©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9 (1987) 195 - 201

Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen (Komm. Direktor: Prof. Dr. W. Höfler) (1)
Department of Tropical Veterinary Sience, James Cook University, Townsville, Australien
(Dr. D. B. Copeman) (2)

Untersuchungen zur Reproduktivität von Onchocerca gibsoni, einer Filarie des Rindes

Sabine Kläger[1], Diana Vancan[2], Roswitha Höflacher[1], H. Schulz-Key[1]

Einleitung

Onchocerca gibsoni, eine intranoduläre Filarie, hat in den letzten Jahren nicht nur wegen der sehr hohen Prävalenz von über 80% beim Schlachtvieh in Australien große veterinärmedizinische Bedeutung erlangt, sondern ist auch wegen der Verwandtschaft zu *Onchocerca volvulus* im Menschen ins Blickfeld gerückt. Die Ausbildung von subkutanen Knoten als Sitz der Adultfilarien und das Auftreten von Hautmikrofilarien sowie Morphologie und Metabolismus machen *O. gibsoni* zu einem geeigneten Modell für *O.-volvulus*-Infektionen. Dies wird unter anderem zum Test von neuen filariziden Medikamenten genutzt (3, 5).

Einige Anthelmintika können den adulten Parasiten nicht abtöten, wirken aber auf die Ausbildung der intrauterinen Entwicklungsstadien. Daher sind Kenntnisse über das Fortpflanzungsverhalten und über die Reproduktivität als Grundlage zur Beurteilung von möglicher embryozider Wirkung eines neuen Medikamentes erforderlich (9). Untersuchungen zur Wurmlast in den Knoten und die Zusammensetzung der Wurmpopulation wurden bereits von BEVERIDGE et al. (1) vorgestellt. Ziel dieser Untersuchung war es, die Reproduktivität von *O.-gibsoni*-Weibchen und Männchen qualitativ und quantitativ zu beschreiben.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial standen uns sowohl frisch aus den Rindern entfernte Knoten, als auch tiefgefrorene bzw. fixierte Knoten aus dem Schlachthof Townsville/ Australien zur Verfügung. Die Knoten wurden in einer 0,4%igen Kollagenaselösung (Boehringer Nr. 103586) in Gewebekulturmedium RPMI 1640 oder in PBS bei 32 - 35° C inkubiert (8). Die Filarien wurden nach ein bis vier Tagen aus dem zerfallenden Knotengewebe isoliert und die Wurmlast pro Knoten festgehalten. Jede Filarie wurde mikroskopisch untersucht, um den Anteil an degenerierten, d. h. die vor dem Entfernen der Knoten schon abgestorbenen Würmer, zu erfassen. Jedes Weibchen wurde in 3 ml PBS in einem speziellen Mörser suspendiert und die intrauterinen Entwicklungsstadien in diesen Suspensionen mit Hilfe einer FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer quantitativ bestimmt, wie bei SCHULZ-KEY et al. (9) beschrieben. Die embryonalen Entwicklungsstadien wurden in sechs Gruppen entsprechend dem

