

**POPULATIONSDYNAMIK DER FILARIE**  
***ONCHOCERCA OCHENGI* (NEMATODA, FILARIOIDEA)**  
**IN AFRIKANISCHEN RINDERN**

**Diplomarbeit**

der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

vorgelegt von

**Volker Bley**

Tübingen, Juni 1995

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Diplomarbeit  
selbst verfaßt habe und keine anderen als  
die angegebenen Hilfsmittel und Quellen  
benutzt habe.

Tübingen, den 1.6.1995

---

## Danksagung

Herr Priv.-Doz. Dr. Alfons Renz ermöglichte und unterstützte jederzeit und allerorts auf sehr offene und menschliche Art diese Arbeit.

Herr Prof. Dr. Hartwig Schulz-Key war gegenüber neuen Ideen stets aufgeschlossen und übernahm freundlicherweise das Zweitgutachten.

Die Arbeiten vor Ort wurden von Herrn Dr. Daniel Achu-Kwi durch seine ständige Bereitschaft, geplante Untersuchungen zu koordinieren und aktiv mitzugestalten, sehr erleichtert.

Herr Dr. Vincent Tanja, Direktor des IRZV Wakwa, und Frau Celine Jiwoua, von der Universität Ngaoundéré, ermöglichten die Arbeit in ihren Laboratorien.

Während und nach der Arbeit teilte Herr cand. biol. Tobias Hildebrandt mit mir die vielen Erfahrungen in einer anderen Kultur.

Herr David Ekale verschönte mit viel Humor die Feld- und Laborarbeiten.

Für die vorzügliche Umsorgung bedanke ich mich bei den Herren Joseph, Luther und Nana.

Die Herren Iya und Abbo übernahmen (für hier nicht aufgeführte Versuche) den Mückenfang.

Alle Mitarbeiter des Tropeninstituts, die mich während meines Studiums begleiteten, hatten durch die ständige Hilfsbereitschaft großen Anteil an der sehr guten Atmosphäre im Institut.

Die Arbeit wurde von der Tübinger Stipendienstiftung, der Alfred-Gottschalk-Stiftung und der Kommission der Europäischen Gemeinschaften (Projekt TS-3\*CT 92-0056) finanziell unterstützt.

## **Inhaltsverzeichnis:**

**Seite**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Untersuchungsort und Rinder</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Altersbestimmung der Rinder</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind</b>	<b>5</b>
2.3.1. Bestimmung der Gesamtknotenlast pro Rind	5
2.3.2. Knotenentnahme	5
2.3.3. Bestimmung der Hautmikrofilariendichte	6
2.3.4. Knotenverdau	6
2.3.5. Isolation der Adultwürmer und Gewinnung des Knoteninhalts	6
2.3.6. Embryogramme der aus den Knoten isolierten Weibchen	7
2.3.7. Lichtmikroskopische Untersuchung des Knoteninhalts	8
2.3.8. Kontrollansatz	8
2.3.9. Beurteilung der Vitalität der Mikrofilarien	9
<b>2.4. Abbau von Hautmikrofilarien durch immunkompetente Zellen des Wirts im Inkubationstest</b>	<b>10</b>
2.4.1. Gewinnung von Hautmikrofilarien	10
2.4.2. Blutentnahme	10
2.4.3. Isolation von Serum und Immunzellen aus dem Rinderblut	11
2.4.4. Beurteilung der inkubierten Mikrofilarien	12
<b>2.5. Statistische Auswertung</b>	<b>13</b>

<b><u>Inhaltsverzeichnis:</u></b>	<b>Seite</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind</b>	<b>15</b>
3.1.1. Fertilität der Weibchen	15
3.1.2. Produktivität der Weibchen	15
3.1.3. Altersabhängige Knotenlast und Mikrofilariendichte in der Haut	15
3.1.4. Beobachtung stark veränderter Mikrofilarien im Knoten	17
3.1.5. Anteil der degenerierten freien Mikrofilarien im Knoten	18
3.1.6. Korrelation von Alter und Knotenlast	19
3.1.7. Umsatz der Mikrofilarien im Rind	20
<b>3.2. Abbau von Hautmikrofilarien durch immunkompetente Zellen des Wirts im Inkubationstest</b>	<b>25</b>
3.2.1. Inkubationstest	25
3.2.2. Einfluß des Alters der Rinder auf die Vitalität der Mikrofilarien	26
<b>4. Diskussion</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Abbau von Mikrofilarien im Inkubationstest</b>	<b>31</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>32</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>33</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>34</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>40</b>

## 1. Einleitung

Die Gattung *Onchocerca* (Filarioidea, Nematoda) umfaßt Nematoden mit parasitischer Lebensweise im Wirbeltier, deren indirekte Entwicklung einen blut- oder lymphsaugenden Arthropoden erfordert. Die einzige für die Humanmedizin bedeutsame Art ist *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893), Erreger der Flußblindheit (Onchozerkose).

Die strenge Wirtsspezifität von *O. volvulus* beschränkt das Vorkommen der reproduktionsfähigen Adultwürmer auf den Menschen, mit Ausnahme von Infestationen beim Gorilla und experimentell bei Schimpansen (VAN DEN BERGHE 1941, DUKE 1980). Tierische Reservoirwirte wurden bisher nicht gefunden. Bei der Onchozerkose handelt es sich daher um eine echte Anthroponose.

Alle anderen Vertreter der Gattung *Onchocerca* haben Huftiere (Ungulata) als Endwirte (BAIN 1981, SCHULZ-KEY *et. al.* 1993). In Rindern (Bovinae) sind bislang neun Arten beschrieben worden:

Art und Vorkommen	Sitz der Adultwürmer	Vektor	Zitat
<i>O. sweetae</i> Asien und Australien	Intradermale Knoten	blutsaugender Arthropode?	SPRATT & MOORHOUSE 1971
<i>O. gibsoni</i> Australien	Subkutane Bindegewebsknoten	Ceratopogonidae	BAIN & BEVERIDGE 1979
<i>O. stilesi</i> Nordamerika	Bindegewebe des Kniegelenks	Ceratopogonidae	EBERHARD 1979
<i>O. linealis</i> Nordamerika und Europa	Milzband und Bindegewebe der Fußgelenke	Simulium ornatum	ZAHNER & SCHULZ-KEY 1990
<i>O. gutturosa</i> Nordamerika, Europa und Afrika	Nackenband / Bindegewebe von Knie und Fersengelenk	Culicoides spec.	NEUMANN 1910
<i>O. armillata</i> Europa und Afrika	Aortenwand	blutsaugender Arthropode?	RAILLIET & HENRY 1910
<i>O. denkei</i> Afrika	Subkutane Bindegewebsknoten	blutsaugender Arthropode?	BAIN, VASSILIADES & DELBOVE 1982
<i>O. dukei</i> Afrika	Bindegewebsknoten der thorakalen Muskelfaszien	Simulium bovis	BAIN <i>et al.</i> 1974
<i>O. ochengi</i> Afrika	intradermale Bindegewebsknoten der Haut	Simulium damnosum s.l.	BWANGAMOI 1969

In Nordkamerun sind vier Arten im Rind (*Bos indicus*) endemisch (WAHL & RENZ 1989, WAHL *et al.* 1994) :

*O. armillata*, *O. gutturosa*, *O. ochengi* und *O. dukei*.

*O. ochengi* ist die mit *O. volvulus* am engsten verwandte Art (BAIN 1981). Die weiblichen Adultwürmer sitzen in bindegewebigen Knoten, welche sie nicht verlassen.

Im Adamawa-Hochland - einem für beide Parasitosen endemischen Gebiet in Nordkamerun - werden die Dritten Larven (infektiöse L3) von Kriebelmücken des Artenkomplexes *Simulium damnosum* Theobald, 1903, übertragen (RENZ *et al.* 1989, SCHIBEL & RENZ 1990).

Dort gehören 30-90% aller im Vektor gefundenen L3 zu *O. ochengi*. Demnach ist die Vektorkapazität für *O. volvulus* stark verringert und eine gegenseitige Beeinflussung der Epidemiologie nachgewiesen (WAHL 1991, RENZ *et al.* 1994).

Die Dritten Larven beider Arten lösen im Menschen eine Immunantwort aus, die durch "kreuzreaktive Antigene" vermittelt wird (HOCH *et al.* 1993) und bei der Entstehung von erworbener Immunität (acquired immunity) gegen die Onchozerkose eine Rolle spielen könnten (Renz *et al.* 1994).

Die Rinderparasitose ist nicht nur zur Klärung quantitativer parasitologischer Fragestellungen geeignet, sondern auch im Hinblick auf die Interaktionen der beiden Filarienarten als Grundlage der Vakzineforschung oder als Screeningmodell für Filarizide von Interesse (RENZ *et al.* 1995).

Untersuchungen der Adultwurmpopulation im Rind ergaben einen konstanten Anstieg der Knotenlast bei gleichbleibender Vektorexposition (TREES *et al.* 1992, ACHU-KWI 1994, RENZ *et al.* 1994). Die meisten Knoten liegen im Inguinalbereich der Rinder (DAIBER 1993). Trotz auffälliger Adultwurmzahl von mehreren hundert Knoten pro Rind zeigen sich keine pathologischen Erscheinungen, was auf eine gute Anpassung des Parasiten schließen läßt.

Im Knoten befindet sich ein einziges aufgeknäueltes Weibchen, welches eng mit einer unterschiedlichen Anzahl von Männchen vergesellschaftet sein kann. Im Durchschnitt kommt auf einen Knoten ebenfalls nur ein Männchen (WAHL *et al.* 1994, SCHULZ-KEY *et al.* 1993).

Im Gegensatz zu *O. ochengi* sitzen die weiblichen Adultwürmer von *O. volvulus* zu mehreren (bis über 25) im knotenartigen Granulom (Onchozerkom) und werden dort von zahlreichen Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und ein- bzw. mehrkernigen Makrophagen umgeben. Die Würmer werden offenbar von aktivierten Makrophagen angegriffen, für die ein hoher Gehalt an lysosomalen Enzymen (unspezifische Esterase, saure und alkalische Phosphatase) charakteristisch ist. Die mehr am Knotenrand gelegenen Makrophagen mit niedrigem Gehalt an saurer Phosphatase und HLA-DR-Expression spielen demgegenüber bei der Prozeßierung und Präsentation von Antigenen eine Rolle. Diese Annahme wird durch das gehäufte Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen am Knotenrand bestätigt. Auch in Adultwurmnähe, wo die Antigenkonzentration sehr hoch ist, können Antigene von einigen HLA-DR-exprimierenden Makrophagen verarbeitet werden. Demnach entsteht durch das mehr oder weniger abgegrenzte Vorkommen verschiedener Subklassen eine Zonierung innerhalb des Knotens (GATRILL *et al.* 1987).

Nach Befruchtung und Embryogenese setzen die viviparen Weibchen die als "Mikrofilarien" bezeichneten Ersten Larvenstadien frei, welche sofort mit der immunzellhaltigen Umgebung konfrontiert werden. In den Onchozerkosen von *O. volvulus* werden die Mikrofilarien von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie Makrophagen angegriffen und abgebaut. Die Stärke des Abbaus scheint von der Immunlage des Wirts abhängig zu sein (BÜTTNER & RÁCZ 1983).

Die mit dem Alter der exponierten Rinder stetig ansteigende Knotenlast, d.h. die anhaltende Zunahme mikrofilarienproduzierender Würmer im Rind, muß jedoch nicht immer zur Erhöhung der Hautmikrofilariendichte führen. Bei einigen über 5 Jahre alten, "immunen" Rindern mit hoher Knotenlast wurden - trotz unveränderter Reproduktionsrate der Wurmweibchen - gleichbleibende Mikrofilariendichten in der Haut festgestellt (WAHL *et al.* 1994). Demzufolge muß in diesen Rindern in Haut oder Knoten ein verstärkter Abbau von Mikrofilarien stattfinden. Dabei könnte es sich um eine Prämunitio (Concomitant Immunity) handeln, welche den Wirtsorganismus vor übermäßigen Mikrofilarienlasten schützt. Andere ("suszeptible") Rinder zeichnen sich - im Gegensatz zu den "immunen" Rindern - durch eine relativ zur Knotenlast hohe Mikrofilariendichte aus.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Mikrofilarien schon im Knoten oder erst in der Haut abgebaut werden. Dazu wurde die Anzahl der Embryonen im Weibchen, sowie die Zahl der Mikrofilarien im Knoten und in der Haut ermittelt. Von besonderem Interesse sind Rinder, bei denen trotz hoher Knotenlast eine relativ geringe Mikrofilariendichte in der Haut gefunden wurde ("immune" Rinder).

Im Inkubationstest wird der *in vitro*-Abbau von *O. ochengi*-Mikrofilarien verfolgt. Dazu werden Hautmikrofilarien mit Immunzellen / Seren alter und junger Rinder inkubiert und deren Motilität und Degeneration mit Mikrofilarien in RPMI-Medium mit bzw. ohne Normalserum verglichen.

Letztendlich sollen die Daten dazu dienen, den Massenwechsel der *O. ochengi*-Mikrofilarien in "suszeptiblen", "normalen" und "immunen" Rindern abzuschätzen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsort und Rinder

Am städtischen Schlachthof von Ngaoundéré, Hauptstadt der Adamawa-Provinz in Nordkamerun (Guinea-Savanne), werden überwiegend Rinder der lokalen Goudali-Rasse (Kurzhorn-Zebus) geschlachtet. Diese Rinder sind mit einer Prävalenz von ca. 51% mit *O. ochengi* befallen (WAHL 1991). Ein Befall mit *O. gutturosa*, *O. armillata* oder Mischinfestation ist ebenfalls häufig anzutreffen.

Akou-Rinder (Langhorn-Zebus) sind seltener im Schlachthof zu finden. Rinder dieser Rasse stammen meist aus der nördlichen Sudansavanne (dortige *O. ochengi*-Prävalenz: 83%) und können zusätzlich mit *O. dukei* infestiert sein (WAHL 1991).

Alle 14 Rinder, die zur Gewinnung von Immunzellen für den Inkubationstest verwendet wurden, gehörten der Goudali-Rasse an. Die beiden älteren Rinder stammten aus einer Herde des IRZV in Wakwa, ca. 11 km südöstlich von Ngaoundéré. Die 12 jungen Rinder gehörten zum Weidevieh der Ranch Dawa, ca. 30 km südöstlich von Ngaoundéré.

