid van serumfaktore kan nie uitgesluit word nie. Die verskynsel dat die *S. haematobium*-larwale stadiums wat vir 24 ure in totale hemolimf gelaat is (fig. 18) nie soos in die geval van die wat in serum gelaat is alle siliaatplate verloor het nie, kan nie verklaar word nie.

Figure 18 en 19 toon die *S. haematobium* en *S. mansoni*-larwes wat vir 24 ure in hemolimf gelaat is. Dit is opvallend dat die granulosiete op die siliaatplaatvrye oppervlakke van beide die parasietespesies voorkom. Hialinosiete kon in geen geval in kontak met die parasiete gevind word nie. Dieselfde bevinding is ook deur Jeong & Heyneman (1976) by die *B. glabrata*-*S. mansoni* gasheer-parasietkombinasie gemaak. Dit is opvallend dat alle waargenome granulosiete op die organismes rond vertoon het. Dit kan waarskynlik aan die feit dat die monsters voor fiksering met PBS gespoel is, toegeskryf word. In die gevalle, waar die granulosiete met *S. mansoni*-larwes in aanraking was, is dit duidelik dat die kontak hefter vertoon as wat die geval by *S. haematobium* is. Beskadiging van die integument is ook by die *S. mansoni*-larwes sigbaar, terwyl geen beskadiging by die *S. haematobium*-larwes waargeneem kan word nie. Dit wil voorkom of slegs die siliaatplaatvrye gedeeltes van die parasiete as vreemd herken word en dat slegs die onverenigbare parasiet naamlik *S. mansoni* vernietig word. Soortgelyke bevindinge is deur Bayne et al. (1980) wat enkapsulasie tussen die verenigbare en nie-verenigbare *B. glabrata*-slakke en die *S. mansoni*-sporosiste bestudeer het, gevind. Harris (1975) en Krupa et al. (1977) het dieselfde bevindinge by onderskeidelik *B. glabrata* en *Angiostrongylus cantonensis* en by *B. guernei* en *S. haematobium* gemaak. Volgens hierdie outeurs vind larwale-lise plaas nadat die granulosiete aan die larwes geheg het en ensieme vrystel. Hierdie lise vind waarskynlik nie by die verenigbare gasheer-parasietkombinasie plaas nie.

Figure 14 en 15. Elektronmikrograwe van mirasidiums wat vir 24 ure in medium-F gelaat is om te transformeer. Siliaatplate (S) is steeds op die organismes sigbaar:

(14) *S. haematobium*

(15) *S. mansoni*.

Figure 16 en 17. Elektronmikrograwe van mirasidiums wat vir 24 ure in medium-F en daarna vir 'n verdere 24 ure in *B. africanus*-serum geïnkubeer is:

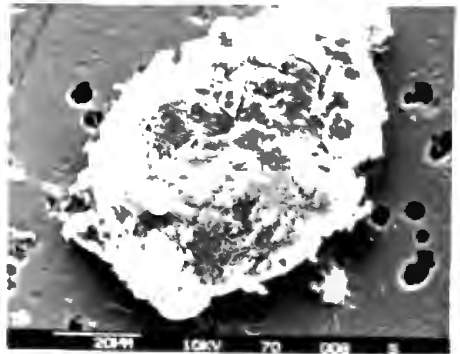
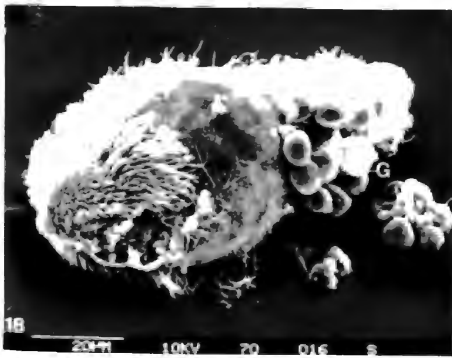
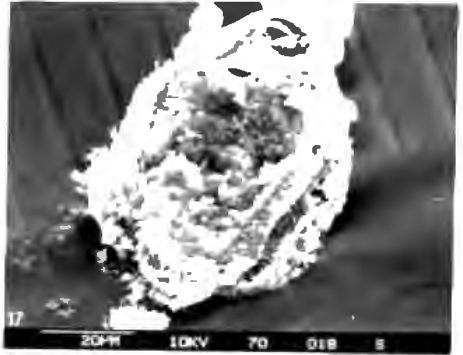
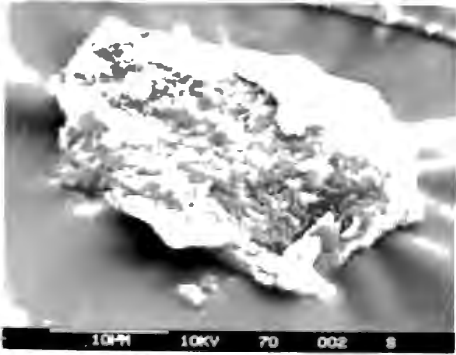
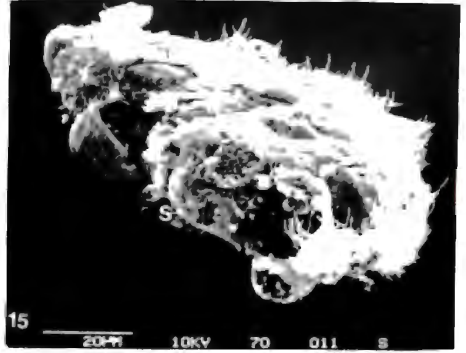
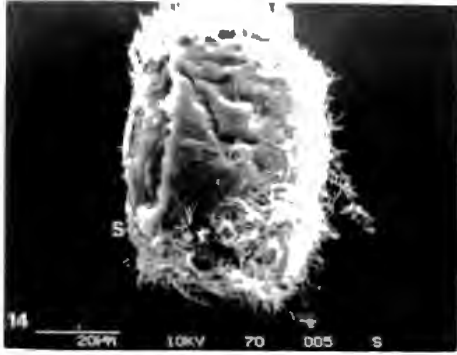
(16) *S. haematobium*

(17) *S. mansoni*.

Figure 18 en 19. Elektronmikrograwe van mirasidiums wat vir 24 ure in medium-F en daarna vir 'n verdere 24 ure in *B. africanus*-hemolinf geïnkubeer is. Granulosiete (G) is op die siliaatplaatlose mirasidiumoppervlakte sigbaar:

(18) *S. haematobium*

(19) *S. mansoni*.



Tabel 12. Die gemiddelde persentasie *B. africanus*-granulosiete wat na 'n twee-ureblootstellingsperiode mikroorganismes in verskillende mediums gefagositeer het.

Mikroorganismes	Partikel-grootte	Ak*- ekstrak	Ha*-vrye Ak*	PBS	Serum	Ha*-vrye serum
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,4x3-10µm	5	22	30	34	34
<i>Serratia marcescens</i>	0,5x0,5-10µm	71	79	16	97	96
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8x1µm	84	78	21	86	97

Ak* Albumienklier

Ha* Hemagglutinien

5. PENETRASIESTUDIES VAN 'N VERENIGBARE EN ONVERENIGBARE PARASIET IN DIE GASHEERSLAK B. AFRICANUS

5.1. EVALUERING VAN CHROOM-51 AS RADIOAKTIEWE MERKER

Die invloed wat schistosoomparasiete op hulle gashere mag hê, kan slegs bestudeer word indien dit bevestig kan word dat die parasiet wel die gasheer (in die geval 'n slak) binnegedring het. Dit kan gedoen word deur die slakke aan die geselekteerde parasiete bloot te stel en na voltooiing van die gedeelte van die lewensloop in die slak na te gaan of die slakke wel serkarië afskei. Hierdie metode is egter nie bruikbaar by onverenigbare parasiet-gasheerkombinasies nie omdat serkarië nie in hierdie geval afskei word nie. Daar moet dus van 'n alternatiewe metode gebruik gemaak word.

Deur parasiete met 'n gammastralende-isotoop te merk voordat die slakke aan die parasiet blootgestel word, kan die slakke na blootstelling lewend met 'n gammateller geanaliseer word om te bepaal of die parasiet wel die gasheer gepenetreer het. 'n Gammastralende-isotoop is wenslik omdat die gashere tydens die analise in 'n lewende toestand bestudeer kan word en dus vir latere bepalinge beskikbaar is. Chroom-51 (^{51}Cr) is 'n erkende gammastraler wat algemeen in die biologie gebruik word om onder andere ook alge (Van Aardt & Wolmarans, 1981) en schistosomula-oppervlaktegumente (Butterworth, Sturrock, Houda & Talor, 1976) te merk.

Omdat chroom egter 'n swaarmetaal is, wat toksies kan wees, moes 'n nie-toksiese chroomkonsentrasie bepaal word, waarmee die mirasidiums vir gebruik in penetrasiestudies gemerk kan word.

Die doel van die eksperiment was eerstens om te bepaal watter chroomkonsentrasie a) geen mirasidiummortaliteite veroorsaak nie, b) geen invloed op die inwendige en uitwendige morfologie van die parasiete

het nie, c) nie die in vitro mirasidium na sporisist-transformering beïnvloed nie en d) nie die penetrasie vermoë van die verenigbare parasiet (*S. haematobium*) en die daaropvolgende in vivo ontwikkeling in *B. africanus* beïnvloed nie. Nadat hierdie konsentrasie vasgestel is, moes bepaal word of ^{51}Cr wel deur lewende mirasidiums opgeneem word en sodoende vir penetrasiestudies gebruik kan word.