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

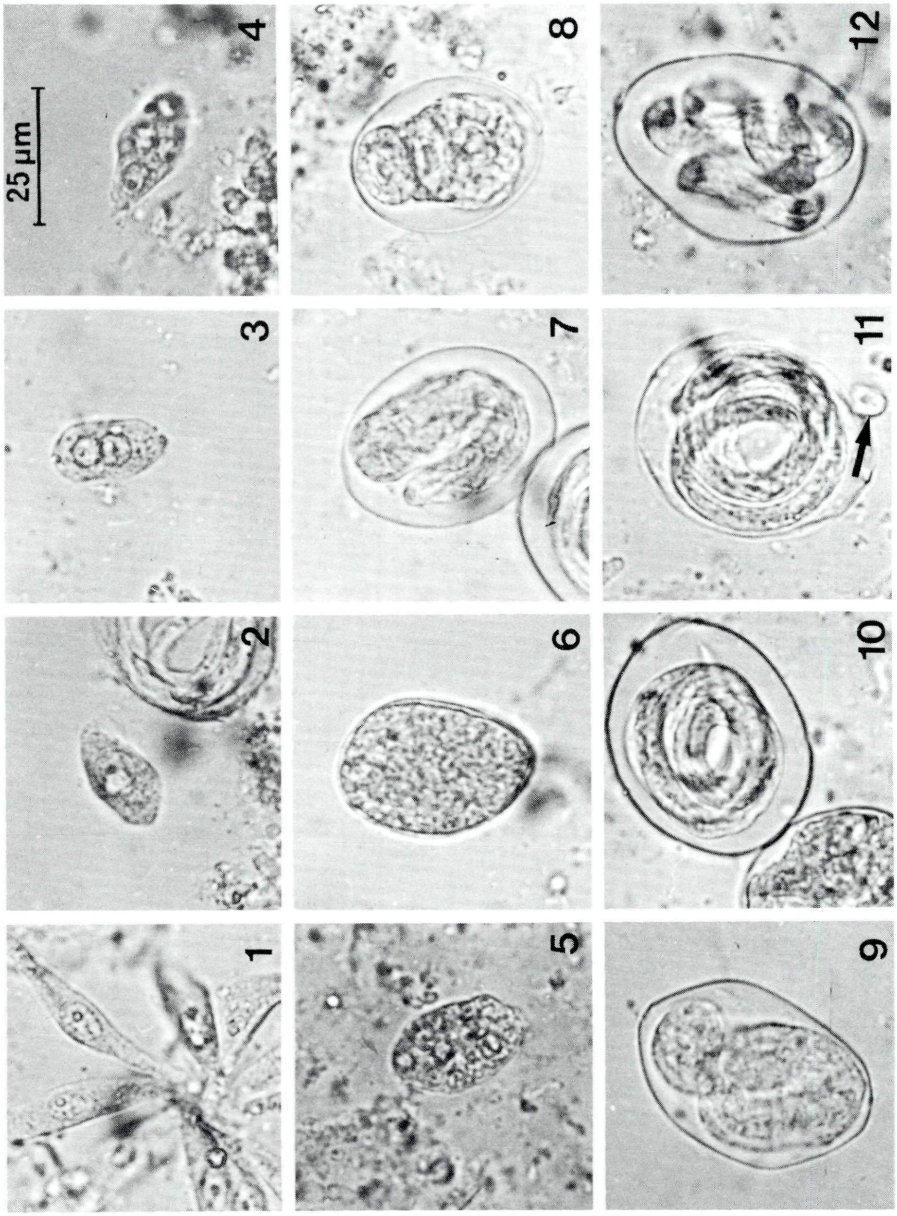

Abb. 1: Embryonalstadien von Onchocerca gibsoni.
Die aufeinaderfolgenden Entwicklungsstadien sind in sechs Gruppen eingeteilt:
Gruppe I umfaßt Oozyten (1), Eier (2) und Zweizellstadien (3)
Gruppe II umfaßt Mehrzellstadien bis zu kleinen Morulae (4, 5)
Gruppe III umfaßt die großen Morulae (6)
Gruppe IV umfaßt die fortgeschrittenen Embryonen (7, 8, 9)
Gruppe V umfaßt die aufgerollten Mikrofilarien (10, 11, 12)
Gruppe VI bilden die gestreckten, aus der Eihülle geschlüpften Mikrofilarien (ohne Abb.)
→ Intrauterines, amöboides Spermium.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

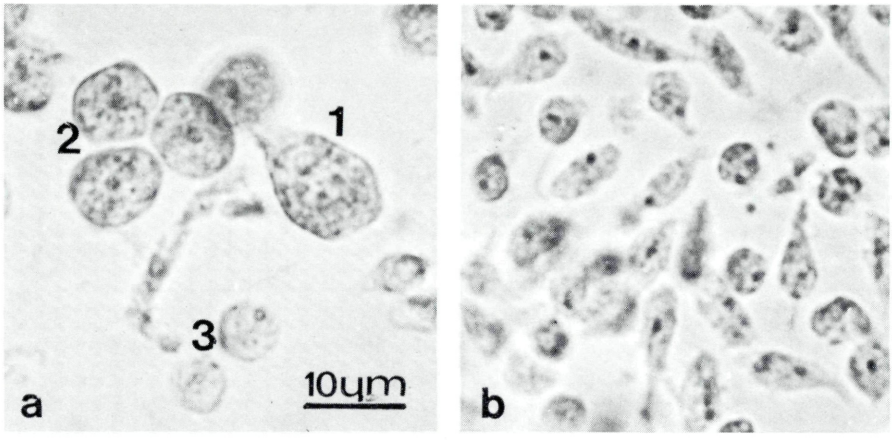

Abb. 2: Spermatogenesestadien von Onchocerca gibsoni
a) Spermatozyten 1. Ordnung (1), Spermatozyten 2. Ordnung (2) und Spermatiden (3).
b) Übertragungsfähige, ovale Spermien aus dem Vesiculum seminis des Männchens. (Stadien nach der Methode von Pappenheim gefärbt, beide Abbildungen im gleichen Maßstab).