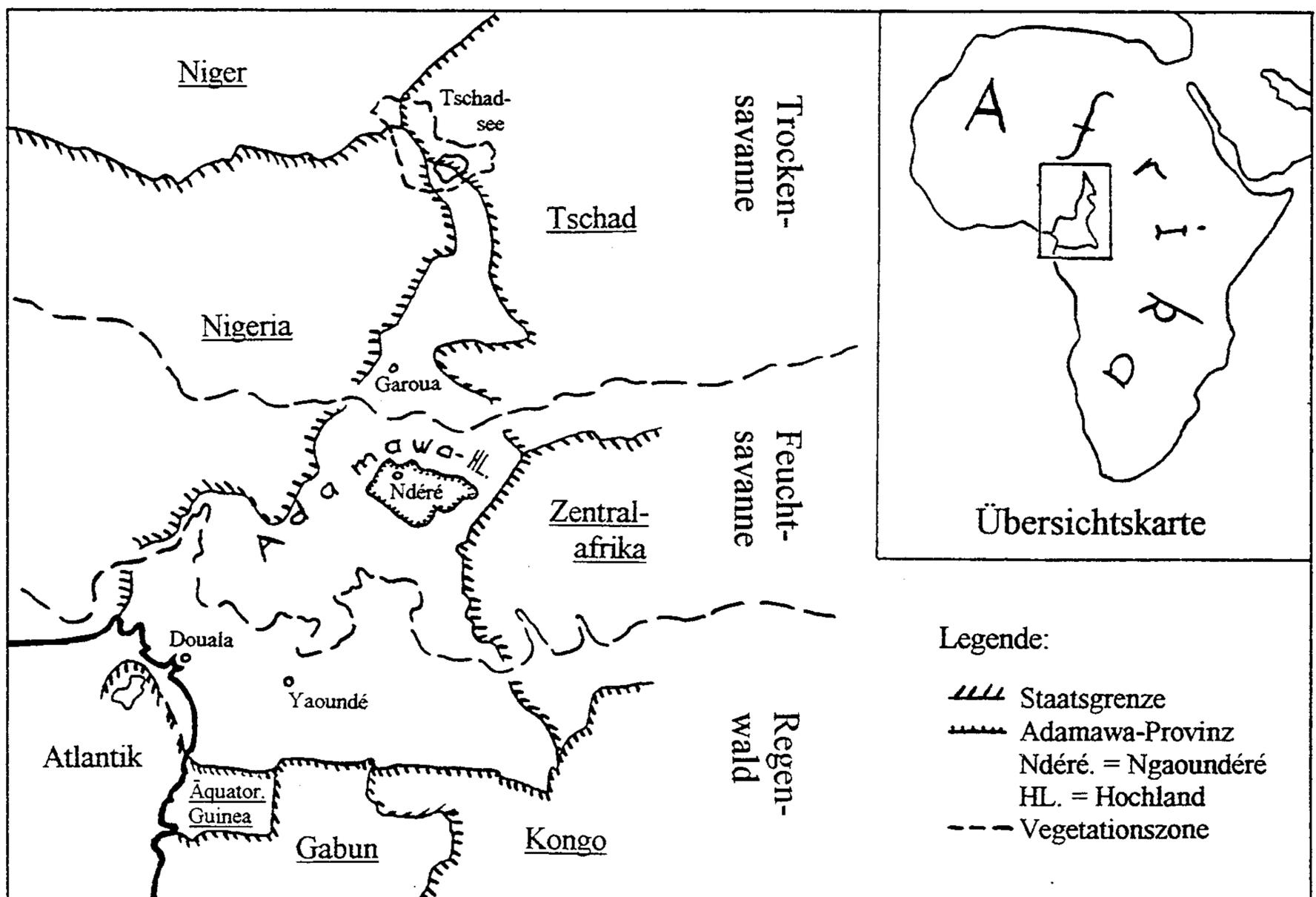


Abb. 1: Untersuchungsgebiet in Kamerun

## 2.2. Altersbestimmung der Rinder

Am Schlachthof wurde das Alter der Rinder nach der Zahnformel, dem Zahnabrieb und der Zahnstellung bestimmt (nach PAUVAUX 1988, vgl. Anhang Tabelle 12 und HILDEBRANDT 1995).

Von den im Inkubationstest verwendeten Tieren waren genaue Daten über Knotenlast, Hautmikrofilariendichte und Alter bekannt und wurden uns freundlicher Weise von Dr. D. Achu-Kwi (IRZV, Wakwa) zur Verfügung gestellt (siehe Anhang Tabelle 10).

## 2.3. Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind

### 2.3.1. Bestimmung der Gesamtknotenlast pro Rind

Die Onchozerkome lassen sich palpieren, nachdem das Fell vom Rind abgezogen war. Die Innenseite der Haut wurde mit den Fingern abgetastet und auf in der Haut verschiebbare Gewebeknoten untersucht. Oft traten die Knoten als gut sichtbare, rundliche Erhebungen an der Hautinnenseite hervor. Gewebeknoten, deren Genese durch Tasten nicht eindeutig auf *O. ochengi* zurückzuführen war, wurden durch Anschnitt und Auspressen des Inhalts eindeutig klassifiziert. Im Fall eines *O. ochengi*-Knotens erschien nach Ausquetschen der adulte weibliche Wurm zusammen mit einer gelblichen, zähflüssigen Immunsuspension. Dagegen trat nach Ausdrücken einer Demodexzyste ein milbenhaltiges, gelbliches Sekret zutage. (Demodexmilben verursachen knotenartige Entzündungen der Haarbalgdrüsen).

Außerdem besteht eine Verwechslungsmöglichkeit mit Entzündungen der Haut, welche durch Zeckenbisse hervorgerufen werden. Diese Hautveränderungen sind jedoch weder scharf umgrenzt, noch innerhalb der Haut verschiebbar. Durch die Palpation der lebenden Rinder werden ca. 50% (DAIBER 1993), bei der Palpation des abgezogenen Fells circa 70% der Gesamtknotenlast erfaßt.

### 2.3.2. Knotenentnahme

Aus den Fellen von Rindern, welche mit *O. ochengi* befallen waren, wurden in den Monaten Juni und Juli (in der Mitte der Regenzeit) knotenhaltige Hautstücke herausgeschnitten. Da die Felle an die Gerberei in Garoua (ca. 300 km nördlich von Ngaoundéré) verkauft werden, war es nur möglich, kleinere Hautstücke vom Rand des Fells (entlang der ventralen Mittellinie) abzuschneiden. Daher konnten nur einige der pro Rind vorhandenen Knoten untersucht werden. Im Labor wurden die intradermalen *O. ochengi*-Knoten mit dem Skalpell aus den Hautstücken isoliert und das Bindegewebe soweit wie möglich entfernt, ohne die Onchozerkome dabei anzuschneiden ("Trimmen" der Knoten).

### 2.3.3. Bestimmung der Hautmikrofilariendichte

Zwischen Euter/Scrotum und Nabel wurden drei Hautbiopsien genommen. Mit dem Skalpell wurden tangential möglichst dünne, zwischen 10 und 20 mg schwere Schnitte der äußersten Hautschichten gewonnen. Die sechsstündige Inkubation der einzeln abgewogenen Schnitte fand in separaten Gefäßen bei 36° C in RPMI-1640-Medium statt. Anschließend wurden die Biopsien in frisches RPMI-1640-Medium überführt, in dem sie für weitere 18 Stunden bei 36° C verblieben. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Snips 24 Stunden bei 36° C in Kollagenaselösung verdaut (SCHULZ-KEY 1978).

Die Konzentrationen der zugefügten Antibiotika waren in RPMI-Medium und Kollagenaselösung gleich (Zusammensetzung der Lösung siehe Kapitel 2.3.4.).

Die Artzugehörigkeit der bei Inkubation und Verdau ausgewanderten Mikrofilarien wurde unter der Binokularlupe bei 25- bis 50-facher Vergrößerung bestimmt. Aus Mikrofilariengesamtzahl einer Art und Gewicht der Biopsie errechnet sich die Mikrofilarienzahl pro mg.

### 2.3.4. Knotenverdau

Die für den Verdau eingesetzte Kollagenaselösung enthielt 0,5% Kollagenase in RPMI-Medium, 2 g/l Natrium Bikarbonat und 5,94 g/l HEPES-Puffer, unter Zusatz von 50 Einheiten Penicillin und 50 µg Streptomycin pro ml Lösung.

Die noch nicht angeschnittenen und fertig getrimmten Knoten wurden gewogen und mit 0,5 ml Kollagenaselösung bei 36° C ca. 7 Stunden lang inkubiert.

### 2.3.5. Isolation der Adultwürmer und Gewinnung des Knoteninhalts

Nach siebenstündigem Knotenverdau hatte sich die kollagenhaltige Bindegewebskapsel weitgehend aufgelöst. Der verdaute Knoten wurde mit möglichst wenig Flüssigkeit aus der Kollagenaselösung genommen und auf einem Objektträger unter das Stereomikroskop gebracht. Bei 10- bis 25-facher Vergrößerung wurde der Knoten durch leichtes Zupfen mit Pinzetten geöffnet, ohne die Adultwürmer zu verletzen.

Das Wurmknäuel, dem teilweise noch gelblicher Knoteninhalt anhaftete, wurde mit einer Federstahlpinzette in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die auf dem Objektträger zurückbleibende Flüssigkeit wurde mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung über die Ecke des Objektträgers in dasselbe Kryoröhrchen geschwemmt.

Mit einer 1 ml Spritze wurde ein Teil der im Kryoröhrchen befindlichen Kochsalzlösung wiederholt aufgenommen und mit nicht zu starkem Druck auf das Wurmknäuel gespritzt, um dem Adultwurm äußerlich anhaftende Mikrofilarien abzuspülen.

War die Wurmoberfläche frei von Anlagerungen, wurde das Wurmknäuel mit möglichst wenig Flüssigkeit erneut auf einen Objektträger übertragen. Die mit dem Weibchen aufgeknäuelten, aber viel kürzeren und schlankeren Männchen ließen sich mühelos aus dem Knäuel ziehen.

Anschließend wurde das Weibchen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop auf Unversehrtheit untersucht.

Die nach Spülung der Adultwürmer zurückbleibende Flüssigkeit wurde gemeinsam mit der Kollagenaselösung, in welcher der Knotenverdau stattfand, untersucht (siehe Kapitel 2.3.7.).

### 2.3.6. Embryogramme der aus den Knoten isolierten Weibchen

Die Weibchen wurden auf dem Objektträger mit Präpariernadeln in kleine Stücke (< 1 mm) zerschnitten. Mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden die Wurmteile in einen Spezialmörser geschwemmt und zerquetscht, wobei die Embryonalstadien aus dem Uterus gepreßt wurden. Ein weiterer ml der Kochsalzlösung wurde dazu verwendet, das Pistill über dem Mörser und die Mörserwand abzuspülen, so daß die Embryonen des Weibchens in 2 ml suspendiert waren (SCHULZ-KEY *et al.* 1980). Von dieser Suspension wurde nach vorhergehendem Mischen ein kleiner Tropfen entnommen und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gebracht. Dort wurden die verschiedenen Embryonalstadien (Eizellen, kleine Morulae, große Morulae, Hufeisenstadien, Brezelstadien und Mikrofilarien) in 4 Quadranten differenziert, ausgezählt und deren Gesamtzahl pro Weibchen berechnet.

Anhand der Embryogramme wurde der Reproduktionsstatus ermittelt und die weiblichen Würmer klassifiziert (nach DUKE *et al.* 1990):

Status	Weibchen	Uteri
Y	jung, noch nicht geschlechtsreif	nur Oogenesestadien oder Oogonien vorhanden
SF	geschlechtsreif, nicht inseminiert	mit mehr als 20 000 Oozyten
SO	geschlechtsreif, nicht inseminiert	mit weniger als 20 000 Oocyten
FF	geschlechtsreif, inseminiert, voll produktiv	mit mehr als 62 500 Embryonen aller Stadien und mehr als 2500 Mikrofilarien
FO	geschlechtsreif, inseminiert, mit verminderter Produktion	mit weniger als 62 500 Embryonen aller Stadien und mehr als 2500 Mikrofilarien
IA	geschlechtsreif, inseminiert, mit beginnender Produktion	Anzahl später Embryonalstadien meist gering und weniger als 2500 Mikrofilarien
IZ	geschlechtsreif, inseminiert, mit auslaufender Produktion	Anzahl früher Embryonalstadien meist gering und mehr als 2500 Mikrofilarien
EE	alt, nicht mehr reproduktionsfähig	leer
C	moribund, kalzifiziert	kalzifiziert

**Tab. 1:** Einteilung von *O. ochengi*-Weibchen anhand der Reproduktivität

### **2.3.7. Lichtmikroskopische Untersuchung des Knoteninhalts**

Die bei der Gewinnung des Knoteninhalts angefallenen Lösungen (0,5 ml Spülflüssigkeit mit Knoteninhalt und 0,5 ml Kollagenaselösung) wurden vermischt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,5 ml aufgefüllt.

Diese Gesamtlösung enthielt die im natürlichen Knoteninhalt vorhandenen, sowie die während des Kollagenaseverdaus aus dem Knoten ausgewanderten Mikrofilarien.

Voraussetzung für die mikroskopische Auswertung war der Nachweis der Unversehrtheit des weiblichen Adultwurms. So wurde garantiert, daß alle im Mikroskop untersuchten Mikrofilarien vom Weibchen auf natürliche Weise im Knoteninnern freigesetzt wurden. Bei Verletzung des Weibchens hätten durch Anschnitt, bzw. Abquetschen des Uterus noch ungeborene Mikrofilarien in das Medium gelangen und die mikroskopische Untersuchung verfälschen können.

Von der frisch aufgeschüttelten Gesamtlösung (1,5 ml) wurde ein 200 µl-Aliquot entnommen. Bei 180- bzw. 400-facher Vergrößerung wurde die Vitalität der darin vorhandenen Mikrofilarien untersucht.