In al die eksperimente is van vars uitgebroeide *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums gebruik gemaak. Die mirasidiums is in al die gevalle aan wisselende konsentrasies 100 μl CrCl_3 (opgelos in 0,45 μm Millipore gefiltreerde akwariumwater) per mirasidium, by kamertemperatuur, blootgestel.

Om na te gaan watter chroomkonsentrasie geen mirasidiummortaliteite binne een uur veroorsaak nie, is 100 mirasidiums van beide schistosoomspesies onderskeidelik vir een uur aan 4,5 nM; 4,5 μM en 0,9; 1,8; 2,7; 3,6; en 4,5 mM Cr as CrCl_3 blootgestel. Hierna is die mirasidiums deeglik met gefiltreerde akwariumwater gespoel. Dit is gedoen deur die mirasidiums met 'n nematoodsuier te versamel en oor te plaas in 'n Perspex-bakkie met 'n gaasbodem, met 'n maasgrootte van 5 μm , die chroomoplossing deur die bodem te dreineer en drie maal akwariumwater oor die mirasidiums te spoel. Na die wasproses is die mirasidiums vir mortaliteite nagegaan, daarna vir twee ure in akwariumwater by kamertemperatuur gelaat waarna hulle weer vir mortaliteite nagegaan is. Die twee-ureperiode het ooreengestem met die blootstellingsperiode van die parasiet aan die slakke. 'n Mirasidium is as dood beskou indien dit nadat dit met akwariumwater afgespoel was nie weer aktief geword het nie.

Die effek van chroom op die uitwendige morfologie van die *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums is met ses groepe van 100 mirasidiums elk, per spesie, bestudeer. Die groepe was onderskeidelik vir 60 minute aan 4,5 nM, 4,5 μM en vir 5, 15 en 60 minute aan 4,5 mM CrCl_3 blootgestel. Hierdie periodes is geselekteer nadat voorlopereksperimente getoon het dat die organismes na vyf minute by 4,5 mM chroom nog aktief was maar na 15 minute onaktief geraak het. Die een-uurperiode is geselekteer

omdat dit die maksimumperiode is wat die mirasidiums aan ^{51}Cr blootgestel sou word tydens merking. Die sesde groep is vir 60 minute in akwariumwater gelaat. Na blootstelling is die mirasidiums in elke groep, soos reeds bespreek, met gefiltreerde akwariumwater gespoel en vir SEM-studies gefikseer en voorberei. Die teenwoordigheid van chroom op die oppervlak van die mirasidiums is met 'n X-straal-mikroanaliseerder aan die SEM gekoppel, ontleed.

Die patologiese effekte van chroom op die inwendige morfologie van mirasidiums is nagegaan deurdat die parasiete soos vir uitwendige morfologiese studies behandel, gefikseer en vir TEM-studies voorberei is. In hierdie geval was die mirasidiums nie vir 15 minute aan 4,5 mM chroom blootgestel nie maar is die sesde groep mirasidiums onmiddellik met kookwater gedood en vir een uur gelaat voordat dit gefikseer is. Hierdie mirasidiums het as kontrole vir die chroom-blootgestelde mirasidiums, wat binne die een uurblootstellingstyd afgesterf het maar ook eers na een uur gefikseer is, gedien. Na fiksering is die mirasidiums vir TEM-studies voorberei.

In die studie om te bepaal of mirasidiums wat aan die verskillende chroomkonsentrasies blootgestel was, in vitro na sporosiste kan transformeer, is van agt groepe van 100 mirasidiums elk, van die onderskeie schistosoomspesies gebruik gemaak. Sewe van die groepe is aan dieselfde chroomkonsentrasies soos geselekteer vir die mortaliteitstudie vir een uur blootgestel. 'n Agtste groep het as kontrole gedien en is nie aan chroom blootgestel nie maar vir een uur in gefiltreerde-akwariumwater gelaat. Na die blootstellingsperiodes is die mirasidiums met akwariumwater gespoel, gestimuleer tot sporosisttransformering, ligmikroskopies ondersoek om die persentasie transformering te bepaal. Transformering is as voltooi beskou as 'n mirasidium al sy siliaatplate verloor het.

Om die in vivo sporosistontwikkeling na te gaan, is van vier groepe van 25 *S. haematobium*-mirasidiums elk gebruik gemaak. Die groepe mirasidiums is onderskeidelik aan 4,5 mM chroom vir vyf minute, 4,5 μM en 4,5 nM chroom vir een uur en akwariumwater vir een uur bloot-

gestel. Na hierdie periode is elke mirasidiumgroep afsonderlik drie maal in kraanwater gespoel. Daarna is vyf slakke onderskeidelik aan vyf mirasidiums per slak vir 'n periode van twee ure blootgestel. Die vier groepe van vyf slakke elk is na blootstelling vir 36 dae aangehou waarna hulle elke tweede dag tot dag 40 vir serkaries-afskieding ondersoek is.

Nadat die korrekte chroomkonsentrasie waaraan die mirasidiums vir penetrasiestudies blootgestel moes word, bepaal is, is groepe van 20 mirasidiums vir periodes van 5, 10, 20, 30 en 60 minute aan hierdie chroomkonsentrasie waarvan die chroom in die geval radioaktief was, laat rondswem. Hierna is die mirasidiums soos reeds bespreek, gespoel waarna die radioaktiwiteit van die mirasidiums sowel as die laaste afspoelwater in tellings per minuut (tpm) met 'n Outogammaspektrometer (model 5000, Packard Instrument Co.) bepaal is.

Resultate en bespreking

Uit tabel 13 kan gesien word dat chroomkonsentrasies laer as 0,9 mM geen mirasidiummortaliteite by beide schistosoomspesies binne een uur veroorsaak het nie. Daar was ook geen verdere mortaliteite tydens die twee-ureperiode waar die mirasidiums, na blootstelling, in akwariumwater aangehou was nie.

Tabel 13. Die persentasie *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiummortaliteite na een-uurblootstelling aan verskillende chroomkonsentrasies

Chroomkonsentrasies	% <i>S. haematobium</i> - mirasidium- mortaliteite	% <i>S. mansoni</i> - mirasidium- mortaliteite
4,5 mM	100	100
3,6 mM	100	100
2,7 mM	100	100
1,8 mM	100	100
0,9 mM	0	0
4,5 μ M	0	0
4,5 nM	0	0
0	0	0

Die effek van chroom op die uitwendige morfologie van die mirasidiums word in figure 20-31 geïllustreer. 'n Vergelyking van die kontrole *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums (fig. 20 en 21) met die mirasidiums wat aan 4,5 nM (fig. 22 en 23) en aan 4,5 μ M (fig. 24 en 25) chroom blootgestel was, toon geen opvallende uitwendige morfologiese veranderinge nie. Die *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums wat egter onderskeidelik vir 5, 15 en 60 minute aan 4,5 mM chroom blootgestel was (fig. 26 en 27; 28 en 29; 30 en 31) het morfologiese veranderinge ondergaan. In al hierdie gevalle kan 'n verkorting van die liggaam duidelik waargeneem word wat moontlik aan die sametrekking van lengteverlopende spierweefsels toegeskryf kan word. Die aggregate (A) op al die mirasidiums wat aan chroom blootgestel was, kon slegs in die geval waar die parasiete aan 4,5 mM chroom blootgestel was met behulp van 'n X-straal-mikroanaliseerder as chroom geïdentifiseer word (fig. 32 en 33). Die feit dat die aggregate in die ander gevalle nie as chroom geïdentifiseer kon word nie, kan moontlik aan te lae konsentrasies toegeskryf word.

Figure 20 en 21. Elektronmikrograwe van kontrole-mirasiidiums wat vir een uur in akwariumwater gelaat is:

(20) *S. haematobium*

(21) *S. mansoni*.

Figure 22-25. Elektronmikrograwe van mirasiidiums wat vir een uur onderskeidelik aan 4,5 nM en 4,5 μ M chroom blootgestel is:

(22) *S. haematobium* (4,5 nM)*,

(23) *S. mansoni* (4,5 nM)*,

(24) *S. haematobium* (4,5 μ M)* en

(25) *S. mansoni* (4,5 μ M)*.

* Aggregate (A) is op die siliums van al die mirasiidiums sigbaar.