### **2.3.8. Kontrollansatz**

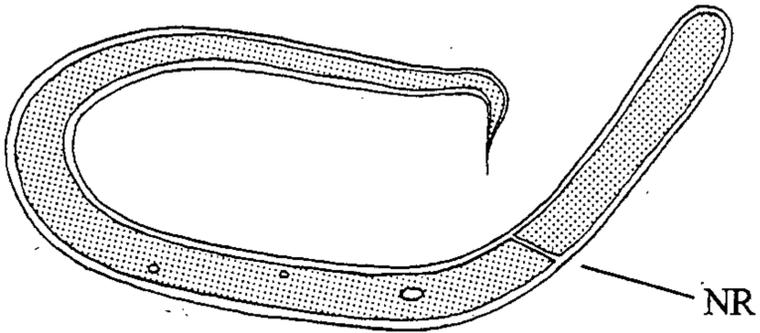
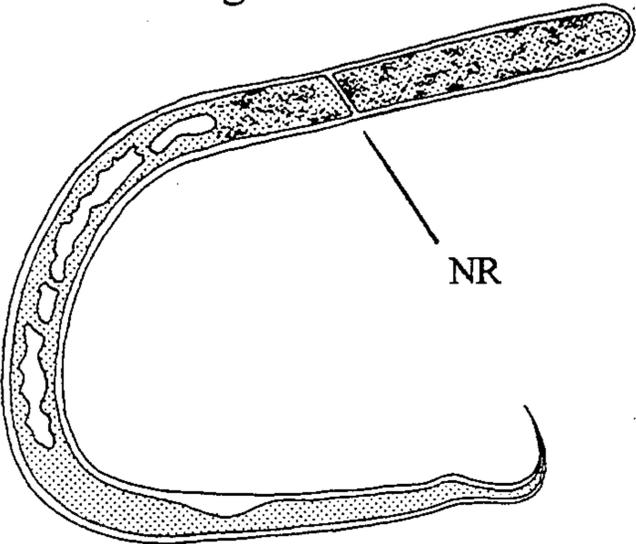
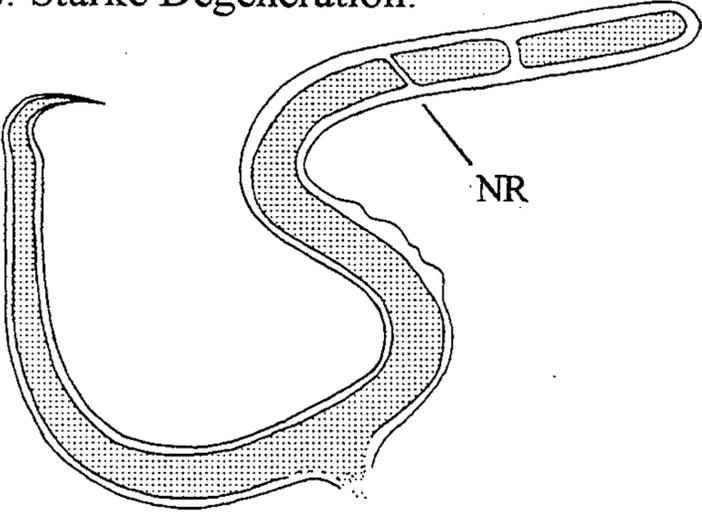
Um den Einfluß der Untersuchungsmethode auf die morphologische Degeneration festzustellen, wurden in mehreren Kontrollansätzen aus der Haut isolierte Mikrofilarien sieben Stunden lang in 0,5 ml Kollagenaselösung bei 37° C inkubiert (Konzentration Kapitel 2.3.4.).

Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und die Vitalität der Mikrofilarien mikroskopisch untersucht.

**2.3.9. Beurteilung der Vitalität der Mikrofilarien**

Anhand der Morphologie wurden die Mikrofilarien drei Schädigungskategorien zugeordnet (nach KLIEWER-ZIESE 1992).

Bestimmte Degenerationsmerkmale können ausschließlich oder kombiniert auftreten. Mikrofilarien wurden stets der Kategorie mit der stärksten Schädigung zugeordnet.

KATEGORIE :	BEOBACHTETE MORPHOLOGIE :	
	Kernsäule	Kutikula
<p>G0: Intakte Mikrofilarien</p> 	<p>regelmäßig, nicht unterbrochen</p> <p>-----</p> <p>mit kleinen Vakuolen</p>	<p>glatt</p>
<p>G1: Leichte Degeneration</p> 	<p>granuliert</p> <p>-----</p> <p>mit vielen großen Vakuolen, welche zu einer Vakuolensäule verschmelzen können</p> <p>-----</p> <p>verengt</p>	<p>glatt</p>
<p>G2: Starke Degeneration:</p> 	<p>unterbrochen</p> <p>-----</p> <p>granuliert bis unterbrochen</p> <p>-----</p> <p>aufgelöst</p>	<p>glatt</p> <p>-----</p> <p>gewellt</p> <p>-----</p> <p>aufgebrochen</p>

**Tab. 2:** Einordnung von *O. ochengi*-Mikrofilarien in drei Schädigungskategorien  
 Verschiedene Merkmale wurden an einer Mikrofilarie dargestellt.  
 (NR=Nervenring)

## 2.4. Abbau von Hautmikrofilarien durch immunkompetente Zellen des Wirts im Inkubationstest

### 2.4.1. Gewinnung von Hautmikrofilarien

Am Schlachthof von Ngaoundéré wurden von mehreren Goudali-Rindern mit *O. ochengi*-Infestation zwischen Bauchnabel und Euter/Skrotum Fellstücke herausgeschnitten. Diese Teile der Haut eignen sich besonders gut zur quantitativen Mikrofilariengewinnung, da dort die Hautmikrofilariendichte am höchsten ist (MANNIKAINEN 1994).

Im Labor wurden die gewaschenen Fellstücke rasiert und die Fellaußenseite mit 75%igem Alkohol desinfiziert. Mit einem scharfen sterilen Skalpell wurden bei flacher Schnittführung möglichst lange und möglichst dünne Streifen der obersten Hautschicht abgetragen und in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt, welches zuvor zur Hälfte mit sterilem, auf 36° C vorgewärmtem RPMI-1640-Medium gefüllt wurde. Das Medium enthielt pro ml 100 Einheiten Penicillin, 100 µg Streptomycin und 250 µg Amphotericin B. Nachdem die Röhrchen zu zwei Dritteln mit den Hautstreifen gefüllt waren, wurde mit Medium überschichtet und geschlossen für ca. sechs bis sieben Stunden bei 36° C im Wärmeschrank inkubiert. Die auswandernden Mikrofilarien sammelten sich am Boden des Röhrchens, wo sie nach Entfernen der Hautstreifen - mittels einer sterilen Pinzette - zurückblieben. Anschließendes Filtrieren durch ein steriles Netzchen (Maschenweite 0,5 mm) hielt kleinere Schwebstoffe zurück.

Nach zweimaligem Waschen mit RPMI (Zentrifugation: 3 min bei 2000 rpm) wurde das Mikrofilarienpellet in 2 ml RPMI aufgenommen.

Falls die Rinder, von denen die inkubierten Hautstücke stammten, eine gemischte *Onchocerca*-Infestation hatten, enthielt diese Mikrofilariensuspension eventuell außer den *O. ochengi*-Mikrofilarien auch solche von *O. gutturosa*.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot der Suspension unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt, wobei nur *O. ochengi*-Mikrofilarien berücksichtigt wurden. Die Suspension wurde um den errechneten Faktor verdünnt, so daß die Endkonzentration ca. 20 *O. ochengi*-Mikrofilarien in 120 µl Suspension betrug.

### 2.4.2. Blutentnahme

Aus der Halsvene wurden jedem Rind mittels heparinisierter Vakuetten<sup>®</sup> (Firma Greiner) 10 ml Blut steril entnommen.

### 2.4.3. Isolation von Serum und Immunzellen aus dem Rinderblut

Die Isolation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das bei der Zellisolierung verwendete RPMI-1640-Medium enthielt Antibiotika und Antimykotika (Konzentrationen siehe Kapitel 2.4.1.).

Nach einer Reihe von Vorversuchen erwies sich folgende Technik als besonders geeignet:

1. Zentrifugation des heparinisierten Vollbluts bei 2000 rpm; Dauer: 25 min;
2. Überstehendes Immunsrum (wäßrige klare Phase) abnehmen und in Eppendorfgeläße (2,5 ml) füllen;
3. Abnahme des buffy-cell-coat (milchig weiße Phase, welche die Immunzellen enthält) möglichst ohne Erythrozyten aus der darunterliegenden roten Phase; Resuspension in 4 ml RPMI;
4. In einem Zentrifugenröhrchen befindliches Ficoll-Hypaque-Medium (2 ml) mit dieser Suspension (siehe 3) vorsichtig überschichten, ohne die beiden Flüssigkeiten zu vermischen;
5. Ohne zu schütteln Röhrchen in die Zentrifuge stellen und 45 min bei 1500 rpm zentrifugieren;
6. Milchige Bande aus dem Röhrchen saugen und in 5 ml RPMI / 5% NS überführen; Diese Lösung enthält die Lymphozyten und Monozyten;
7. Im Röhrchen zurückbleibende Flüssigkeit verwerfen; das am Röhrchenboden befindliche Pellet, welches die Granulozyten enthält, in 2 ml RPMI lösen; da das Pellet oft noch Erythrozyten enthält, erscheint es rötlich;
8. Zweimaliges Waschen der Lymphozyten/Monozyten mit RPMI (Zentrifugation 10 min bei 1200 rpm); Pellet am Schluß in 1 ml RPMI auflösen;
9. Lyse der in der Granulozytenlösung befindlichen Erythrozyten mit eiskaltem, sterilem Aqua.dest.; 8 Sekunden nach Zugabe des eiskalten Wassers das Röhrchen mit 25° C warmem RPMI auffüllen; Abzentrifugieren bei 1200 rpm; Dauer: 10 min; Diese Prozedur wiederholen, bis das Pellet weiß erscheint; das weiße Granulozytenpellet am Ende in 1 ml RPMI / 5% NS auflösen;
10. Auszählen von Aliquots der Granulozyten- / Lymphozyten- und Monozytenlösung in der Neubauer-Zählkammer, um die Ausgangskonzentration zu bestimmen (Lymphozyten sind kleiner als Monozyten!); anschließend Färbung der toten Zellen in der Zählkammer mit Trypanblau und Bestimmung des Anteils an der Gesamtzellzahl;
11. Durch Verdünnung Lösungen in den gewünschten Endkonzentrationen herstellen;  
Granulozytenlösung 1:  $4 \cdot 10^6$  vitale Zellen pro ml  
Granulozytenlösung 2:  $2 \cdot 10^6$  vitale Zellen pro ml  
Lymphozytenlösung:  $4 \cdot 10^6$  vitale Lymphozyten pro ml

Die isolierten Zellen und Seren wurden anschließend sofort in den Inkubationstests verwendet.

#### 2.4.4. Beurteilung der inkubierten Mikrofilarien

Der Inhalt jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde auf einen Objektträger pipettiert. Die Mikrofilarien wurden bei 100-400facher Vergrößerung auf Vitalität, Motilität und Anlagerungen von Immunzellen untersucht.

##### Beurteilung der Vitalität

Die Beurteilung der Vitalität anhand der morphologischen Degeneration erfolgte nach Tabelle 2 (siehe Kapitel 2.3.9).

##### Beurteilung der Motilität

Es wurden fünf Beweglichkeitszustände (M1-M5) unterschieden:

M1	Volle Beweglichkeit	Peitschendes Vorderende, schnelle spiralige Aufknäuelung
M2	Leicht eingeschränkte Motilität	Ebenso, nur stark verlangsamtes Peitschen bzw. Aufknäueln
M3	Eingeschränkte Motilität	Keine Knäuelung; nur langsame Knickbewegungen
M4	Stark eingeschränkte Motilität	Knickbewegungen sehr selten, Einrollen des Schwanzes stellt nahezu die einzige Bewegung dar
M5	Keine Motilität	Regungslose, gestreckt bis gekrümmt daliegende Mikrofilarie

##### Anlagerung von Immunzellen an die Mikrofilarien

Je nach Ausmaß der Zelladhärenz wurden die Mikrofilarien in fünf Gruppen eingeteilt:

1. ohne Zellanlagerung;
2. mit bis zu 5 angelagerten Immunzellen;
3. mit 5-20 angelagerten Immunzellen;
4. mit mehr als 20 angelagerten Immunzellen;
5. von Immunzellen vollständig bedeckt;

Zellen wurden als an die Mikrofilarie angelagert betrachtet, falls sie über direkten Kontakt an die Mikrofilarienoberfläche gebunden waren oder - wie in Publikationen über Zelladhärenz bei *O. volvulus*- Larven beschrieben (GREENE *et al.* 1981, BRATTIG *et al.* 1991) - falls die Zellen Teil des an die Mikrofilarie angehefteten Zellclusters waren. Nur wenige Zellen eines Zellclusters haben direkten Kontakt mit der Mikrofilarie.

## 2.5. Statistische Auswertung:

### Inkubationstest:

Aus der Verteilung der Mikrofilarien auf die fünf Beweglichkeitszustände (M1-M5) wurde für jeden Ansatz der Motilitätsindex  $M_i$  errechnet. Dabei wurden die Beweglichkeitszustände unterschiedlich gewichtet. Pro Ansatz wurden 20 Mikrofilarien eingesetzt.

$$\begin{aligned}
 & \text{Zahl der M0-Mikrofilarien} * 4 \\
 & + \text{Zahl der M1-Mikrofilarien} * 3 \\
 & + \text{Zahl der M2-Mikrofilarien} * 2 \\
 & + \text{Zahl der M3-Mikrofilarien} * 1 \\
 & + \text{Zahl der M4-Mikrofilarien} * 0 \\
 & \text{-----} \\
 & = \quad \text{Motilitätsindex } M_i
 \end{aligned}$$

$M_i = 0 \quad \Rightarrow$  alle Mikrofilarien tot

$M_{i \max} = 4 * z_0 = 80 \quad \Rightarrow$  alle Mikrofilarien voll motil

$z_0 =$  Zahl der pro Ansatz eingesetzten Mikrofilarien = 20

Die Motilitätsindices sind für alle Ansätze im Anhang in Tabelle 11 dargestellt.

Die Motilitätsindices wurden mit dem **U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney** verglichen (SACHS 1992):

$$U_j = m * n + \frac{m * (m+1)}{2} - R_{M_i j} \qquad U_a = m * n + \frac{n * (n+1)}{2} - R_{M_i a}$$

- $U_j$  = Prüfgröße der Versuchsgruppe der alten Rinder
- $U_a$  = Prüfgröße der Versuchsgruppe der jungen Rinder
- $m$  = Stichprobenumfang der Versuchsgruppe der jungen Rinder ( $m=12$ )
- $n$  = Stichprobenumfang der Versuchsgruppe der alten Rinder ( $n=2$ )
- $M_i j$  = Motilitätsindices aus der Versuchsgruppe der jungen Rinder
- $M_i a$  = Motilitätsindices aus der Versuchsgruppe der alten Rinder
- $R_{M_i j}$  = Rangsumme der Stichproben ( $M_i j$ )
- $R_{M_i a}$  = Rangsumme der Stichproben ( $M_i a$ )

Der kritische U-Wert beträgt 1 (für  $m=12$ ;  $n=2$ ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,025$  für den einseitigen Test und  $\alpha = 0,05$  für den zweiseitigen Test.

**Abbau von Mikrofilarien im Knoten:**

Die Abhängigkeit zweier stetiger Verteilungen voneinander läßt sich durch den Spearmanschen Rang-Korrelationskoeffizienten  $r_s$  beurteilen.

**Spearmansche Rangkorrelation bei Bindung (nach SACHS 1992):**

$$r_{S,B} = 1 - \frac{6 * \sum D^2}{(n^3 - n) - (T_{x'} + T_{y'})} \quad \text{Es gilt: } -1 \leq r_{S,B} \leq 1$$

$r_{S,B}$  = Spearmanscher Rang-Korrelationskoeffizient bei Bindung

$n$  = Anzahl der Rangpaare

$D$  = Differenz der  $n$  Rangpaare ( $n \geq 6$ )

$T_{x'}$  =  $0,5 * \sum (t_{x'}^3 - t_{x'})$       und       $T_{y'}$  =  $0,5 * \sum (t_{y'}^3 - t_{y'})$

$t_{x'}$  = Anzahl der Bindungen in aufeinanderfolgenden Gruppen gleicher Ranggrößen der  $x'$ -Reihe

$t_{y'}$  = Anzahl der Bindungen in aufeinanderfolgenden Gruppen gleicher Ranggrößen der  $y'$ -Reihe

Für  $n = 16$  ist die Schranke  $0,503$  ( $\alpha = 0,05$ ) bzw.  $0,429$  ( $\alpha = 0,1$ ) im zweiseitigen Test. Bei Abhängigkeit der Verteilungen erreicht oder überschreitet der Rang-Korrelationskoeffizient die Schranke.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind**

Aus sechzehn Rindern wurden 179 Knoten isoliert und untersucht.

##### **3.1.1. Fertilität der Weibchen**

Insgesamt enthielten 115 Knoten (64,2%) mikrofilarienproduzierende Weibchen. Davon waren 102 Weibchen voll fertil (FF-Reproduktionsstatus), 10 Weibchen vermindert reproduktiv (FO-Status). Nur 3 Weibchen befanden sich in auslaufender Produktion (IZ-Status).

In den restlichen 64 Knoten, welche nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden, befanden sich Weibchen ohne Mikrofilarienproduktion. Dabei handelte es sich entweder um junge (Y, 4 Weibchen), in voller bzw. reduzierter Eizellproduktion befindliche (SF, 46 Weibchen bzw. SO, 6 Weibchen), beginnend reproduktive (IA, 6 Weibchen) oder kalzifizierte (C, 2 Weibchen) Würmer (vgl. Material und Methoden, Tab. 1). Verkalkte Würmer wurden selten beobachtet. Die einzigen beiden Exemplare stammten aus Knoten desselben Rinds (Nr.13, vgl. Anhang Tabelle 9).

##### **3.1.2. Produktivität der Weibchen**

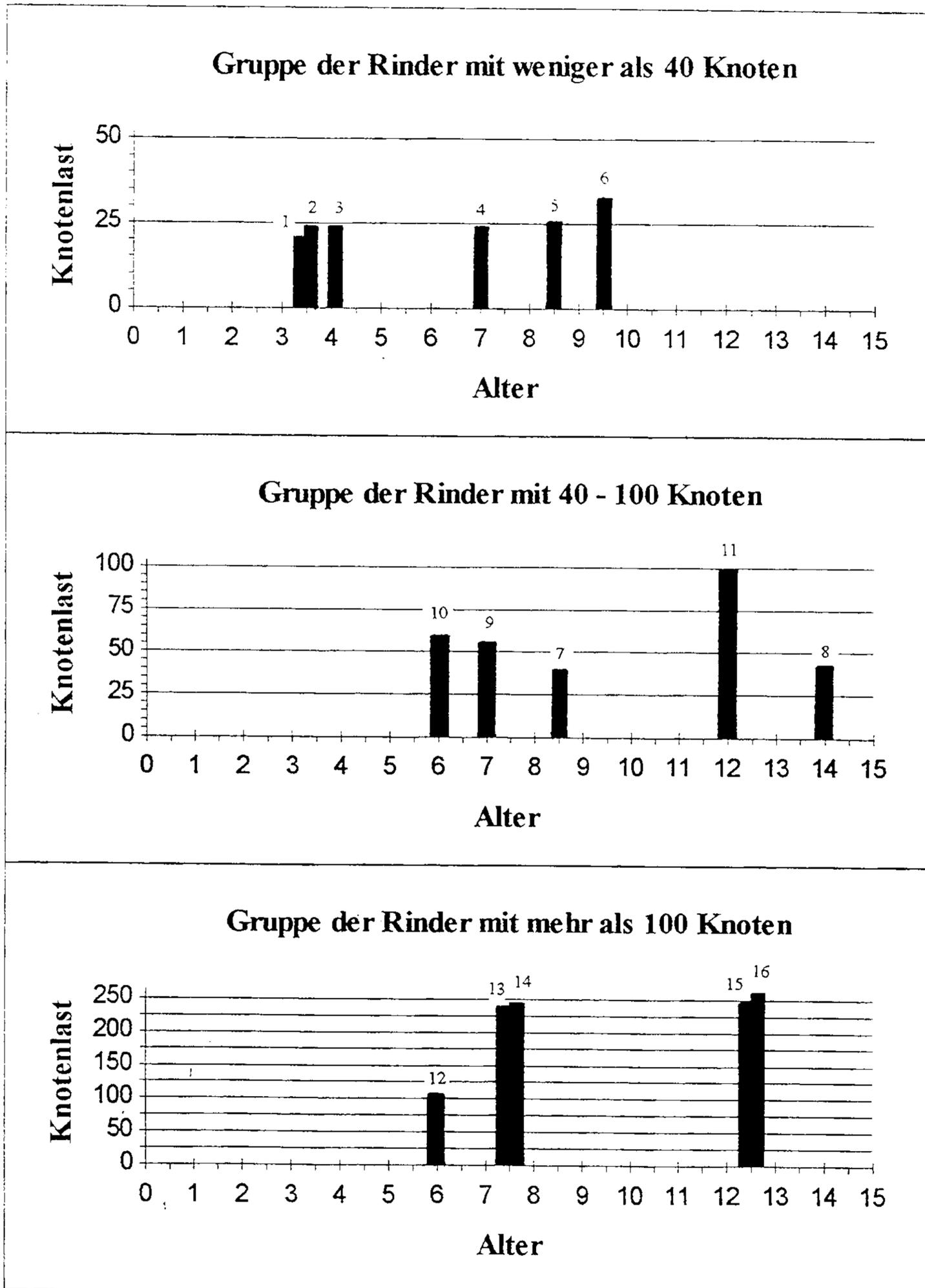
Pro Weibchen (im FF-, FO- oder IZ-Status) wurden durchschnittlich 104 203 Embryonalstadien (Oozyten ausgeschlossen) gefunden.

Nach der Inkubation in Kollagenase waren die Weibchen bereits so stark geschädigt, daß auf eine getrennte Erfassung von intakten und degenerierten Embryonen verzichtet wurde. Nach anderen Arbeiten zu schließen, beträgt der Anteil degenerierter Embryonen an der Gesamtzahl ungefähr 15% (RENZ *et al.* 1995). Daraus errechnen sich 15 630 degenerierte Embryonen pro Weibchen.

##### **3.1.3. Altersabhängige Knotenlast und Mikrofilariendichte in der Haut**

Die 16 Rinder wurden in drei Gruppen eingeteilt:

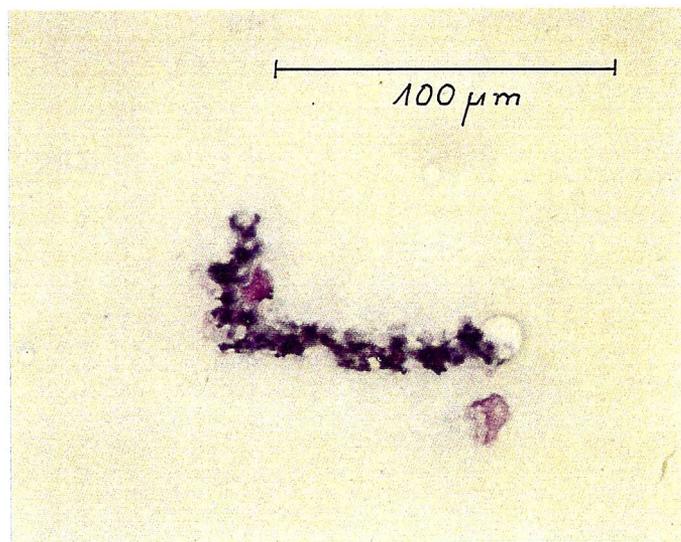
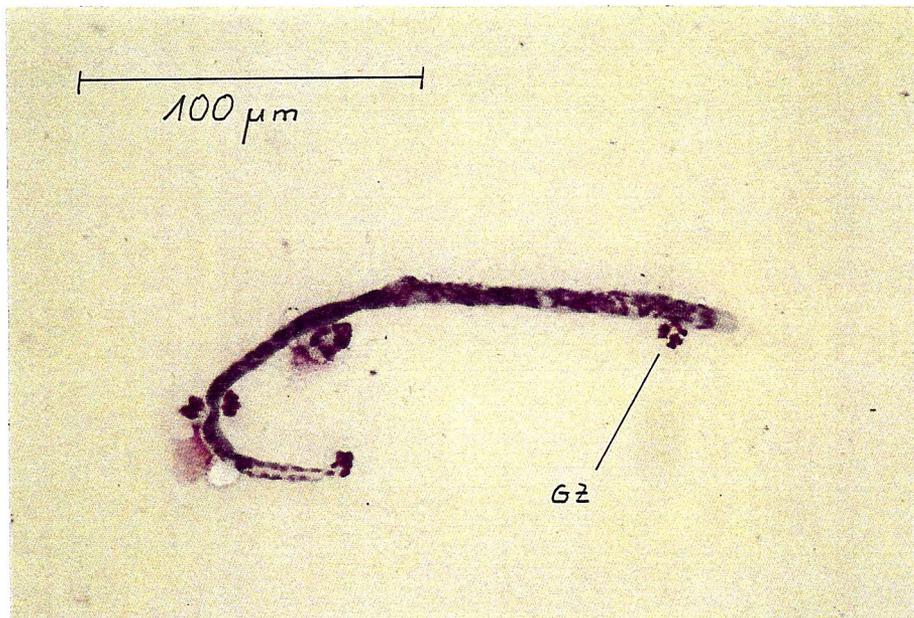
- 1.) Schwach befallene Rinder mit weniger als 40 Knoten.
- 2.) Rinder mit mittleren Knotenlasten von 40 bis 100 Knoten.
- 3.) Stark befallene Rinder mit einer Gesamtknotenlast von über 100 Knoten.



**Diagramm 1:** Altersabhängige Knotenlast und zugehörige Hautmikrofilariendichten; Die Nummern der Rinder sind oberhalb der Säulen angegeben.

### 3.1.4. Beobachtung stark veränderter Mikrofilarien im Knoten

Über 70% der Knoten, in denen Mikrofilarien freigesetzt wurden, enthielten morphologisch stark veränderte Mikrofilarien. Angelagerte Granulozyten und Makrophagen wurden häufig beobachtet.



**Abb. 2:** Morphologisch stark veränderte Mikrofilarien.  
GZ = Granulozyt

### 3.1.5. Anteil der degenerierten freien Mikrofilarien im Knoten (Tab. 3)

Die im Knoteninhalt vorhandenen Mikrofilarien wurden anhand der Vitalität drei Schädigungskategorien zugeordnet (vgl. Material und Methoden, Tabelle 2).

Für jedes Rind wurde die Anzahl stark degenerierter extrauteriner Mikrofilarien (der Kategorie G2 zugehörig) und die Gesamtzahl extrauteriner Mikrofilarien in Knoten mit reproduktiven Weibchen (d.h. Weibchen im FF- / FO- oder IZ-Reproduktionsstatus; vgl. Anhang: Tabelle 9) bestimmt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der stark degenerierten Mikrofilarien an der Gesamtmikrofilarienzahl pro Rind berechnet.

Rinder- nummer	Rasse	Geschlecht	Gesamt- zahl der Knoten im Rind =Knoten- last	Gesamtzahl der untersuchten Knoten	Anzahl der Knoten mit Weibchen im FF-, FO-, oder IZ-Re- produktions- status	Prozentualer Anteil von G2-Mikrofilarien an der Gesamt- mikrofilarienzahl in Knoten mit reproduktiven Weibchen
Schwach befallene Rinder (Alters-Ø: 6 Jahre)						
1	Goudali	weiblich	20	3	3	0
2	Goudali	weiblich	24	10	5	11,6
3	Goudali	weiblich	24	7	2	0,8
4	Goudali	weiblich	24	6	3	16,2
5	Goudali	weiblich	26	5	4	3
6	Akou	männlich	32	7	5	8
						Ø = 6,6
Mittel stark befallene Rinder (Alters-Ø: 9,5 Jahre)						
7	Goudali	weiblich	42	12	9	3,7
8	Goudali	weiblich	44	11	4	43,4
9	Goudali	weiblich	56	10	6	4,1
10	Goudali	weiblich	60	8	4	16,2
11	Goudali	weiblich	100	7	3	0,3
						Ø = 13,5
Stark befallene Rinder (Alters-Ø: 9,2 Jahre)						
12	Goudali	weiblich	104	14	11	34,5
13	Goudali	weiblich	238	7	5	16,7
14	Goudali	weiblich	242	15	13	3,7
15	Goudali	weiblich	244	30	16	26,8
16	Goudali	weiblich	260	27	22	13,9
						Ø = 19,1
				Σ = 179	Σ = 115	Gesamt-Ø = 12,7

**Tab. 3:** Durchschnittlicher Anteil der im Abbau begriffenen *O. ochengi*-Mikrofilarien (der Schädigungskategorie G2 zugehörig) im Knoten.