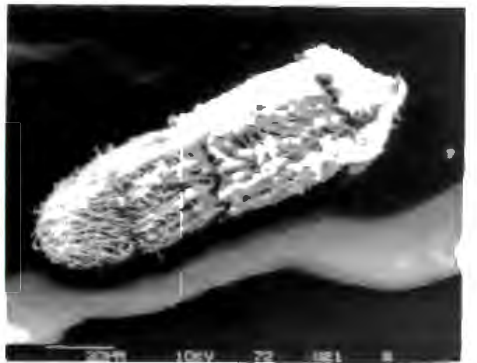
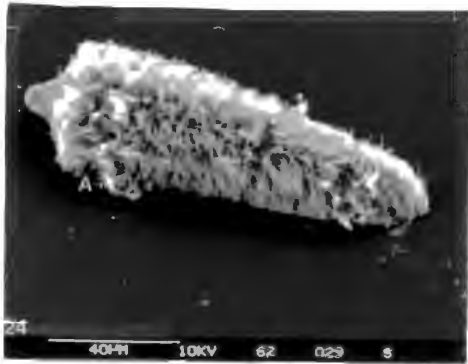
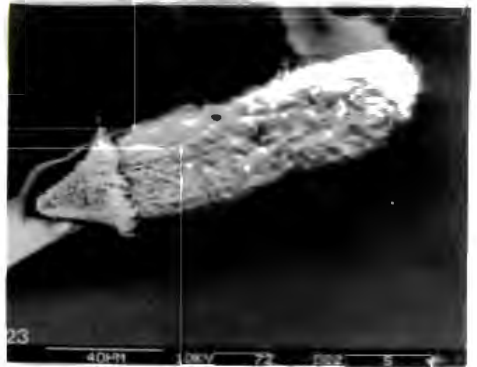
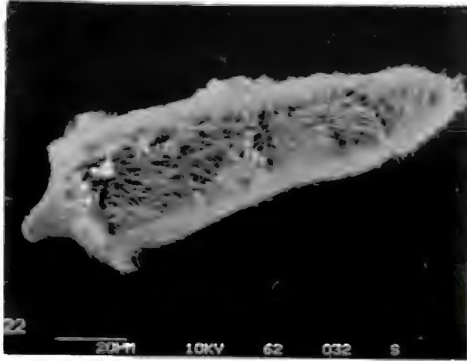
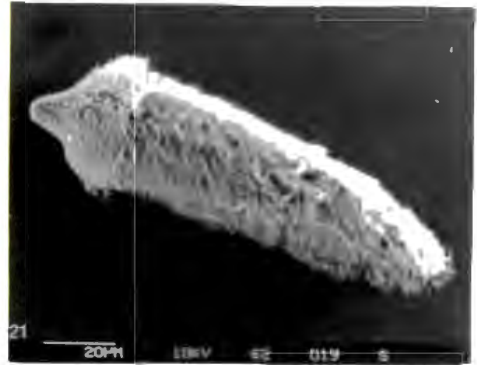
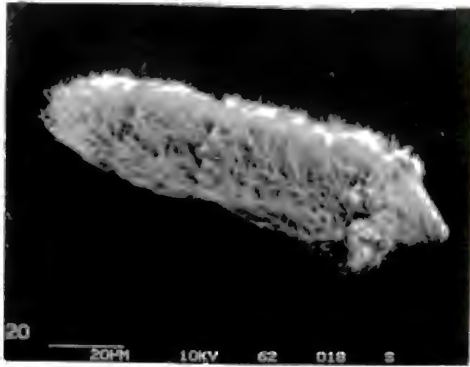


Figure 26-31. Elektronmikrograwe van mirasidiums wat onderskeidelik vir 5, 15 en 60 minute aan 4,5 mM chroom blootgestel is:

(26) *S. haematobium* (5 minute)*,

(27) *S. mansoni* (5 minute)*,

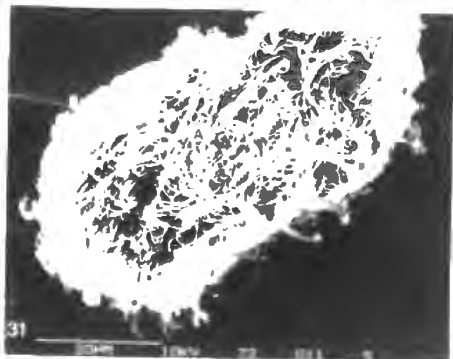
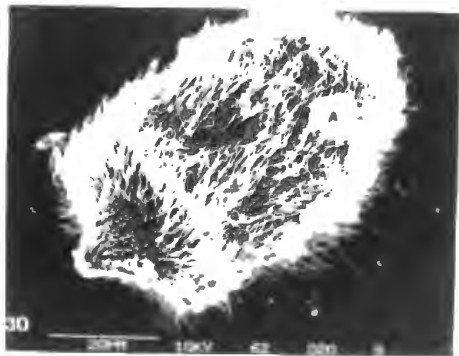
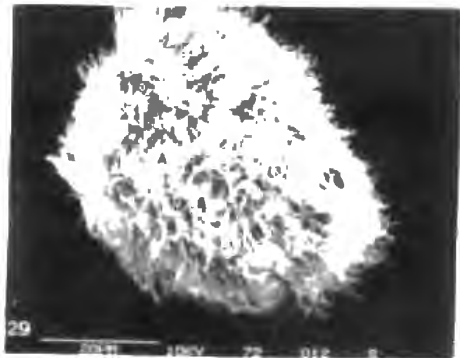
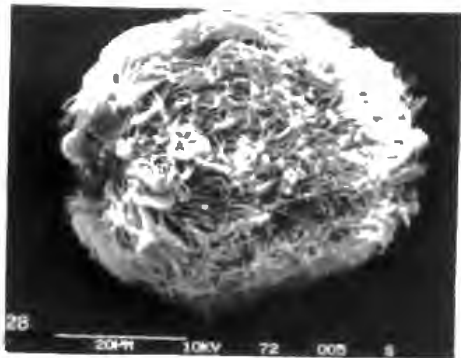
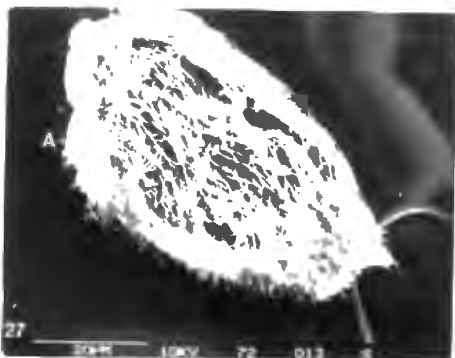
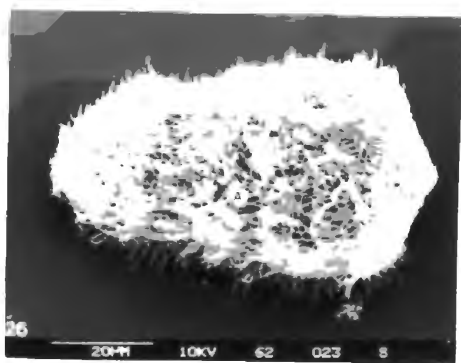
(28) *S. haematobium* (15 minute)*,

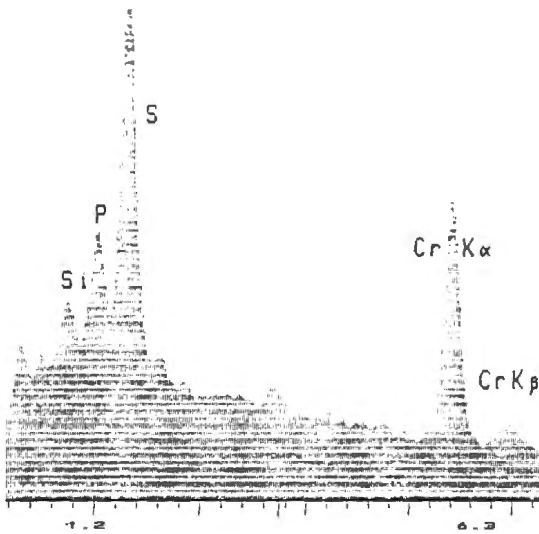
(29) *S. mansoni* (15 minute)*,

(30) *S. haematobium* (60 minute)* en

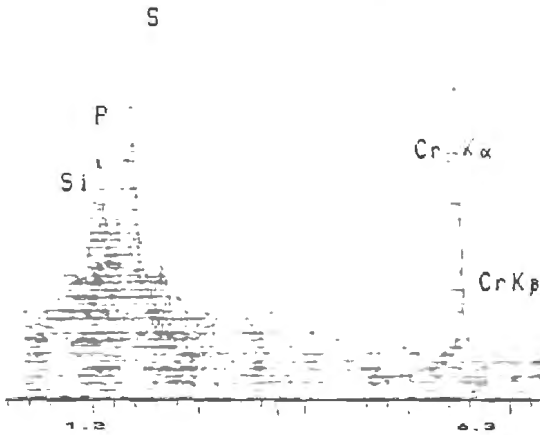
(31) *S. mansoni* (60 minute)*.

* Aggregate (A) is op die silium van al die mirasidiums sigbaar.





Figuur 32. 'n Grafiek getrek deur 'n X-straal-mikroanaliseerder wat die chemiese samestelling van 'n aggremaat op 'n *S. haematobium*-mirasidium, wat vir vyf minute aan 4,5 mM chroom blootgestel is, aantoon.



Figuur 33. 'n Grafiek getrek deur 'n X-straal-mikroanaliseerder wat die chemiese samestelling van 'n aggremaat op 'n *S. mansoni*-mirasidium, wat vir vyf minute aan 4,5 mM chroom blootgestel is, aantoon.

Die effek van chroom op die inwendige morfologie van die mirasidiums word in figure 34-45 geïllustreer. Wanneer *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidiums wat vir een uur aan 4,5 mM chroom (fig. 34 en 35) blootgestel was, vergelyk word met kontrolemirasidiums (fig. 38 en 39), word groot ruimtes in die sitoplasma, wat op weefseldegenerasie dui, waargeneem. Die moontlikheid dat die degenerasie aan natuurlike vernietiging na dood en voor fiksering toegeskryf kan word, is hoogs onwaarskynlik. Dit word bevestig deur die gegewens verkry met die mirasidiums wat onmiddellik met kookwater gedood is (fig. 44 en 45) en eers na 'n uur gefikseer is en nie dieselfde mate van agteruitgang getoon het nie. Die mirasidiums wat egter vir vyf minute aan 4,5 mM chroom (fig. 36 en 37) en vir een uur aan 4,5 μ M (fig. 38 en 39) en 4,5 nM chroom (fig. 40 en 41) blootgestel was, het geen weefseldegenerasie getoon nie en vergelyk goed met die kontrolemirasidiums (fig. 38 en 39).