Im Durchschnitt gehörten pro Knoten 12,7% der freien Mikrofilarien der Schädigungskategorie G2 an.

Für die drei Befallsgruppen ergab sich folgender Anteil an G2-Mikrofilarien pro Knoten:

- 1.) Schwach befallene Rinder: 6,6 %
- 2.) Rinder mit mittlerem Befall: 13,5 %
- 3.) Stark befallene Rinder: 19,1 %

Der höchste Anteil an G2-Mikrofilarien, der in einem Knoten mit produktivem Weibchen gefunden wurde, betrug 62,5% (Rind Nr. 15). Die absolute Mikrofilarienzahl pro Schädigungskategorie - sowie der prozentuale Anteil der pro Schädigungskategorie gezählten Mikrofilarien an der Gesamtzahl - ist im Anhang in Tabelle 9 für jeden Knoten aufgeführt.

Demgegenüber traten bei den Kontrollen (Hautmikrofilarien für sieben Stunden in Kollagenase) niemals Mikrofilarien der Schädigungskategorie G2 auf. Durchschnittlich 17% der in den Kontrollen eingesetzten Mikrofilarien waren der Kategorie G0, 83% der Kategorie G1 zugehörig (siehe Anhang: Tabelle 9).

### 3.1.6. Korrelation von Alter und Knotenlast

Mit dem Spearmanschen Rang-Korrelationstest wurde auf Abhängigkeit verschiedener Parameter untersucht (siehe Material und Methoden, Seite 14):

Parameter	Alter	Knotenlast	Mikrofilariendichte in der Haut	Anteil an G2-Mikrofilarien
Alter	-----	$r_{S,B} = 0,545$ ( $\alpha \leq 0,05$ )	$r_{S,B} = 0,436$ ( $\alpha \leq 0,1$ )	$r_{S,B} = 0,268$ ( $\alpha > 0,1$ )
Knotenlast		-----	$r_{S,B} = 0,454$ ( $\alpha \leq 0,1$ )	$r_{S,B} = 0,431$ ( $\alpha \leq 0,1$ )
Mikrofilariendichte in der Haut			-----	$r_{S,B} = -0,037$ ( $\alpha > 0,1$ )

**Tab. 4:** Abhängigkeit der untersuchten Parameter voneinander.

$\alpha$  = Irrtumswahrscheinlichkeit;  $r_{S,B}$  = Rang-Korrelationskoeffizient bei Bindung; (zweiseitiger Rang-Korrelationstest nach Spearman).

Nur Alter und Knotenlast zeigten eine deutliche Abhängigkeit voneinander. Alter bzw. Knotenlast korrelierten - wenngleich schlecht - mit der Mikrofilariendichte in der Haut. Die Korrelation von Knotenlast und dem durchschnittlichen Anteil der G2-Mikrofilarien im Knoten war ebenfalls schlecht.

3.1.7. Umsatz der Mikrofilarien im Rind

Anhand des Ochengi/Rinder-Modells läßt sich der gesamte Massenwechsel der Mikrofilarien abschätzen:

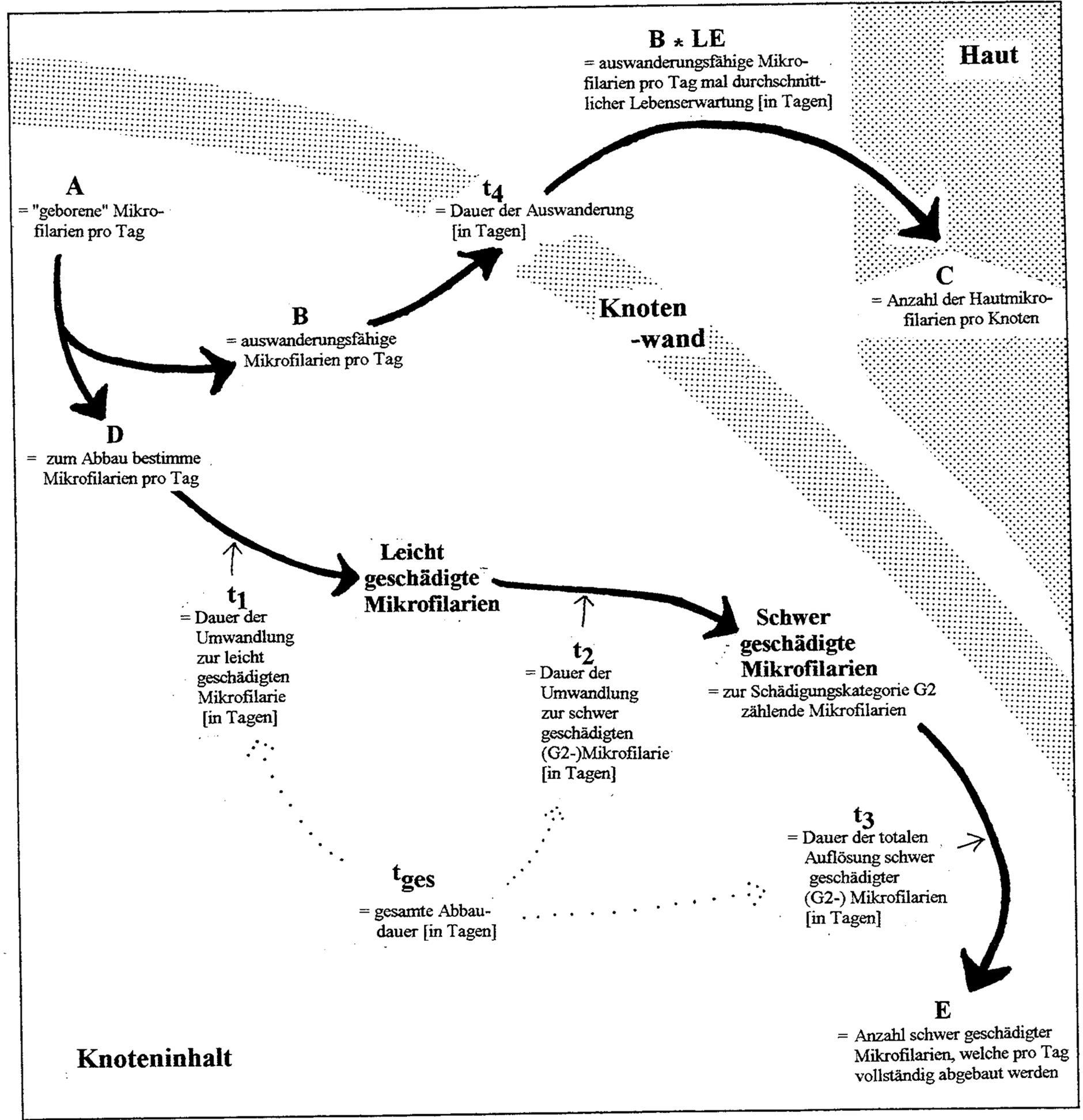


Abb. 3: Schicksal der im Knoten freigesetzten Mikrofilarien

Die Dynamik der Mikrofilarienpopulation soll anhand der 16 Rinder nachvollzogen werden.

Massenwechsel der Mikrofilarien im Knoten

Es wurden nur Knoten mit Weibchen im FF- / FO- und IZ-Reproduktionsstatus berücksichtigt.

Berechnung der Anzahl im Knoten befindlicher, auswanderungsfähiger Mikrofilarien (vgl. Abb. 3) :

Durch den Kollagenaseverdau entstehen leicht geschädigte Mikrofilarien (vgl. Kontrollansätze, Kapitel 3.1.3), welche *in vivo* aus dem Knoten wandern könnten. Daher wird die Zahl auswanderungsfähiger Mikrofilarien nicht durch Subtraktion degenerierter Mikrofilarien von der Gesamtzahl der Mikrofilarien ermittelt, sondern nach Formel (1) berechnet:

$$\begin{array}{l}
 \text{Gesamtzahl} \\
 \text{der} \\
 \text{Mikrofilarien} \\
 \text{im} \\
 \text{Knoten}
 \end{array}
 \quad \text{----} \quad
 \begin{array}{c}
 t_{\text{ges}} \\
 \text{[in Tagen]}
 \end{array}
 \quad * \quad
 \frac{\text{Anzahl schwer geschädigter} \\
 \text{(G2-) Mikrofilarien im Knoten}}{t_3}
 \quad = \quad
 \begin{array}{l}
 \text{potentiell aus-} \\
 \text{wanderungs-} \\
 \text{fähige} \\
 \text{Mikrofilarien} \\
 \text{im Knoten}
 \end{array}
 \quad (1)$$

Berechnung der Anzahl auswanderungsfähiger Mikrofilarien, welche pro Tag im Knoten freigesetzt werden (vgl. Abb. 3) :

$$\begin{array}{l}
 \text{A} \\
 \text{im Knoten} \\
 \text{freigesetzte} \\
 \text{Mikrofilarien} \\
 \text{pro Tag}
 \end{array}
 \quad \text{----} \quad
 \frac{1}{t_3}
 \quad * \quad
 \begin{array}{l}
 \text{im Knoten sichtbare,} \\
 \text{schwer degenerierte} \\
 \text{(G2-) Mikrofilarien}
 \end{array}
 \quad = \quad
 \begin{array}{l}
 \text{B} \\
 \text{auswanderungs-} \\
 \text{fähige Mikro-} \\
 \text{filarien pro} \\
 \text{Tag und Knoten}
 \end{array}
 \quad (2)$$

Die tägliche Freisetzung von Mikrofilarien wird auf ca. 2,5% aller in den Uteri der Weibchen vorhandenen Embryonalstadien geschätzt.

Berechnung der Auswanderungsdauer  $t_4$  (vgl. Abb. 3) :

$$\frac{\text{potentiell auswanderungsfähige} \\
 \text{Mikrofilarien im Knoten}}{\text{B} \\
 \text{auswanderungsfähige Mikro-} \\
 \text{filarien pro Tag und Knoten}}
 \quad * \quad
 \text{24 Stunden}
 \quad = \quad
 \begin{array}{l}
 \text{Auswanderungs-} \\
 \text{dauer } t_4 \\
 \text{[in Stunden]}
 \end{array}
 \quad (3)$$

In Inkubationstests mit *O. volvulus* traten nach 21 Stunden erstmals schwer geschädigte Mikrofilarien auf. Nach 50 Stunden war deren Zahl deutlich gestiegen (KLEWER-ZIESE 1992). Falls der vollständige Verdau schwer geschädigter Mikrofilarien drei weitere Tage ( $t_3 = 3$  Tage) in Anspruch nimmt, ergibt sich eine gesamte Abbaudauer von ca. 5 Tagen ( $t_{ges} = 5$  Tage). Diese Abbaudauer wurde für den Abbau von *O. ochengi*-Mikrofilarien im Knoten zugrunde gelegt.

R i n d e r - Nr.	Durchschnittliche Gesamtzahl der Embryonen pro Weibchen im FF-/FO-/IZ-Status	Geschätzte durchschnittliche Freisetzung von Mikrofilarien pro Knoten und Tag	Durchschnittliche Anzahl der im Knoten vorhandenen Mikrofilarien	Durchschnittliche Anzahl schwer degenerierter Mikrofilarien pro Knoten	Potentiell auswanderungsfähige Mikrofilarien im Knoten  mit Formel (1) berechnet	Auswanderungsfähige Mikrofilarien pro Tag und Knoten  mit Formel (2) berechnet
	<b>F</b>	<b>A</b> $= 0,025 * F$	<b>G</b> $= G1 + G2 + G3$	<b>H</b> $= \sum G2$	<b>K</b> $= G - (5/3 * H)$	<b>B</b> $= A - (1/3 * H)$
1	89 166	2 229	175	0	175	2 229
2	112 000	2 800	2 564	298	2 067	2 701
3	103 750	2 594	254	2	251	2 593
4	95 625	2 391	1 142	185	834	2 329
5	115 625	2 891	197	6	187	2 889
6	182 501	4 563	1 875	150	1 625	4 513
7	97 050	2 426	967	36	907	2 414
8	69 375	1 734	1 428	620	395	1 527
9	98 916	2 473	709	29	661	2 463
10	109 686	2 742	37	6	27	2 740
11	96 875	2 422	923	3	918	2 421
12	82 728	2 068	1 750	603	745	1 867
13	125 100	3 128	491	82	354	3 101
14	111 500	2 788	1 615	59	1 517	2 768
15	57 564	1 439	2 820	757	1 558	1 187
16	119 782	2 995	1 674	233	1 286	2 917
∅	<b>104 200</b>	<b>2 605</b>	<b>1 164</b>	<b>192</b>	<b>844</b>	<b>2 541</b>

**Tab. 5:** Massenwechsel von Mikrofilarien im Knoten

Für die Berechnungen wurden nur Knoten mit reproduktiven Weibchen verwendet.

Unter den genannten Voraussetzungen werden im Durchschnitt nur ca. 64 der im Knoten pro Tag freigesetzten Mikrofilarien dort abgebaut. Dies entspricht 2,46% (für  $t_{ges} = 5$  Tage;  $t_3 = 3$  Tage und einer durchschnittlichen Freisetzung von 2,5% der intrauterinen Embryonen pro Tag). Das Maximum betrug 14,47% (Rind Nr.8). Die Hauptmasse der Mikrofilarien wird demnach in der Haut abgebaut.

### Massenwechsel der aus den Knoten auswandernden Mikrofilarien

Allen Berechnungen wurde eine durchschnittliche Freisetzung von 2,5% der intrauterinen Mikrofilarien pro Tag und produktivem Weibchen, eine Abbaudauer der Mikrofilarien im Knoten von insgesamt 5 Tagen ( $= t_{ges}$ ) und eine Dauer von drei Tagen, in denen schwer geschädigte Mikrofilarien im Knoten sichtbar bleiben ( $= t_3$ ), zugrunde gelegt (vgl. Abb. 3).

### Berechnung der Hautmikrofilariendichte pro reproduktivem Weibchen:

Aus den Daten der Hautbiopsien (in Mikrofilarien pro mg) sowie der Gesamtknotenlast der Rinder läßt sich eine vorsichtige Schätzung der auf ein reproduktives Weibchen (im FF-/FO-/IZ-Status) kommenden Hautmikrofilarienzahl machen (1 mm<sup>2</sup> Hautbiopsie wiegt ca. 1 mg).

Für die Hochrechnung der Mikrofilarien-Gesamtzahl aus der Mikrofilarienzahl pro mm<sup>2</sup> Hautbiopsie wurde von einer Hautfläche von 3,6 m<sup>2</sup> pro Rind ausgegangen. Diese wurde in fünfzehn 40 \* 60 cm<sup>2</sup> große Areale aufgeteilt.

Die mittlere Mikrofilariendichte wurde für das Inguinalareal (mit Nabel und Euter/Skrotum) - wie für alle anderen Areale - aus den Daten von Wahl *et al.* (1994) berechnet.

Für die 14 Areale außerhalb des Inguinalareals addieren sich die Mikrofilariendichten zum 0,45-fachen des für die Inguinalfläche berechneten Werts.

Die Gesamtmikrofilarienzahl im Inguinalareal wurde aus den Daten von Mannikainen (1994) geschätzt. Diese zum 0,45-fachen desselben Werts addierte Zahl ergibt die Gesamtmikrofilarienzahl im Rind. Das Verhältnis der durchschnittlichen Mikrofilariendichte in der Mediane - ebenfalls aus den Daten von Mannikainen (1994) - zur Gesamtmikrofilarienzahl in der Haut betrug ca. 1 : 200 000.

Daher wird die Gesamtzahl der Mikrofilarien im Rind aus der Mikrofilarienzahl pro mg Hautbiopsie zwischen Nabel und Euter/Skrotum wie folgt berechnet :

$$\begin{array}{l} \text{Mikrofilarien} \\ \text{pro mg} \\ \text{Hautbiopsie} \end{array} * 200\ 000 = \begin{array}{l} \text{Gesamtzahl der} \\ \text{Mikrofilarien} \\ \text{in der Haut} \end{array} \quad (4)$$

Im Rind beinhalten rund die Hälfte aller Knoten reproduktive Weibchen (DAIBER 1993, RENZ 1995).

Daraus folgt:

$$\begin{array}{l} \text{Gesamtzahl der} \\ \text{Mikrofilarien} \\ \text{in der Haut} \end{array} : \frac{\text{Gesamtknotenlast}}{2} = \begin{array}{l} \text{Anzahl der Hautmikro-} \\ \text{filarien pro Weibchen} \\ \text{im FF-/FO-/IZ-Status} \end{array} \quad (5)$$

Berechnung der Lebenserwartung von Mikrofilarien,  
welche aus dem Knoten wandern:

In anderen Organen des Rinds kommen im Vergleich zur Haut nur sehr geringe Mengen von Mikrofilarien vor. Daher kann aus der Anzahl der pro Tag produzierten auswanderungsfähigen Mikrofilarien (vgl. Formel 2) und der Anzahl der Hautmikrofilarien je reproduktivem Weibchen (vgl. Formel 5) die Lebensdauer errechnet werden:

$$\begin{array}{l} \text{Anzahl der Haut-} \\ \text{mikrofilarien} \\ \text{pro} \\ \text{reproduktivem} \\ \text{Weibchen} \end{array} : \begin{array}{l} \text{B} \\ \text{auswanderungsfähige} \\ \text{Mikrofilarien pro Tag} \\ \text{und reproduktivem} \\ \text{Weibchen} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Lebensdauer der in} \\ \text{die Haut auswandern-} \\ \text{den Mikrofilarien} \end{array} \quad (6)$$

Die Berechnungen mit den Daten der sechzehn Versuchsrinder ergaben unter den genannten Voraussetzungen für die Hautmikrofilarien eine durchschnittliche Lebenserwartung von 89 Tagen. Die Mikrofilarien benötigten im Durchschnitt neun Stunden, um aus dem Knoten auszuwandern.

Rinder- nummer	Dauer der Auswanderung von Knotenmikrofilarien nach Formel (3) berechnet	Anzahl der Hautmikro- filarien pro Weibchen im FF-/FO-/IZ-Status nach Formel (5) berechnet	Lebenserwartung der Hautmikrofilarien in Tagen nach Formel (6) berechnet
1	1,9 h	330 000	148
2	18,4 h	13 333	5
3	2,3 h	61 667	24
4	8,6 h	688 333	295
5	1,6 h	323 077	112
6	8,6 h	458 750	102
7	9,0 h	314 286	130
8	6,2 h	90 909	60
9	6,4 h	30 714	12
10	0,2 h	186 667	68
11	9,1 h	276 000	114
12	9,6 h	35 769	19
13	2,7 h	387 731	125
14	13,2 h	254 215	92
15	31,5 h	18 852	16
16	10,6 h	272 462	93
∅	<b>9 h</b>	<b>233 923</b>	<b>89</b>

**Tab. 6:** Massenwechsel der Mikrofilarien in der Haut

Für die "immunen" Tiere (Rind Nr. 2, 3, 8, 9, 12 und 15) mit weniger als 0,2 Mikrofilarien pro mg Hautbiopsie und Knoten, errechnete sich durchschnittlich eine vergleichsweise kurze Lebenserwartung von 23 Tagen.

Zwischen Auswanderungsdauer und Lebenserwartung konnte keine Korrelation festgestellt werden (Spearman'scher Rang-Korrelationstest:  $r_{S,B} = 0,336$ ;  $\alpha > 0,1$ ).

### 3.2. Abbau von Hautmikrofilarien durch immunkompetente Zellen des Wirts im Inkubationstest

#### 3.2.1. Inkubationstest

Daten zu den im Inkubationstest verwendeten Rindern finden sich im Anhang in Tabelle 10. Pro Rind wurden folgende Ansätze für die Inkubation zusammengestellt:

(Mff = Mikrofilarien)

Ansatz GZ + IS: 120µl der Mikrofilariensuspension (mit ca. 20 *O. ochengi*-Mff)  
50µl der Granulozytenlösung 2 (mit  $10^5$  Granulozyten)  
30µl Immuns serum (ergibt eine Endkonz. von 15% IS pro Ansatz)

Ansatz GZ+LZ+IS: 120µl der Mikrofilariensuspension (mit ca. 20 *O. ochengi*-Mff)  
25µl der Granulozytenlösung 1 (mit  $10^5$  Granulozyten)  
25µl der Lymphozytenlösung (mit  $10^5$  Lymphozyten)  
30µl Immuns serum (ergibt eine Endkonz. von 15% IS pro Ansatz)

Ansatz IS: 120µl der Mikrofilariensuspension (mit ca. 20 *O. ochengi*-Mff)  
30µl Immuns serum (ergibt eine Endkonz. von 15% IS pro Ansatz)  
50µl RPMI-Medium

An einem Versuchstag wurden Mikrofilarien mit den Blutzellen/Seren zweier Rinder inkubiert. Dazu wurden 2 Mikrotiterplatten mit den oben genannten Ansätzen in doppelter Ausführung bestückt und bei 36°C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach 5-6 Stunden wurde die erste Mikrotiterplatte zur Auswertung entnommen, nach 19-20 Stunden die zweite.

Jede Platte beinhaltete zusätzlich folgende Kontrollansätze in doppelter Ausführung:

Kontrollansatz NS: 120µl der Mikrofilariensuspension (mit ca. 20 *O. ochengi*-Mff)  
30µl Normalserum (das Normalserum wurde von Kühen aus Stallhaltung in Deutschland gewonnen)  
50µl RPMI

Kontrollansatz RPMI: 120µl der Mikrofilariensuspension (mit ca. 20 *O. ochengi*-Mff)  
80µl RPMI

### 3.2.2. Einfluß des Alters der Rinder auf die Vitalität der Mikrofilarien

Im Inkubationstest wurden Rinder zweier Altersgruppen (junge Rinder alle zweieinhalb Jahre, n=12; alte Rinder sieben und acht Jahre, n=2) miteinander verglichen (vgl. Anhang Tabelle 10).

Durch die Seren "immuner" Rinder wurden die Mikrofilarien bereits nach 5-6 Stunden abgetötet ( $\alpha \leq 0,05$ ).

In Ansätzen mit Seren junger Rinder lebten 79% der Mikrofilarien länger als 6 Stunden. Dies entspricht der Überlebensdauer der Mikrofilarien in Normalserum und RPMI-Medium.

Die Zugabe von Immunzellen beeinflusste die Vitalität und Motilität der Mikrofilarien in keinem der Versuchsansätze.

nach 5-6 h		Morphologie			Motilität					Zellanlagerungen				
Ansatz		G0	G1	G2	M0	M1	M2	M3	M4	0	1-5	5-20	>20	bed.
Jung: n=12 Rinder	GZ <sub>i</sub> +IS <sub>i</sub>	30	65	5	3	14	28	32	23	40	25	15	20	0
	GZ <sub>i</sub> +LZ <sub>i</sub> +IS <sub>i</sub>	25	75	0	7	14	27	31	21	35	15	25	20	5
	IS <sub>i</sub>	30	70	0	15	23	20	22	20	----	----	----	----	----
Alt : n=2 Rinder	GZ <sub>a</sub> +IS <sub>a</sub>	30	70	0	0	0	10	3	87	70	10	0	5	15
	GZ <sub>a</sub> +LZ <sub>a</sub> +IS <sub>a</sub>	30	70	0	0	0	0	0	100	70	10	5	15	0
	IS <sub>a</sub>	25	75	0	0	0	0	0	100	----	----	----	----	----
Kontrolle	RPMI	50	50	0	15	26	16	22	21	----	----	----	----	----

**Tab. 7:** Prozentuale Verteilung der Mikrofilarien nach 5-6 Stunden Inkubationsdauer.

GZ = Granulozyten; IS = Immuns Serum;

LZ = Lymphozyten; bed. = bedeckt;

Schädigungskategorie G0 - G2 = nicht - schwer geschädigte Mikrofilarien;

Beweglichkeitszustände M1 - M4 = voll bewegliche - unbewegliche Mikrofilarien.

Die Häufigkeit morphologischer Schädigung unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen bzw. zwischen den verschiedenen Ansätzen nur wenig.

Eine Verstärkung der Schädigung mit der Inkubationsdauer läßt sich anhand der Zunahme der G1-Mikrofilarien feststellen.

nach 19-20 h		Morphologie			Motilität					Zellanlagerungen				
Ansatz		G0	G1	G2	M0	M1	M2	M3	M4	0	1-5	5-20	>20	bed.
Jung: n=12 Rinder	GZ <sub>i</sub> +IS <sub>i</sub>	15	75	10	0	0	1	11	88	40	25	15	10	10
	GZ <sub>i</sub> +LZ <sub>i</sub> +IS <sub>i</sub>	5	95	0	0	1	4	10	85	35	30	5	25	5
	IS <sub>i</sub>	10	90	0	0	0	0	3	97	----	----	----	----	----
Alt : n=2 Rinder	GZ <sub>a</sub> +IS <sub>a</sub>	0	100	0	0	0	0	0	100	85	10	5	0	0
	GZ <sub>a</sub> +LZ <sub>a</sub> +IS <sub>a</sub>	10	90	0	0	0	0	0	100	65	25	10	0	0
	IS <sub>a</sub>	10	90	0	0	0	0	0	100	----	----	----	----	----
Kontrolle	RPMI	20	80	0	0	0	0	0	100	----	----	----	----	----

**Tab. 8:** Prozentuale Verteilung der Mikrofilarien nach 19-20 Stunden Inkubationsdauer.

GZ = Granulozyten;

IS = Immunsorum;

LZ = Lymphozyten;

bed. = bedeckt;

Schädigungskategorie G0 - G2 = nicht - schwer geschädigte Mikrofilarien;

Beweglichkeitszustände M1 - M4 = voll bewegliche - unbewegliche Mikrofilarien.

Zellen alter Rinder adhärten im Durchschnitt seltener an die Mikrofilarien als die der jungen Rinder. Die Zugabe von Lymphozyten erhöhte die Zellanlagerung kaum.

Innerhalb der Versuchsgruppen traten in allen Ansätzen starke Schwankungen von den hier dargestellten Mittelwerten auf. Eine genaue Darstellung findet sich im Anhang in den Diagrammen zwei bis sieben.

## 4. Diskussion

### 4.1 Populationsdynamik der Mikrofilarien im Rind

Quantitative Wirts-Filarien-Beziehungen wurden bisher nur in Nagetiermodellen untersucht (WENK *et al.* 1994). Die Physiologie von Klein- und Großsäugern unterscheidet sich jedoch stark. Mit dem *O. ochengi*/Rinder-Modell steht eine Parasitose zur Verfügung, welche eine quantitative Erforschung der Populationsdynamik von Filarien in Großsäugern möglich macht. Hier wurde der Versuch unternommen, den Massenwechsel von *O. ochengi*-Mikrofilarien in "suszeptiblen", "normalen" und "immunen" Rindern abzuschätzen.

Aus sechzehn Rindern wurden 179 Knoten (12% der Gesamtknotenzahl) isoliert und untersucht. Insgesamt 64% dieser Knoten bargen gravide Weibchen. Dabei wurden Weibchen mit auslaufender Produktion mitgezählt. In anderen Veröffentlichungen wurden Werte von über 50% genannt (TREES *et al.* 1991, SCHULZ-KEY *et al.* 1993), bei Renz *et al.* (1995) 48%.

In dieser Untersuchung fanden sich durchschnittlich 104 200 Embryonen pro gravidem Weibchen. Dies übersteigt den von Renz *et al.* (1995) angegebenen Wert um ca. 25 000 Embryonen. Eventuell sind die um 25% erhöhten Werte auf eine saisonale Schwankung der Produktivität der Adultwürmer zurückzuführen. Gegen Ende der Regenzeit könnten die Würmer durch Steigerung der Produktivität das Wirtshabitat mit Mikrofilarien auffüllen, um den Simuliiden, deren Population in dieser Zeit ebenfalls stark ansteigt, für die Übertragung zur Verfügung zu stehen.