Uit die gegewens verkry met die uitwendige en inwendige morfologiese studies wil dit voorkom of chroomkonsentrasies van 4,5 nM en minder geen nadelige invloed op die mirasidiums gehad het nie.

Volgens tabel 14 is dit duidelik dat 100% sporosisttransformering by die kontrolemirasidiums en die *S. haematobium* groep wat aan 4,5 nM chroom blootgestel was, voorgekom het. Van die totale aantal *S. mansoni*-mirasidiums wat aan 4,5 nM chroom blootgestel was het slegs 90% transformering ondergaan. Die transformeringspersentasie van mirasidiums wat aan 4,5 μ M en 0,9 mM chroom blootgestel was, was onderskeidelik 93 en 91% vir *S. haematobium* en 73 en 68% vir *S. mansoni*.

Die resultate verkry van die *in vivo* parasiet ontwikkeling toon dat al die slakke wat aan kontrolemirasidiums en mirasidiums wat vir een uur aan 4,5 nM chroom blootgestel was, serkarië afgeskei het terwyl 80% van die slakke wat aan mirasidiums wat aan 4,5 μ M chroom blootgestel was serkarië afgeskei het.

Figure 34 en 35. Elektronmikrograwe van die inwendige morfologie van mirasidiums wat vir een uur aan 4,5 mM chroom blootgestel is:

(34) *S. haematobium* en

(35) *S. mansoni*.

Figure 36 en 37. Elektronmikrograwe van die inwendige morfologie van die mirasidiums wat vir vyf minute aan 4,5 mM chroom blootgestel is:

(36) *S. haematobium* en

(37) *S. mansoni*.

Figure 38 en 39. Elektronmikrograwe van die inwendige morfologie van kontroleparasidiums wat een uur in akwariumwater gelaat is:

(38) *S. haematobium* en

(39) *S. mansoni*.

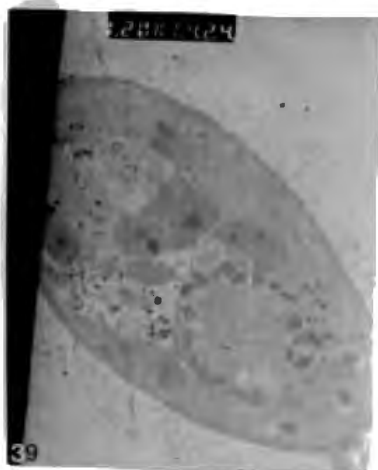
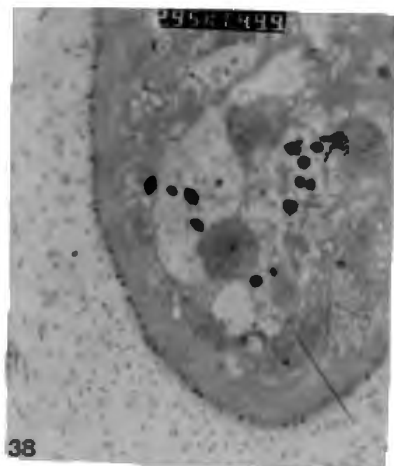
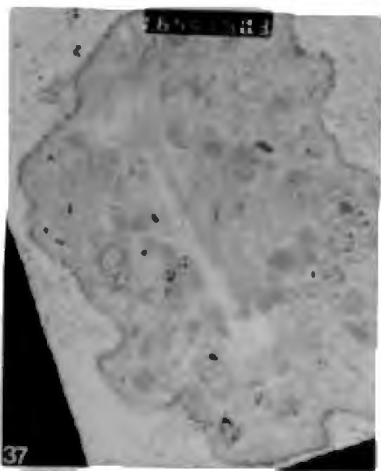
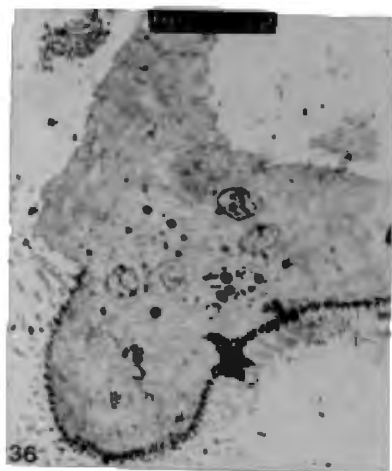
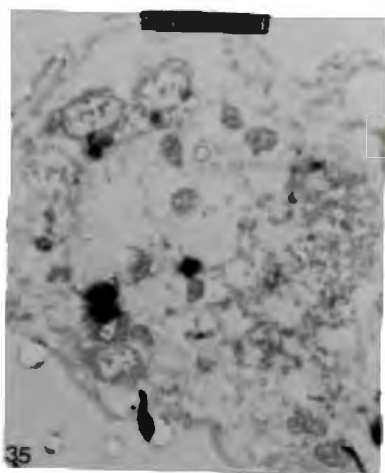
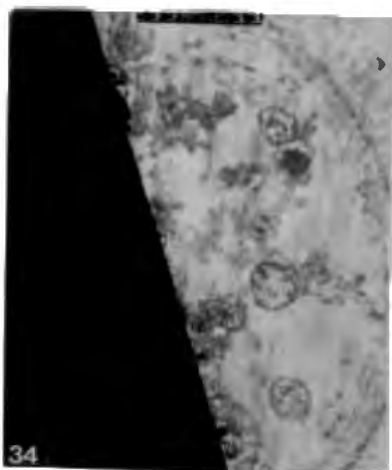


Figure 40-43. Elektronmikrograwe van mirasidioms wat vir een uur onderskeidelik aan 4,5 nM en 4,5 μ M chroom blootgestel is:

(40) *S. haematobium* (4,5 nM),

(41) *S. mansoni* (4,5 nM),

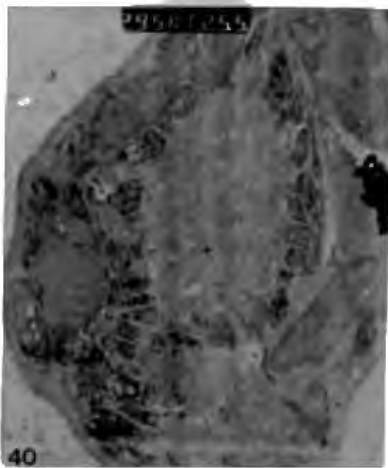
(42) *S. haematobium* (4,5 μ M) en

(43) *S. mansoni* (4,5 μ M).

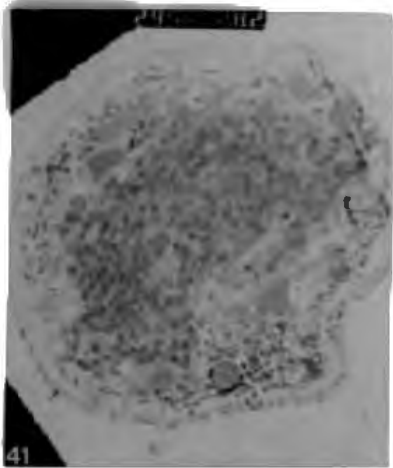
Figure 44 en 45. Elektronmikrograwe van mirasidioms wat onmiddellik met kookwater gedood, gelaat en na een uur gefikseer is:

(44) *S. haematobium* en

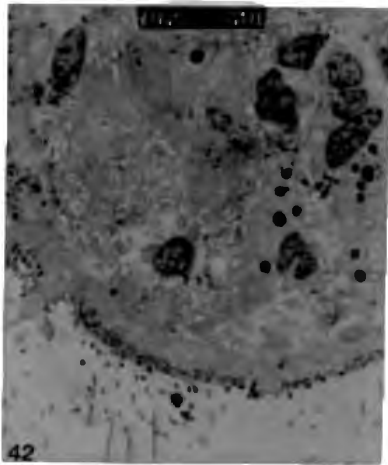
(45) *S. mansoni*.



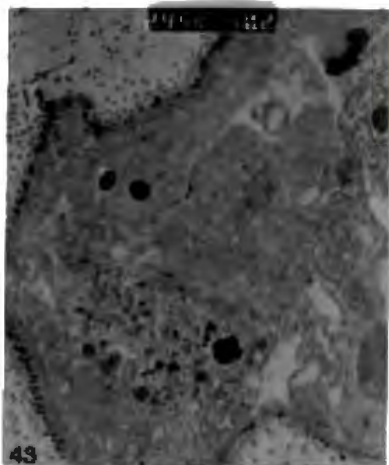
40



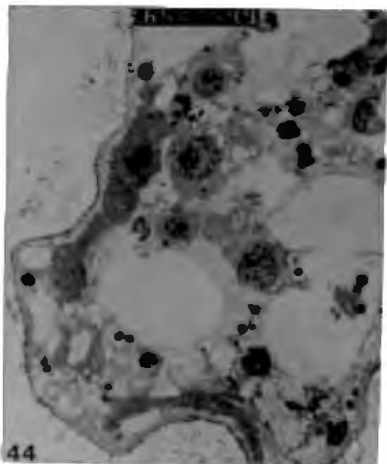
41



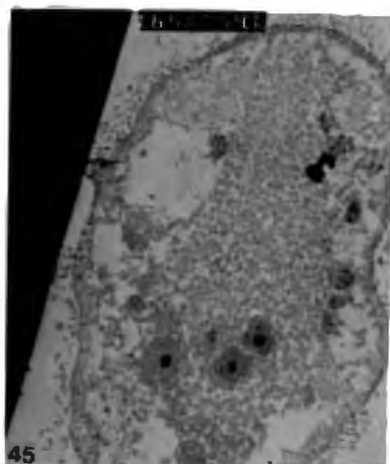
42



43



44



45

In teenstelling hiermee het nie een van die slakke wat met mirasidiums (wat aan hoër chroomkonsentrasies blootgestel was) gedag was, serkarië afgeskei nie. Die hoë chroomkonsentrasie kon enersyds tot gevolg gehad het dat die mirasidiums so verswak was dat hulle nie die slakke kon penetreer nie, en andersyds wel kon penetreer maar nie verder kon ontwikkel nie, of deur die slak se immuunstelsel vernietig is.

Uit hierdie studie is dit duidelik dat 4,5 nM chroom geen nadelige uitwerking op mirasidiums het nie en dus 'n geskikte konsentrasie vir mirasidiumpenetrasiestudies is.

Wat die merking van mirasidiums met ^{51}Cr betref kon geen radio-aktiwiteit in die laaste afspoelwater sowel as op die mirasidiums wat vir die wisselende periodes aan 4,5 nM ^{51}Cr blootgestel was, gevind word nie. Alhoewel hierdie isotoop aan verskeie ander biologiese membrane adsorbeer en op die 4,5 mM chroomblootgestelde mirasidiums geïdentifiseer is, wil dit voorkom of die geselekteerde konsentrasie waarskynlik te laag was om merking mee te doen. Chroom 51 kan dus nie gebruik word vir mirasidiummerking om penetrasie te monitor nie. Die enigste alternatiewe metode om penetrasie te bevestig is om deur middel van histologiese ondersoeke van die slakweefsel die parasietmateriaal te identifiseer.

Tabel 14. Persentasie mirasidioms wat binne 48 ure in vitro na sporosiste getransformeer het nadat hulle vir een uur aan wisselende chroomkonsentrasies blootgestel was.

Chroomkonsentrasies	% <i>S. haematobium</i> - mirasidioms wat getransformeer het	% <i>S. mansoni</i> - mirasidioms wat getransformeer het
4,5 mM	-	-
3,6 mM	-	-
2,7 mM	-	-
1,8 mM	-	-
0,9 mM	91	68
4,5 μ M	93	73
4,5 nM	100	90
0	100	100

5.2. HISTOLOGIESE STUDIES

Om te bepaal of die geselekteerde schistosoomparasiete wel die slakke binnegedring het, is twee groepe van 10 slakke elk afsonderlik aan 50 *S. haematobium* en *S. mansoni*-mirasidioms per slak vir twee ure blootgestel. Na die blootstellingsperiode is die slakke vir ligmikroskopie voorberei om te bepaal of die mirasidioms wel die slakke binnegedring het.

Resultate en bespreking

In figuur 46 is 'n kontrolesporosist in agar sigbaar. Uit figure 47 en 48 is dit duidelik dat *S. mansoni* en *S. haematobium*-sporosiste in die voetgedeelte van die slakke in gedring het. Dit is dus duidelik dat die oppervlaktegument van die slak nie as 'n meganiese hindernis vir *S.*

mansoni (onverenigbare parasiet) optree nie. Dit kan dus nie as rede aangevoer word waarom *B. africanus* nie as tussengasheer vir *S. mansoni* optree nie.

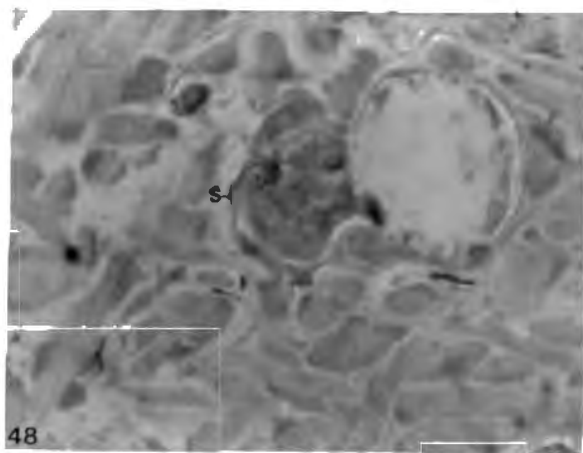
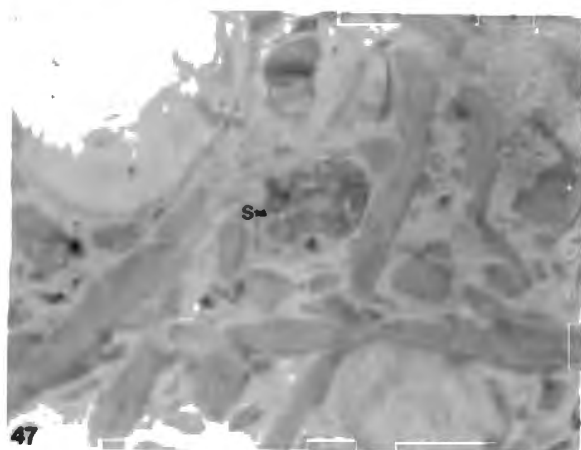
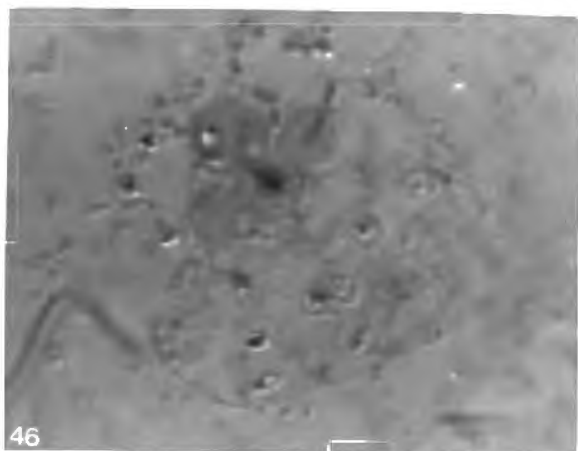
Herkenning en vernietiging van die onverenigbare parasiet vind hoogs waarskynlik *in vivo* deur die sellulêre immuunstelsel van hierdie slak plaas. Hierdie aspek sal verder ondersoek word.

Figuur 46. 'n Kontrole sporosist in agar ingebed wat die algemene morfologie aantoon.

Figure 47 en 48. 'n *S. mansoni* en *S. haematobium*-sporosist twee ure na penetrasie in die voet van 'n *B. africanus*-slak:

(47) *S. mansoni*

(48) *S. haematobium*.



6. SELLULêRE RESPONS VAN B. AFRICANUS

6.1. DIE INVLOED VAN GESELEKTEERDE ABIOTIESE FAKTORE OP DIE SELLULêRE RESPONS

Uit voorlopereksperimente het die werkswyse as sodanig, wat aangewend is om slakke aan mirasidiûms bloot te stel tot leukositose by die slakke aanleiding gegee. Die mees voor die hand liggende faktore wat tot hierdie respons aanleiding kon gee, was a) immobilisering van die slakke, b) 'n konsentrasie van slakekskresieprodukte en c) 'n afname in die suurstofkonsentrasie van die water tydens blootstelling. Die invloed van hierdie faktore is vervolgens eksperimenteel ondersoek.

Hierdie studie is uitgevoer met vier groepe van 20 slakke elk. Die gemiddelde massa van die vier groepe was $0,43 \pm 0,16g$; $0,44 \pm 0,20g$; $0,45 \pm 0,13g$ en $0,46 \pm 0,13g$.

Die invloed van die geselekteerde abiotiese faktore op die hemosiete is bepaal deur eerstens 'n kontroletelling van granulosiete en hialinosiete by elke slak, drie dae voor aanvang van die eksperiment, te doen. Die slakke was in al die gevalle tydens die driedaerperiode in goedbelugde akwariums aangehou.

Die effek van immobilisering op hemosietgetalle is bepaal deur 20 slakke van een groep, drie dae na die vasstelling van die kontrole-selgetalle, individueel in multi-selhouertjies met 'n grootte van 8 cm^3 vir twee ure te plaas. In hierdie eksperiment is die plastiekbodems van die multi-selhouertjies wat gebruik is met perlongaas met 'n maasgrootte van $375 \mu\text{m}$ vervang. Tydens die duur van die eksperiment was hierdie multiselhouertjies in goedbelugde akwariumwater op so 'n manier gesuspenseer dat slegs 1 ml water per slak beskikbaar was. Met hierdie eksperimentele opstelling is verseker dat die suurstofkonsentrasie konstant hoog gehou is, terwyl 'n konsentrering van slakekskresieprodukte

deur die sirkulering van water deur die akwarium beperk is. Na die twee-ureblootstellingsperiode is die hialinosiet- en granulosietgetal van elke slak weer afsonderlik bepaal.

Die effek van slakkekresieprodukte op die hemosietgetal is bepaal deur 100 slakke individueel in 1 ml gefiltreerde akwariumwater in 'n multiselhouer vir twee ure te laat. Die water nou slakgekondisioneer, is vervolgens na 'n 250 ml glasbeker oorgedra. Die tweede groep slakke wat reeds voor die bepaling van die kontrole-tellings op die skulp met 'n permanente pen gemerk was, is na die slakgekondisioneerde water oor geplaas. Die water is ook tydens die twee-ureblootstellingsperiode goed belug. Die belugting het voldoende suurstof voorsien terwyl die groter ruimte ook beweging van die slakke toegelaat het. Die granulosiet- en hialinosietgetal is ook na die twee-ureperiode weer bepaal.