Drei der untersuchten Rinder hatten besonders hohe Mikrofilariendichten in der Haut (mehr als 150 Mikrofilarien pro mg Haut; Maximum: 231 Mikrofilarien pro mg). Alle drei waren über sieben Jahre und hatten mehr als 200 Knoten. Daiber (1993) untersuchte im selben Gebiet einige 4,5 Jahre alte Rinder und fand Mikrofilariendichten von über 50 Mikrofilarien pro mg bei einer Knotenlast von unter 20 Knoten pro Rind. Diese Rinder sind für *O. ochengi* besonders suszeptibel.

Der Anteil schwer geschädigter Mikrofilarien an der Gesamtzahl in den Knoten hängt weder vom Alter noch von der Mikrofilariendichte der Rinder ab. Eine deutliche Korrelation mit der Knotenlast konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, obwohl von der Gruppe der schwach befallenen zu den hochbefallenen Rindern ein Anstieg des prozentualen Anteils im Abbau begriffener Mikrofilarien zu verzeichnen war. Auch in histologischen Präparaten frisch fixierter Knoten ließen sich im Abbau befindliche Mikrofilarien beobachten. Deswegen ist anzunehmen, daß die Bildung von stark degenerierten Mikrofilarien nicht erst durch die Inkubation in Kollagenase ausgelöst wurde. Dafür sprechen auch die Kontrollansätze, in denen Hautmikrofilarien in Kollagenase inkubiert wurden und niemals schwer geschädigte Mikrofilarien entstanden.

Bei der Bewertung des statistischen Tests muß berücksichtigt werden, daß das zum Schlachthof getriebene Vieh aus verschiedenen Gegenden stammt. Demnach bilden die untersuchten Rinder eine heterogene Gruppe von Tieren, welche zu Lebzeiten sehr unterschiedlichen Übertragungen ausgesetzt waren. Dies könnte die schwache Korrelation der Hautmikrofilariendichte mit dem Alter bzw. mit der Knotenlast und die schwache Korrelation der Knotenlast mit dem Anteil schwer geschädigter Mikrofilarien an der Gesamtzahl im Knoten erklären.

Auch in Kamerun werden in der Rinderhaltung Medikamente eingesetzt. Effekte dieser Mittel auf die Immunitätslage der Tiere und damit auf den Abbau der Parasiten können nicht ausgeschlossen werden. Alle Untersuchungen wurden unter diesem Vorbehalt durchgeführt.

Der altersabhängige Anstieg der Knotenzahl konnte dennoch in den Versuchsrindern bestätigt werden.

Für die Abschätzung des Massenwechsels von Mikrofilarien im Rind wurde von einer durchschnittlichen Freisetzung von 2,5% der intrauterinen Embryonen pro Tag ausgegangen. Dieser Wert orientiert sich an Überlegungen von Schulz-Key *et al.* (1986) bzw. Schulz-Key (1990), welche für *O. volvulus* von einer Freisetzung der Embryonen in asynchronen Reproduktionsschüben von ungefähr 90 Tagen und einer Dauer der Embryogenese von ca. 30 Tagen ausgehen. Daraus ergeben sich im Schnitt circa 2600 (Max.: 4563) Mikrofilarien pro Tag.

Für *O. volvulus* berechneten Engelbrecht und Schulz-Key (1984) *in vitro* einen durchschnittlichen Tagesausstoß von ca.  $759 \pm 376$  Mikrofilarien bei einem Maximum von  $3800 \pm 187$ . Von diesen Daten ausgehend errechnete Duke (1993) eine tägliche Freisetzung von durchschnittlich 1600 Mikrofilarien *in vivo*.

Die vom Weibchen "geborenen" Mikrofilarien werden entweder im Knoten abgebaut oder wandern aus, um in der Haut für die Aufnahme durch einen geeigneten Vektor zur Verfügung zu stehen. Für die im Knoten verbleibenden Mikrofilarien ist ein gradueller Abbau von der vorerst noch intakten Mikrofilarie über eine leichte Schädigung bis zur schweren Degeneration wahrscheinlich. An Mikrofilarien angelagerte Immunzellen kamen im Knoten regelmäßig vor. Anhand ihrer Morphologie ließen sich diese Zellen als Granulozyten und Makrophagen bestimmen.

Die im Knoten gefundenen schwer geschädigten Mikrofilarien sind mit Sicherheit nicht mehr zur Auswanderung fähig. Leicht geschädigte Mikrofilarien entstehen auch durch die Inkubation in Kollagenase, weshalb über das Schicksal dieser meist noch gut beweglichen Mikrofilarien nichts ausgesagt werden kann.

Daher wurde zur Berechnung der Gesamtzahl der im Abbau befindlichen Mikrofilarien nur die Anzahl der schwer geschädigten Mikrofilarien verwendet.

Eine solche Berechnung setzt jedoch voraus, daß die Gesamtdauer des Abbaus - sowie die Zeitspanne, in welcher schwer geschädigte Mikrofilarien im Knoten sichtbar bleiben - bekannt ist.

Bei *in vitro* Versuchen zum Abbau von *O. volvulus* dauert die Umwandlung von nicht geschädigten zu schwer degenerierten Mikrofilarien über zwei Tage (KLEWER-ZIESE 1992). Dieser Wert wurde auf den Abbau von *O. ochengi*- Mikrofilarien übertragen. Die gesamte Abbaudauer wurde auf 5 Tage geschätzt, d.h. die schwer geschädigten Mikrofilarien sind circa drei Tage im Knoten sichtbar.

Unter diesen Voraussetzungen ergeben die durchgeführten Berechnungen einen Abbau im Knoten von nur 2,5% der täglich freigesetzten Mikrofilarien. Auch in Rindern mit relativ zur Knotenlast niedriger Hautmikrofilariendichte ist der verstärkte Abbau hauptsächlich auf eine Verringerung der Lebenserwartung bereits ausgewanderter Mikrofilarien zurückzuführen.

Dies unterstützt die Vermutung, daß von den Adultwürmern ausgeschiedene Substanzen das Immunsystem supprimieren und so den frühzeitigen Abbau im Knoten verhindern. Für die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* wurde bereits die Ausscheidung eines Phosphorylcholin-haltigen Produkts mit regulierender Wirkung auf das Immunsystem des Wirts nachgewiesen (HARNETT & HARNETT 1991).

Von Kellermann (1988) wurde nach Injektion von Blutmikrofilarien der Arten *Acanthocheilonema viteae* und *Litomosoides carinii* in ihre vorimmunisierten natürlichen Wirte (*Meriones unguiculatus* bzw. *Sigmodon hispidus*) bereits nach 15 Minuten ein Abbau in Lunge und Leber festgestellt. In diesen Nagetierfilariosen werden die Mikrofilarienmassen im Wirt offenbar viel schneller umgesetzt, als hier für die Berechnungen vorausgesetzt wurde. Auf *O. ochengi* übertragen, ergäben sich unter diesen Voraussetzungen viel weniger aus dem Knoten auswanderungsfähige Mikrofilarien und eine sehr viel höhere Lebenserwartung der Hautmikrofilarien. Allerdings ist es fraglich, inwiefern sich diese Daten auf Großsäugermodelle übertragen lassen, zumal Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* in der Haut leben.

*In vitro* konnte bisher ein Abbau von Mikrofilarien innerhalb solch kurzer Zeit nicht nachgewiesen werden.

Die Lebenserwartung von *O. volvulus*-Mikrofilarien wurde nach Behandlung mit Mikrofilariziden von Duke (1957; 1968) und von Awadzi & Gilles (1980) auf über ein Jahr geschätzt. In einer neueren Studie sah Duke (1993) erneut eine Zeitspanne von 12 bis 15 Monaten als zutreffend an.

Demgegenüber wurde in dieser Arbeit nur in einem Rind eine Lebensdauer der Mikrofilarien von über einem Jahr errechnet. Der Durchschnitt lag bei ungefähr 3 Monaten. Für den Fall, daß nicht alle Mikrofilarien, welche die intradermalen Knoten verlassen, in die äußeren Hautschichten gelangen, würde sich die errechnete Lebenserwartung der Hautmikrofilarien noch erhöhen.

Unter Verwendung von anderen Werten für die tägliche Freisetzung, Abbaudauer usw. verläuft die Rechnung analog. Hiermit wurde eine einfache und veränderungsfähige Berechnung zur Populationsdynamik vorgestellt, das die vorzügliche Eignung des *O. ochengi*/Rinder-Modells für quantitative parasitologische Fragestellungen unterstreicht.

Weitere Versuche wären nötig, um die tatsächliche Abbaugeschwindigkeit von Mikrofilarien *in vitro* und *in vivo* zu ermitteln. Wie bei *O. volvulus* könnte die Mikrofilarien-Ausschüttung produktiver Weibchen durch *in vitro* Haltung isolierter Knoten bestimmt werden (ENGELBRECHT & SCHULZ-KEY 1984).

#### 4.2 Abbau von Mikrofilarien im Inkubationstest:

Die inkubierten Mikrofilarien wurden nur durch die Immunsereen alter Rinder abgetötet. Dies steht mit der Hypothese in Einklang, daß ältere hochbefallene Rinder sich durch erhöhten Mikrofilarienabbau vor zu hohen Mikrofilarienbürden schützen.

Für die lymphatischen Filariosen, sowie für die chronische Onchozerkose des Menschen wurden bereits altersabhängige Immunglobulintiter nachgewiesen (OTTESEN 1984, KARAM & WEISS 1985). Das Abtöten von *O. volvulus*-Mikrofilarien durch Immunsereum allein kam *in-vitro* jedoch nicht vor (GREENE *et al.* 1981).

Demgegenüber spielen Komponenten des Immunsereums eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung zellulärer Reaktionen: *Brugia pahangi*-Mikrofilarien werden durch mono- und polynukleäre Makrophagen von Mäusen (MACKENZIE *et al.* 1985) abgebaut. Auch eosinophile Granulozyten lagern sich serumvermittelt an Mikrofilarien von *B. pahangi* bzw. *B. malayi* und töten sie durch Abgabe toxischer Proteine (HAMMANN *et al.* 1990). Entsprechendes gilt für *O. volvulus* und die eosinophilen Granulozyten des Menschen (WILDENBURG *et al.* 1994).

Neutrophile und eosinophile Granulozyten von experimentell mit *O. volvulus* infizierten Schimpansen töten Mikrofilarien *in vitro* ebenfalls ab (JOHNSON *et al.* 1991).

Anlagerung von Immunzellen wurde auch in diesem Inkubationstest beobachtet, jedoch wurde die Vitalität von *O. ochengi*-Mikrofilarien nicht beeinflußt. Wie für Inkubationstests mit *O. volvulus* beschrieben (GREENE 1981), zeigten die an *O. ochengi* angelagerten Zellen ebenfalls die Tendenz, sich in Clustern zusammenzulagern.

Der fehlende Effekt von Immunzellen kann auf den verfrühten Tod der Mikrofilarien durch Sauerstoffmangel zurückgeführt werden. Nach 19-20 Stunden waren bereits fast alle Mikrofilarien (auch in den Kontrollansätzen!) gestorben. Das seltene Auftreten schwer geschädigter Mikrofilarien, welche in den Knoten regelmäßig vorkommen, spricht für diese Annahme. In ähnlichen Inkubationstests mit *O. volvulus* lebten die Mikrofilarien viel länger. Schwer degenerierte Mikrofilarien traten dort erstmals nach 21 Stunden auf (KLIOWER-ZIESE 1992). Vielleicht wurden die Zellen selbst durch den Sauerstoffmangel geschädigt, so daß sie ihre physiologische Aufgabe nicht mehr erfüllen konnten.

## 5. Zusammenfassung

Aus sechzehn mit *Onchocerca ochengi* befallenen Rindern wurden Onchozerkome isoliert und mittels Kollagenase verdaut. Ohne den weiblichen Adultwurm zu verletzen, wurde der gesamte Knoteninhalt gewonnen und die darin befindlichen Mikrofilarien anhand ihrer Morphologie einer von drei Kategorien zugeordnet:

- (a) intakte Mikrofilarien ohne erkennbare Degenerationsmerkmale, evtl. mit kleinen Vakuolen;
- (b) leicht geschädigte Mikrofilarien mit granulierter, verengter oder stark vakuolisierter Kernsäule;
- (c) schwer geschädigte Mikrofilarien mit gebrochener Kernsäule, gewellter oder aufgebrochener Kutikula.

Bereits im Knoten findet ein Abbau von Mikrofilarien statt. An Mikrofilarien angelagerte Granulozyten und Makrophagen wurden in den Knoten regelmäßig gefunden.

Durchschnittlich erwiesen sich pro Rind 12,7% der extrauterinen Mikrofilarien in Knoten mit reproduktiven Weibchen als schwer geschädigt. Die mittlere Embryonenzahl in den Uteri gravider Weibchen betrug 104 203 (Oozyten ausgeschlossen).

Ausgehend vom durchschnittlichen Anteil schwer geschädigter Mikrofilarien im Knoten und von der Mikrofilariendichte in der Haut wurde der gesamte Massenwechsel der Mikrofilarien in den sechzehn Rindern abgeschätzt. Dabei wurde den Berechnungen eine durchschnittliche Freisetzung von 2,5% der intrauterinen Embryonen (ohne Oozyten), sowie eine Abbaudauer der im Knoten freigesetzten Mikrofilarien von fünf Tagen zugrunde gelegt. Weiter wurde vorausgesetzt, daß schwer geschädigte Mikrofilarien als solche drei Tage im Knoten sichtbar bleiben.

Unter diesen Voraussetzungen werden nur 2,5% der täglich in den Knoten freigesetzten Mikrofilarien dort abgebaut. Demnach findet der Abbau von Mikrofilarien hauptsächlich in der Haut statt. Für die durchschnittliche Auswanderungsdauer wurden neun Stunden ermittelt; für die Hautmikrofilarien errechnete sich eine mittlere Lebenserwartung von 89 Tagen.