In die eksperiment om te bepaal of suurstof 'n effek op die selgetalle het, is elk van die 20 slakke van die derde groep individueel vir 'n periode van twee ure in 100 ml gefiltreerde suurstofvrye akwariumwater gelaat. Suurstofvrye water is berei deur stikstof vir een uur voor die aanvang van die eksperiment deur die water te borrel en die suurstof af te dryf. Al die houers waarin die slakke vir die duur van die eksperiment aangehou is, was vir die volle duur van die eksperiment deeglik met parafilm verseël. Die ruimte tussen die water en die parafilm was ook deurentyd met stikstof versadig. Daar was dus gedurende die eksperiment geen suurstof vir die slak toeganklik nie. Die groot wattervolume het vrylike beweging van die slak toegelaat terwyl dit ook die nadelige invloed van akkumulerende ekresieprodukte beperk het. Die granulosiet- en hialinosietgetal is hierna net soos by die vorige eksperimente bepaal.

Die granulosiet- en hialinosietgetal van elke slak in die vierde groep is ook drie dae na die kontrole-tellings weer bepaal. In hierdie geval is die hemolimf van die slakke egter direk na verwydering uit die akwariums versamel en die selgetalle bepaal. Dit is gedoen as 'n kontrole om te verseker dat enige respons wat by die ander slakgroepe verkry

is wel deur die geselekteerde abiotiese faktore veroorsaak is en nie deur ander faktore soos byvoorbeeld slakhantering of hemolimfversameling nie.

Resultate en bespreking

Uit tabel 15 is dit duidelik dat 'n tekort aan suurstof die enigste van die geselekteerde abiotiese faktore was wat 'n betekenisvolle toename ($P < 0,05$) in beide die granulose- en hialinosekonsentrasie veroorsaak het. Die moontlikheid dat vlugtige stowwe in die slakekskresieprodukte soos ammoniak, wat deur belugting afgedryf word, ook 'n invloed op selgetal kon hê, kan nie uitgesluit word nie. Die bevinding dat suurstofkonsentrasie selgetalle beïnvloed, word deur Wolmarans en Yssel (1988a) gestaaf. Hierdie outeurs het by *B. glabrata* 'n tweevoudige toename in granulosegetal binne 40 minute gevind waartydens die aanvanklike suurstofkonsentrasie van 131 mmHg tot 91 mmHg gedaal het. In hierdie studie was die slakke egter vir twee ure in suurstoflose water gelaat en was daar 'n viervoudige toename in die granulosegetalle en 'n tweevoudige toename in die hialinosegetalle.

Ander faktore wat ook 'n toename in selgetal by varswaterslakke tot gevolg het, is infeksie met parasiete (Michelson, 1975 en Stumpf & Gilbertson, 1980), toename in temperatuur (Stumpf & Gilbertson, 1978), 'n toename in hartklooptempo (Feng, 1965) en meganiese stimulasie (Sminia, 1972).

Indien die meganiese hantering en bloedversameling in hierdie eksperiment wel tot 'n vermeerdering in die selgetalle aanleiding gegee het, was hierdie faktor konstant en het waarskynlik by al die slakkeksemplare dieselfde invloed uitgeoefen.

Die toename in selgetalle, wanneer *B. africanus* in suurstoflose water gelaat word, kan nie uit hierdie studie verklaar word nie. Dit is egter wel uit hierdie bevindinge duidelik dat die water waarin slakke aangehou word vir die duur van sellulêre responseksperimente goed belug moet word.

Tabel 15. Die granulosisiet- en hialinosietgetal per μ l hemolinf van *B. africanus* voor en na blootstelling aan suurstoflose water, slakgekondisioneerde water en immobiliseringstoestande

	Suurstoflose water	Slakgekondisioneerde water	Immobilisering
Gemiddelde slakmassa	0,46 \pm 0,13 g	0,44 \pm 0,20 g	0,45 \pm 0,13 g
Hialinosietgetal			
Voor blootstelling	27,1 \pm 25,3	20,7 \pm 15,9	15,2 \pm 12,3
Na blootstelling	43,6 \pm 19,0	17,2 \pm 9,6	12,6 \pm 5,4
P-waarde	P<0,05	P>0,05	P>0,05
Granulosietgetal			
Voor blootstelling	61,8 \pm 45,7	85,4 \pm 80,0	52,7 \pm 35,8
Na blootstelling	244,5 \pm 149,7	65,1 \pm 50,0	56,7 \pm 27,0
P-waarde	P<0,05	p>0,05	p>0,05

6.2. DIE INVLOED VAN SCHISTOSOOMINFEKSIE OP DIE GRANULOSIETRESPONS

Uit voorlopereksperimente met *B. africanus* is gevind dat slegs granulosisietgetalle 'n respons na infeksie met schistoomparasiete toon. Hierdie resultate steun die bevindinge van Harris (1975), Jeong & Heyneman (1976) en Krupa et al. (1977) by *B. glabrata*.

Na aanleiding van hierdie gegewens is a) die granulosisietrespons van *B. africanus* na infeksie met *S. haematobium* (verenigbare parasiet) en *S. mansoni* (onverenigbare parasiet), en b) die moontlikheid dat hierdie slakke na 'n eerste infeksie 'n geheuestelsel ten opsigte van hierdie

infeksie ontwikkel, bestudeer. Die moontlike verband tussen die granulosisrespons en die teenwoordigheid van 'n vreemde stof, in hierdie geval 'n onverenigbare parasiet, in die slak is ook bestudeer.

Drie groepe van 50 ongeïnfekteerde slakke elk wat in massa gewissel het van 0,1596-0,3679g is in hierdie studie gebruik. Die aantal granulosisiete per ul hemolmf is drie dae voor infeksie by elke slak bepaal. Twee van die slakgroepe is onderskeidelik aan vyf *S. mansoni* en *S. haematobium*-mirasidiums per slak blootgestel. Suurstof is tydens die blootstellingsperiode oor die oppervlak van die water geblaas om die invloed wat 'n dalende suurstofkonsentrasie op die granulosisrespons het, te elimineer. Die derde groep slakke het as kontrole gedien en is op dieselfde manier as die ander twee groepe behandel met die uitsondering dat hulle nie geïnfekteer is nie.

Na die twee-ureperiode is al die slakke se granulosisietgetalle weer afsonderlik bepaal. Die water waarin die slakke blootgestel was, is ook na die blootstellingstyd afsonderlik vir vryswemmende mirasidiums ondersoek om vas te stel of dit wel die slakke gepenetreer het. Die slakke is na die blootstellingstyd na akwariums oorgeplaas waar elke slak afsonderlik, soos reeds bespreek, aangehou is.

Die granulosisietgetal van elke slak in al drie die groepe is 7, 20 en 42 dae na infeksie weer bepaal. Hierdie tye is gekies aangesien Pitchford & Visser (1965) en Schutte (1973) onderskeidelik bepaal het dat *S. haematobium* en *S. mansoni*, by 'n temperatuur van 22°C in 'n verenigbare gasheer, direk na penetrasie primêre sporosiste vorm, vanaf dag 12 tot dag 20 sekondêre sporosiste begin vorm en serkarië na 30 dae afskei.

Na 42 dae is elke slak afsonderlik vir serkarië-afskeiding geëvalueer. In die *S. haematobium* geïnfekteerde slakgroep is slegs die granulosisietgetalle van die slakke wat serkarië afskei het in berekening gebring. In teenstelling hiermee het nie een van die slakke in die kontrolegroep of die *S. mansoni* geïnfekteerde groep serkarië

afgeskei nie en is die granulosisgetalle van al die slakke in hierdie groepe in berekening gebring.

Om die moontlikheid van 'n immunologiese geheue na te gaan is die slakgroepe 17 dae na voltooiing van die aanvanklike granulosisrespons-eksperiment weer geïnfekteer. Dieselfde eksperimentele werkwysse as met die aanvanklike infeksie is ook hier gevolg. Die granulosisgetalle is in hierdie geval 3 dae voor, 2 ure en 10 en 14 dae na infeksie weer bepaal.

Om die verband tussen die granulosisrespons en die teenwoordigheid van *S. mansoni*, 'n onverenigbare parasiet in *B. africanus* wat voortdurend as vreemde materiaal in die slak herken word, na te gaan, is 30 *B. africanus*-slakke elk aan 50 *S. mansoni*-mirasidiums blootgestel.

Aangesien *B. africanus* en *S. haematobium* 'n verenigbare gasheer-parasietkombinasie is, herken die slak die parasiet nie voortdurend as vreemd nie en is hierdie kombinasie nie in hierdie eksperiment gebruik nie.

Die blootstellingstyd en werkwysse van hierdie eksperiment was dieselfde as wat in die vorige eksperiment gebruik was.

Vyf slakke per keer uit die groep is onderskeidelik 2, 6, 12 en 24 ure en 7 en 14 dae na blootstelling vir twee ure in 1% waterige Nembutal genarkotiseer. Hierna is die kop-voetgedeelte van elke slak verwyder, vir ligmikroskopie voorberei en vir sporisistmateriaal ondersoek. Slegs die kop-voetgedeelte is ondersoek aangesien Schutte (1973) beweer dat *S. mansoni* tot op dag 14 na penetrasie steeds in die voet van 'n verenigbare slak teenwoordig was.

Resultate en bespreking

Slegs 20 van die slakke wat aan *S. haematobium*-mirasidiums blootgestel was, het serkarieë afgeskei en is net hulle granulosisgetalle as eksperimentele data gebruik.