Für die "immunen" Rinder (mit relativ zur Knotenlast geringer Hautmikrofilariendichte) wurden vergleichsweise kürzere Lebenserwartungen von durchschnittlich 23 Tagen berechnet.

Im Inkubationstest wird der *in vitro*-Abbau von *O. ochengi*-Mikrofilarien durch das Immunsystem verschieden alter Rinder verfolgt. Dabei wurden die Mikrofilarien bereits nach 5-6 Stunden durch das Immunsrum alter Rinder abgetötet. Die Zugabe von Immunzellen hatte keinen Einfluß auf die Vitalität der inkubierten Mikrofilarien.

## 6. Abstract

Nodules excised from cattle infested with *Onchocerca ochengi* were digested by collagenase. All of the liquid suspension surrounding the worm in the nodule was isolated without hurting the adult female filariae. The microfilariae found in this suspension were judged and assigned to one of three groups using morphological criteria:

- (a) intact microfilariae without any sign of degeneration, at most with little vacuoles;
- (b) slightly damaged microfilariae with granulated, constricted or strongly vacuolised nuclear chord;
- (c) severely damaged microfilariae with broken nuclear chord, wavy or burst cuticula.

Some microfilariae were already disintegrated in the nodule. Granulocytes and macrophages regularly occurred attached to microfilariae set free in the nodule.

12,7 % of total extra-uterine (free) microfilariae in nodules containing reproductive female worms were severely damaged. The average number of embryonic stages found *in uteri* amounted to 104 203, oocytes excluded.

The estimation of microfilariae turnover within sixteen bovine hosts was based on the mean number of severely damaged free microfilariae in the nodules and on microfilariae density in the skin.

Therefore three assumptions were made: the average output of microfilariae amounts to 2,5% of total embryonic stages *in uteri* (1), complete microfilariae disintegration in the nodule lasts five days (2) and severely damaged microfilariae remain visible for three days (3).

In this calculation only 2,5% of "new-born" microfilariae per day did not manage to leave the nodule. This indicates high reduction of microfilariae in the skin.

The calculated average life-span of skin microfilariae was 89 days. Focussing "immune" hosts (cattle with low skin microfilariae densities compared to the microfilariae load) the life-span decreased to 23 days.

An incubation test was performed to observe microfilariae degeneration *in vitro*, using cells and sera isolated from the infested host of different age. Herein microfilariae were killed by immune sera of old animals after 5-6 hours. Addition of immune cells had no impact on microfilariae vitality.

## 7. Literaturverzeichnis

ACHU-KWI D. (1994) :

Can cattle protect man from Onchocerciasis? Reduction of *Simulium* Vektorial Capacity and Crossreacting Immunity as factors of zooprophylaxis.

Contribution of the Institute of Animal and Veterinary Research (IRZV), Wakwa Center.

Projekt report: CEC-Project TS3/CT92056.

AWADZI K. & GILLES H. M. (1980) :

The chemotherapy of onchocerciasis IV. Further trials with metrifonate.

Ann. Trop. Med. Parasitol., **74**, 355-362.

BAIN O. (1981) :

Le genre *Onchocerca*: Hypothèse sur son évolution et clé dichotomique des espèces.

Ann. Parasitol. Hum. Comp., **56**, 503-526.

BAIN O. & BEVERIDGE I. (1979) :

Redescription d' *Onchocerca gibsoni* C. et J. 1910.

Ann. Parasitol. Hum. Comp., **54**, 69-80.

BAIN O., BUSSIÉRAS J. & AMÉGÉE E. (1974) :

Dualité d'*Onchocerca volvulus* de l'homme et d'*O. spec.* Cameron 1928, du bétail. Nouvelles espèces d'onchocerques bovines au Togo.

C. R. Acad. Sci., **278**, 369-372.

BAIN O., VASSILIADES G. & DELBOVE P. (1982) :

Une nouvelle onchocerque, parasite de bovin domestique, au Sénégal.

Ann. Parasitol. Hum. Comp., **57**, 587-591.

BRATTIG N.W., TISCHENDORF F.W., STROTE G,  
& MEDINA-DE LA GARZA C.E. (1991)

Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: heterogeneity of *in vitro* adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of *Onchocerca volvulus*.

Parasite Immunol., **13**, 13-22.

BÜTTNER D. W. & RÁCZ P. (1983) :

Macro- and microfilariae in nodules from onchocerciasis patients in the Yemen Arab Republic.

Tropenmed. Parasit., **34**, 113-121.

BWANGAMOI O. (1969) :

*Onchocerca ochengi* - new species, an intradermal parasite of cattle in East Africa.

Bull. Epizoot. Dis. Afr., **17**, 321-335.

- 
- DAFA'ALLA T. H., GHALIB H.W., ABDELMAGEED A.  
& WILLIAMS J. F. (1992) :  
The profile of IgG and IgG subclasse of onchocerciasis patient.  
Clin. Exp. Immunol., **88**, 258-263.
- DAIBER W. (1993) :  
Epizootiologie von *Onchocerca ochengi* in Rindern Kameruns.  
Diplomarbeit der Universität Tübingen, Fakultät Biologie, 81 Seiten.
- DUKE B. O. L. (1957) :  
The reappearance, rate of increase and distribution of the microfilariae of *Onchocerca volvulus*  
following treatment with diethylcarbamazine.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **51**, 37-44.
- DUKE B. O. L. (1968) :  
The effects of drugs on *Onchocerca volvulus* I. Methods of assessment, population dynamics of  
the parasite and the effects of diethylcarbamazine.  
Bull. Wld. Hlth. Org., **39**, 195-212.
- DUKE B. O. L. (1980) :  
Observations and *Onchocerca volvulus* in experimentally-infected chimpanzees.  
Tropenmed. Parasit., **31**, 41-54.
- DUKE B. O. L. (1993) :  
The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host.  
Trop. Med. Parasitol., **44**, 61-68.
- DUKE B. O. L., ZEA-FLORES G. & GANNON R.T. (1990) :  
On the reproductive activity of the female *Onchocerca volvulus*.  
Trop. Med. Parasitol., **41**, 387-402.
- EBERHARD M.L. (1979) :  
Studies on the *Onchocerca* (Nematoda: Filarioidea) found in cattle in the United States.  
I. Systematics of *O. gutturosa* and *O. linealis* with a description of *O. stilesi* sp.n.  
J. Parasitol., Vol **65** (No. 3), 379-388.
- ENGELBRECHT F.H. & SCHULZ-KEY H. (1984) :  
Observations on adult *Onchocerca volvulus* maintained *in vitro*.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **78**, 212-215.

GATRILL A. J., MACKENZIE C. D., McMAHON J. E., WILLIAMS J.F.  
& GUDERIAN R.H. (1987) :

A histochemical study of the macrophages present in tissue responses to adult *Onchocerca volvulus*.

Histochem. J., **19**, 509-519.

GREENE B.M., TAYLOR H.R. & AIKAWA M. (1981) :

Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction.

J. Immunol., **Vol. 127**, 1611-1618.

HAMANN K.J., GLEICH G.J., CHECKEL J.L., LOEGERING D.A.,  
McCALL J.W. & BARKER R.L. (1990) :

*In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins.

J. Immunol., **Vol. 144**, 3166-3173.

HARNETT W. & HARNETT M.M. (1993) :

Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of Protein Kinase C levels by a Phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product.

J. Immunol., **Vol. 151**, 4829-4837.

HILDEBRANDT T. (1995) :

Populationsdynamik und Biologie der Filarie *Onchocerca armillata* in afrikanischen Rindern. Diplomarbeit der Universität Tübingen, Fakultät Biologie, 63 Seiten.

HOCH B., WAHL G., ENYONG P., LÜDER C.G.K., HARNETT W.,  
SCHULZ-KEY H. & RENZ A. (1993) :

Onchozerkose in Mensch und Rind: Serologische Erkennung von artspezifischen und kreuzreaktiven Antigenen.

Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasit., **15**, 51-60.

JOHNSON E.H., LUSTIGMAN S. BROTMAN B, BROWNE J.  
& PRINCE A.M. (1991) :

*Onchocerca volvulus*: *in vitro* killing of microfilaria by neutrophils and eosinophils from experimentally infected chimpanzees.

Trop. Med. Parasit., **42**, 351-355.

KARAM M. & WEISS N. (1985) :

Seroepidemiological investigations of onchocerciasis in a hyperendemic area of West Africa.

AM. J. Trop. Med. Hyg., **34**, 907-917.

- KELLERMANN E. (1988) :  
Abbaurate der Mikrofilarien von *Litomosoides carinii* und *Acanthocheilonema viteae* (Nematoda: Filarioidea) in Lunge und Leber ihrer natürlichen Wirte.  
Diplomarbeit der Universität Tübingen, Fakultät Biologie, 44 Seiten.
- KLIEWER-ZIESE B. (1992) :  
Behandlung der Onchozerkose mit Ivermectin: Wirkung auf Mikrofilarien von *Onchocerca volvulus* *in vitro* und *in vivo*.  
Inaugural-Dissertation der Universität Tübingen, Medizinische Fakultät.
- MACKENZIE C.D., OXENHAM S.L., LIRON D.A., GRENNAN D. & DENHAM D.A. (1985) :  
The induction of functional mononuclear and multinuclear macrophages in murine Brugian filariasis: morphological and immunological properties.  
Trop. Med. Parasit., **36**, 163-170.
- MANNIKAINEN A. (1994) :  
Untersuchung der Habitate von *Onchocerca*-Mikrofilarien (Nematoda, Filarioidea) in der Haut von afrikanischen Rindern.  
Diplomarbeit der Universität Tübingen, Fakultät Biologie, 67 Seiten.
- NEUMANN L. G. (1910) :  
Un nouveau Nématode parasite du Boeuf (*Onchocerca gutturosa* n sp.).  
Rev. Veter., **67**, 270-278.
- OTTESEN E.A. (1984) :  
Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **78 (Suppl.)**, 9-18.
- PAUVAUX C. (1988) :  
Farbatlas der Anatomie des Rindes. Schober Verlag.
- RAILLIET A. & HENRY A. (1910) :  
Les onchocerques, nématodes du tissu conjonctif.  
C. R. Soc. Biol., **68**, 248-251.
- RENZ A., SCHIBEL J., EICHNER M. & ENYONG P. (1989) :  
Animal filariae in antropophilic *Simulium* spp. in North Cameroon.  
Trop. Med. Parasitol., **40**, 386-387.
- RENZ A., TREES A. J., ACHU-KWI D., EDWARDS G. & WAHL G. (1995) :  
Evaluation of suramin, ivermectin and CGP 20376 in a new macrofilaricidal drug screen, *Onchocerca ochengi* in African cattle.  
Trop. Med. Parasitol., **46**, 31-37.

- RENZ A., WAHL G., ENYONG P., HARNETT W., MACDONALD M., AKOGUN O., MBAH D., ACHU-KWI D., TANYA V., HOCH B., DAIBER W., SCHMITZ A. & MANNIKAINEN A. (1994) :  
Can cattle protect man from onchocerciasis? Reduction of *Simulium* Vectorial Capacity and Crossreacting Concomitant Immunity as factors of zooprophylaxis.  
Progress report: CEC-TS2-0056.
- SACHS L. (1992) :  
Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. Siebente Auflage.  
Springer Verlag.
- SCHIBEL J.M. & RENZ A. (1990) :  
Differentiation of non-*Onchocerca volvulus* filarial larvae in anthropophilic *Simulium ssp.* in North Cameroon.  
Acta Leidensia, **59**, 460-461.
- SCHULZ-KEY H. (1978) :  
A simple technique to assess the total number of *Onchocerca volvulus* microfilariae in skin snips.  
Tropenmed. Parasitol., **29**, 51-54.
- SCHULZ-KEY H. (1990) :  
Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*.  
Acta Leidensia, **59**, 27-43.
- SCHULZ-KEY H. & KARAM H. (1986) :  
Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*.  
Parasitol. Today, **2**, 284-286.
- SCHULZ-KEY H., WAHL G., KLÄGER S. & RENZ A. (1993) :  
*Onchocerca ochengi* in afrikanischen Rindern als Screening-Modell für filarizide Substanzen.  
Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasit., **15**, 17-24.
- SPRATT D.M. & MOORHOUSE D.E. (1971) :  
*Onchocerca sweetae* sp.nov. (Nematoda: Filarioidea), a parasite of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Northern Australia.  
Zool. Anz. Leipzig, **186**, 147-153.
- TREES A.J., WAHL G., KLÄGER S. & RENZ A. (1992) :  
Age-related differences in parasitosis may indicate acquired immunity against microfilariae in cattle naturally infected with *Onchocerca ochengi*.  
Parasitology, **104**, 247-252.
- VAN DEN BERGHE L. (1941) :  
Recherches sur l'onchocercose au Congo Belge. Ite Mémoire. Les vers adultes et leur localisation chez l'homme.  
Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **21**, 167-187.

WAHL G. (1991) :

Die *Onchocerca* Arten der Rinder in Nord-Kamerun und ihre Bedeutung für die Epidemiologie der menschlichen Onchozerkose.

Dissertation der Universität Tübingen, Fakultät Biologie, 103 Seiten.

WAHL G., ACHU-KWI M.D., MBAH D., DAWA O. & RENZ A. (1994) :

Bovine onchocercosis in North-Cameroon.

Vet.Parasit., **52**, 297-311.

WAHL G. & RENZ A (1989) :

*Onchocerca spp.* of cattle and game in North-Cameroon.

Trop. Med. Parasitol., **40**, 387.

WENK P., KELLERMANN E. & HAFNER C. (1994) :

Turnover of microfilariae in small mammals 2. Disintegration of microfilariae

(*Acanthocheilonema viteae*) (Filarioidea: Nematoda) after intravenous injection into the jird, *Meriones unguiculatus*.

Parasitology, **109**, 201-207.

WILDENBURG G., DARGE K., KNAB J., TISCHENDORF F.W.,

BONOW I. & BÜTTNER D.W. (1994) :

Lymph nodes of onchocerciasis patients after treatment with ivermectin: reaction of eosinophil granulocytes and their cationic granule proteins.

Trop. Med. Parasitol., **45**, 87-96.

ZAHNER S. & SCHULZ-KEY H. (1990) :

Rinderonchozerkose in Süddeutschland. Verteilung der Mikrofilarien in ihrem Wirtshabitat.

Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasit., **12**, 87-94.