Uit tabel 16 en figuur 49 is dit duidelik dat die granulosietgetal in beide die *S. haematobium* en *S. mansoni*-geïnfekteerde slakgroepe na infeksie afgeneem het terwyl geen verskil by die kontrolegroep waargeneem kon word nie. Die afname in granulosietgetal is 7 en 20 dae na infeksie waargeneem en verskil volgens die Studente-t-toets betekenisvol ($P < 0,05$) van die granulosietgetalle 3 dae voor besmetting (tabel 14). Geen betekenisvolle verskil ($P > 0,05$) kon tussen die granulosietgetalle drie dae voor en twee ure of 42 dae na infeksie gevind word nie.

Hierdie resultate bevestig die bevindinge van van der Knaap et al. (1982) wat 'n afname in die sirkulerende amoebosiete by *L. stagnalis* gevind het nadat dit met 'n verskeidenheid bakteriums ingespuut was. Na die aanvanklike afname tussen nul en vier ure na infeksie het die selle weer na 'n periode van 16 ure na normaal teruggekeer. Hierdie amoebosietstipe is hoogs waarskynlik funksioneel analoog met die granulosiete by *B. africanus*.

Die vermindering van die sirkulerende granulosiete in die hemolimf kan moontlik aan die feit dat die selle na die vreemde materiaal beweeg en dit vernietig, toegeskryf word. Die feit dat granulosiete wel vreemde materiaal deur enkapsulasie en fagositose vernietig, is reeds deur Harris (1975) Jeong & Heyneman (1976) en Krupa et al. (1977) beskryf.

In teenstelling met die resultate in hierdie ondersoek verkry, het Michelson (1975) en Stumpf & Gilbertson (1980) ongeveer 'n tweevoudige toename in die leukosietgetalle by *B. glabrata* onderskeidelik twee weke en twee ure na infeksie met *S. mansoni*, 'n verenigbare trematoodparasiet, gevind. Lie & Heyneman (1976) het egter geen verandering in die hemosietgetal by *B. glabrata* na infeksie met *Echinostoma lindoense* gevind nie. Hierdie resultate kan egter moontlik toegeskryf word aan ander faktore soos 'n lae suurstofkonsentrasie in die blootstellingswater (Wolmarans & Yssel, 1988a).

Na herinfeksie het al die slakke in die groep wat aan *S. haematobium*-mirasidioms herblootgestel was, afgesterf. Die granulosietgetalle van die groep wat aan *S. mansoni*-mirasidioms bloot-

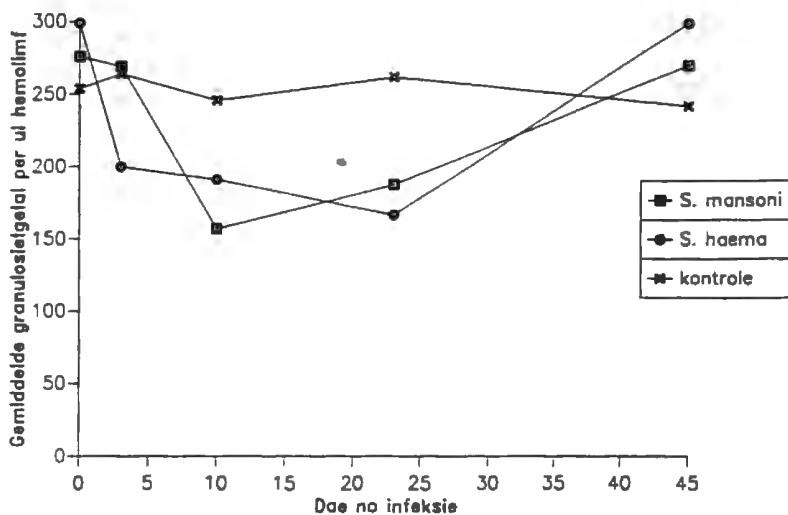
gestel was, het na 14 dae na die tweede infeksie nie meer betekenisvol ($P > 0,05$) van die getal drie dae voor besmetting verskil nie (tabel 16). Die granulosisgetalherstel was dus met die tweede infeksie vinniger as na die eerste infeksie (42 dae). Dieselfde tendens is deur van der Knaap et al (1977), by *L. stagnalis* na infeksie met verskillende bakteriespesies, gevind. Die vinniger herstel na die tweede infeksie kan moontlik die gevolg wees van 'n vinniger vernietigingsaksie van die sporosiste as gevolg van 'n geheuestelsel vir hierdie spesifieke parasiet. Indien dit wel die geval is, is hierdie stelsel by *B. africanus* vir ± 60 dae na die aanvanklike blootstelling nog effektief. In die geval van *B. glabrata* was die periode 7 dae (Lie & Heyneman, 1976), by *Helix*-spesies 30 dae (Bayne, 1983) en by *L. stagnalis* 32 dae (van der Knaap et al., 1983)

Die ondersoek wat uitgevoer is om te bepaal of 'n granulosisrespons slegs voorkom solank *S. mansoni*-sporosiste in die slak teenwoordig is, het getoon dat die sporosiste net tot 12 ure na blootstelling in die slakvoet waarneembaar was. Die verlaagde granulosisgetalle het egter eers tussen 20 tot 42 dae na infeksie na normaal teruggekeer.

Dit wil dus voorkom of die herstelfase van die granulosisgetalle vir geruime tyd nadat die parasiet geëlimineer is nog plaasvind.

Tabel 16. Die gemiddelde granulosietgetal per μ l hemolimf by *B. africanus*-slakke wat onderskeidelik aan vyf *S. haematobium* en vyf *S. mansoni* mirasidioms per slak blootgestel was.

Tyd van granulosiet bepaling	Slakke met <i>S. haematobium</i> geïnfekteer	Slakke met <i>S. mansoni</i> geïnfekteer	Kontrole slakke
3 dae voor infeksie	299±300	276±249	254±118
2 ure na infeksie	200±191	269±266	264±137
7 dae na infeksie	191±182	157±142	246±135
20 dae na infeksie	167±205	188±173	262±128
42 dae na infeksie	299±317	270±235	242±117
		Tweede infeksie	
14 dae na einde van eerste eksperiment		302±312	
2 ure na tweede infeksie		364±362	
10 dae na tweede infeksie		175±135	
14 dae na tweede infeksie		244±194	



Figuur 49. Die gemiddelde *B. africanus*-granulosietgetal per μ l hemolimf na infeksie met 'n verenigbare (*S. haematobium*) en 'n onverenigbare (*S. mansoni*) parasiet.

7. GEVOLGTREKKINGS

In hierdie studie het dit aan die lig gekom dat *B. africanus*-hemosiete op grond van hulle uitwendige morfologie in hialinosiete en granulosiete verdeel kan word. Slegs die granulosiete ondergaan morfologiese veranderinge en vorm filopodia en lamellipodia wanneer hulle met 'n glasoppervlak in aanraking kom. Serum is nie vir die vorming van hierdie strukture noodsaaklik nie.

Geen verband kon tussen beide die hialinosiet- en granulosietgrootte en slakmassa aangetoon word nie. 'n Direkte verband tussen die granulosiet- en hialinosietgetalle en slakmassa is wel gevind.

Wat granulosietsubpopulasies betref, kon daar nie, deur van lektiene geïsoleer uit *G. max*, *R. communis*, *T. vulgaris* en *C. ensiformis* gebruik te maak, verskillende subpopulasies onderskei word nie.

Uit die ondersoek om die funksionele aspekte van die sellulêre immuunstelsel van *B. africanus* op te klaar, is gevind dat granulosiete in vitro by fagositose en enkapsulasie van vreemde stowwe, betrokke is. Die rol van die hialinosiete by die sellulêre verdedigingsaspek is egter nog onbekend aangesien die selle in geen geval in kontak met vreemde stowwe waargeneem is nie. Dit blyk verder uit die resultate dat daar wel moontlik humorale faktore by die interneverdedigingsmeganisme van die slak betrokke is. Hemagglutinien kon egter nie in hierdie studie as 'n sodanige faktor geïdentifiseer word nie.

Wat penetrasiestudies betref, kan ^{51}Cr 'n gammastralende-isotoop nie as 'n radioaktiewe merker gebruik word om mirasidium-penetrasie in 'n tussengasheer te bevestig nie. Histologiese studies van die slakvoet het wel aangetoon dat beide die verenigbare en onverenigbare parasiete die gasheer binnegedring het.

In studies om die invloed van suurstoflose water, slakgekondisioneerde water en immobiliseeringstoestande op die sirkulerende hemosietgetalle na te gaan, is gevind dat die afwesigheid van suurstof in water die enigste getoetste abiotiese faktor is wat leukositose by *B. africanus* tot gevolg gehad het.

Infeksie van die slak met 'n verenigbare en onverenigbare parasiet het tot 'n afname in granulosietgetalle tussen 7 en 20 dae na besmetting aanleiding gegee. Herstel van granulosietgetalle na normaal het eers na 42 dae plaasgevind. 'n Tweede infeksie met 'n onverenigbare parasiet 60 dae na die eerste infeksie het die granulosietgetalle weer laat afneem maar dit het reeds na 14 dae na normaal teruggekeer. Daar bestaan dus 'n moontlikheid van 'n geheuemeganisme by hierdie slakspesie.

8. BEDANKINGS

By voltooiing van hierdie studie wil ek my dank en waardering teenoor die volgende persone en instansies uitspreek :

- Dr. C.T. Wolmarans, my studieleier, vir sy positiewe leiding, advies en aanmoediging wat te alle tye tot my beskikking was,
- Prof. G.C. Loots, my hulpstudieleier, vir sy onbaatsugtige hulp en advies wat tot my beskikking was,
- Prof. A.J. Reinecke, die departementshoof, vir sy belangstelling,
- Dr. K.N. de Kock, vir die lees van die manuskrip, sy advies en belangstelling tydens die studie,
- Dr. V.L. Hamilton-Attwell vir die advies en hulp met die neem van die SEM-mikrograwe,
- Mnr. L. Tiedt vir die advies met die neem van die TEM-mikrograwe,
- Mnr. J. Geldenhuys vir die ontwikkeling van die mikrograwe en die fotoplate gebruik vir hierdie verhandeling,
- Prof. H.S. Steyn van die Statistiese Konsultasiedienste, vir sy bydrae gelewer met die statistiese verwerking en interpretasie van die data,
- die WNNR, PU vir CHO en SAMNR vir finansiële steun en beskikbaarstelling van apparaat,
- Mev. H. Haasbroek vir die taalversorging van die abstract.

- Prof. P.A.J. Ryke vir sy hulp met die taagebruik in die verhandeling,
- al my kollegas en vriende vir hul belangstelling, aanmoediging en hulp gedurende die studie,
- my familie, in besonder my ouers en broer, vir hulle belangstelling, aanmoediging en gebede regdeur my studie jare.

9. LITERATUURLYS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. 1983. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing. 1146 p.

ANDERSON, R.S. & GOOD, R.A. 1976. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27:57-64.

BASCH, P.F. & DICONZA, J.J. 1974. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. *Journal of Parasitology*, 60(6):935-941.

BAYNE, C.J. 1983. Molluscan immunobiology. (In Saleuddin, A.S.M. & Wilbur, K.M. eds. *Biology of Mollusca*. New York: Academic Press. 407-486 p.)

BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. 1980. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *Journal of Parasitology*, 66(3):413-419.

BOYDE, A. & BOYDE, S. 1980. Further studies of specimen volume changes during processing for SEM: including plant tissue. *SEM*, 2:117-124.

BULLOCK, G.R. 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. *Journal of Microscopy*, 133:1-15.

CHENG, T.C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Annals of the New York Academy of Science*, 266:343-379.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & TAYLOR, R. 1976. *Scistosoma mansoni* in baboons: antibody-dependent cell-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula. *Clinical Experimental Immunology*, 25:95-102.

CHENG, T.C. & AULD, K.R. 1977. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30:119-122.

COERTZE, D.J. & VAN AARDT, W.J. 1978. 'n Vinnige en betroubare metode om ²²Na-uitfluks in varswaterslakke te bepaal. (Wetenskaplike Bydraes van die PU vir CHO Natuurwetenskappe, 97(B)).

DE KOCK, K.N. 1973. Die bevolkingsdinamika van vyf medies en veeartsenykundig belangrike varswaterslakspesies onder toestande van beheerde temperatuur. Potchefstroom. 388p. (Proefskrif (D.Sc.)-PU vir CHO.)

DE KOCK, K.N. & VAN EEDEN, J.A. 1981. Life table studies on freshwater snails: the effect of constant temperature on the population dynamics of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss). *Wetenskaplike bydraes van die PU vir CHO Natuurwetenskappe*, 107(B):17.

DE KOCK, K.N. & VAN EEDEN, J.A. 1986. Effect of programmed circadian temperature fluctuations on population dynamics of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss). *South African Journal for Zoology*, 21(1):28-32.

DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W.P.W., MAASKANT, J.J. & DE JONGE, A.J.R. 1985. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnaea stagnalis*: a characterization using monoclonal antibodies. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71:815-819.

DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W.P.W., MEULEMAN, E.A. & SMINIA, T. 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult

specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research*, 238:43-47.

DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W.P.W., MEULEMAN, E.A. & SMINIA, T. 1985. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, 55:547-553.

FENG, S.Y. 1965. Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biological Bulletin*, 128:198-210.

FRANK, G.H. 1963. Some factors affecting the fecundity of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss) in glass aquaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 29:531-537.

GARCIA, A., LOZANO, M.T. & AGULLEIRA, B. 1987. Endocrine pancreas of *LESTUDO GRAENCE* L. (*Chelonia*) in summer and winter: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Genetic and Comparative Endocrinology*, 68:235-248.

HARRIS, K.R. 1975. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of the New York Academy of Science*, 266:446-464.

JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. 1976. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28:357-362.

JORDAAN, E.M. 1984. Die interaksie tussen mielietseleaalwurms, *Prathylenchus* spp. en wortelvrotfungusse, *Fusarium moniliforme* en *Drechslera zeicola*. Potchefstroom. 128 p. (Verhandeling (M.Sc.)-PU vir CHO.)

KRUPA, P.L., LEWIS, L.M. & DEL VECCHIO, P. 1977. *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guernei* electron microscopy of hemocyte-sporocyst interactions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30:35-45.

LEVER, J. & BEKIUS, R. 1965. On the presence of an external hemal pore in *Lymnaea stagnalis*(L). *Experientia*, 21:1-4.

LIE, K.L. & HEYNEMAN, D. 1976. Studies on resistance in snails: 5, tissue reactions to *Echinostoma lindoense* in naturally resistant *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 62:292-297.

LILLIE, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 715 p.

LOKER, E.S., BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & KRUSE, K.T. 1982. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology*, 68(1):84-94.

MICHELSON, E.H. 1975. Cellular defence mechanisms and tissue alterations in gastropod molluscs. (In Marainorosh, K. & Shope, R.E., eds. *Invertebrate immunity*. New York: Academic Press. p. 181-195.)

OLIVER-GONZÁLEZ, J. & VÁZQUEZ, G.J. 1983. Preservation of *Schistosoma mansoni* eggs and of infected livers as a source of eggs for the circumoval precipitin test. *Journal of Parasitology*, 69(2):277-279.

PITCHFORD, R.J. & VISSER, P.S. 1965. Some further observations on schistosome transmission in the Eastern Transvaal. *Bulletin of the World Health Organization*, 32:83-104.

PRAH, S.K. & JAMES, C. 1977. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* I: effect of temperature and ultra-violet light. *Journal of Helminthology*, 51:73-85.

RENWRANTZ, L.R. & CHENG, T.C. 1977. Identification of agglutinin receptors on hemocytes of *Helix pomatia*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29:88-96.

SCHOENBERG, D.A. & CHENG, T.C. 1980. Lectinbinding specificities of hemocytes from two strains of *Biomphalaria glabrata* as determined by microhemadsorption assays. *Developmental and Comparative Immunology*, 4:617-628.

SCHUTTE, C.H.J. 1973. Intra-molluscan life-cycle of *Schistosoma mansoni*. Potchefstroom. 203p. (Proefskrif (D.Sc.)-PU vir CHO.)

SMINIA, T. 1972. Structures and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 130:497-526.

SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W. 1981. The internal defence system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 5:87-97.

SMINIA, T. VAN DER KNAAP, W.P.W. & EDELENBOSCH, P. 1979. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 3:37-44.

SPURR, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*, 26:31-43.

STUMPF, J.L. & GILBERTSON, D.E. 1978. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factors affecting variability. *Journal of Invertebrate Pathology*, 32:177-181.

STUMPF, J.L. & GILBERTSON, D.E. 1980. Differential leukocytic responses of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35:217-218.

VAN AARDT, W.J. & FREY, B.J. 1981. Oxygen-binding characteristics of the hemolymph of the freshwater snail *Bulinus (Physopsis) globosus*. *South African Journal of Zoology*, 16(1):1-4.

VAN AARDT, W.J. & WOLMARANS, C.T. 1981. Evidence for nonassimilation of *Chlorella* by the African freshwater snail *Bulinus (Physopsis) globosus*. *South African Journal of Science*, 77:319-320.

VAN DER KNAAP, W.P.W., BOOTS, A.M.H., VAN ASSELT, L.A. & SMINIA, T. 1983. Specificity and memory in increased defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 7:435-443.

VAN DER KNAAP, W.P.W., SMINIA, T., KROESE, F.G.M. & DIKKE-BOOM, R. 1981. Elimination of bacteria from the circulation of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 5:21-32.

VAN DER KNAAP, W.P.W., TENSEN, C.P., KROESE, F.G.M. & BOERRIGTER-BARENSEN, L.H. 1982. Adaptive defence reactions against bacteria and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 6:775-780.

VISSER, P.S. & PITCHFORD, R.J. 1972. A simple apparatus for the rapid recovery of helminth eggs from excreta with special reference to *Schistosoma mansoni*. *South African Medical Journal*, 46(16):1344-1346.

WOLMARANS, C.T. 1984. Die opname en verspreiding van CuSO_4 by *Bulinus (Bulinus) tropicus*. Potchefstroom. 146p. (Proefskrif (D.Sc.)-PU vir CHO.)

WOLMARANS, C.T. & YSSEL, E. 1988a. *Biomphalaria glabrata*: influence of selected abiotic factors on leukocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 51:10-14.

WOLMARANS, C.T. & YSSEL, E. 1988b. The use of SEM and lectins to study *Bulinus africanus* leucocytes and their in vitro behaviour. (In druk in *Journal of Invertebrate Pathology*)

YSSEL, E. & WOLMARANS, C.T. 1988. Factors influencing the leukocyte concentration of the freshwater snail *Bulinus africanus* (In druk in *Journal of Invertebrate Pathology*.)

YOSHINO, T.P. 1981. Comparison of concanavalin-A reactive determinants on hemocytes of two *Biomphalaria glabrata* snail stocks: receptor binding and redistribution. *Developmental and Comparative Immunology*, 5:229-239.

YOSHINO, T.P. & GRANATH, W.O. 1985. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45:174-186.