Vorgehen bei *O. volvulus* (9) und bei *Litomosoides carinii* (7) eingeteilt (Abb. 1). Um eventuelle Unterbrechungen der Embryonenausbildung zu erfassen, wurden diese Gruppen getrennt quantitativ erfaßt. Die Männchen wurden in toto nach der Methode von PAPPENHEIM gefärbt, auf einem Objektträger zerschnitten unter ein Deckglas gequetscht und die herausquellenden Spermatogenesestadien qualitativ beurteilt (Abb. 2).

Ergebnisse

Nach der getrennten Auswertung für die Gruppen der frischen, tiefgefrorenen und fixierten Knoten wurden für alle Untersuchungskriterien keine signifikanten Unterschiede gefunden und die Ergebnisse daher zusammengefaßt (t-Test, $p = 0{,}05$). Aus 173 untersuchten Knoten wurden 175 weibliche und 163 männliche Filarien isoliert. Der Anteil an degenerierten, d. h. vor dem Entfernen der Knoten aus dem Rind schon toten Filarien, betrug bei den Weibchen 21,7% und bei den Männchen 10,4%. Es wurde nur ein immatures Männchen gefunden (Tab. 1).

80% der Knoten enthielten beide Geschlechter, in den restlichen 20% befanden sich nur Weibchen. Es kamen keine Knoten vor, die ausschließlich mit Männchen besetzt waren. In 21 Knoten wurden zwei Männchen, in einem Knoten drei Männchen gefunden; nur in einem Fall wurden zwei Weibchen in einem Knoten beobachtet. 7 Weibchen, die sich ohne Männchen in einem Knoten befanden, hatten dennoch Embryonalstadien und Mikrofilarien in ihren Uteri, d. h., die Männchen hatten nach der Insemination den Knoten offenbar verlassen.

78,7% aller Weibchen enthielten Embryonalstadien und Mikrofilarien, wobei nur in zwei Fällen eine Unterbrechung bei den aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien beobachtet wurde. Die übrigen Weibchen hatten nur Oozyten oder ihre Uteri waren völlig leer. Einige Weibchen befanden sich offensichtlich am Ende der Reproduktionsphase und hatten nur Oozyten und gleichzeitig Reste von degenerierten Mikrofilarien in ihren Uteri oder nur derartige „Rest-Mikrofilarien".

TABELLE 1

Onchocerca gibsoni: Zusammensetzung der Filarien aus den 173 untersuchten Knoten

MÄNNCHEN: Total 163					
morphologisch intakt isolierte ≙ lebende Männchen	degenerierte ≙ tote Männchen (n/%)	Bei 100 Männchen wurde der Testesinhalt untersucht (n/%): Spermatogenese-stadien und Spermien	Spermatogenese-stadien, aber keine Spermien	Testes leer	immatures Männchen
146	17 / 10,4%	34 / 34%	61 / 61%	4 / 4%	1 / 1%

WEIBCHEN: Total 175						
morphologisch intakt isolierte ≙ lebende Weibchen	degenerierte ≙ tote Weibchen (n/%)	Bei 136 Weibchen wurde der Inhalt der Uteri untersucht (n/%): Embryonen und Mf*	nur Oozyten	leere Uteri	nur Rest-Mf**	Rest-Mf** und Oozyten
137	38 / 21,7%	107 / 78,7%	18 / 13,2%	5 / 3,7%	1 / 0,7%	5 / 3,7%

(* = Mikrofilarien, ** = Reste an degenerierten Mikrofilarien)

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Die intrauterinen Entwicklungsstadien pro Weibchen ergaben im Mittel $1,59 \times 10^6$ Stadien ± 756.000 bei einer Schwankungsbreite von 89.000 bis 3,4 Millionen Embryonalstadien pro Weibchen (n = 88). 4% der Embryonen waren pahologisch verändert. Die intrauterinen amöboiden Spermien konnten nur in ganz frisch isolierten, lebenden Weibchen eindeutg festgestellt und ausgezählt werden. Im Mittel befanden sich 90.000 Spermien in einem Weibchen (n = 19).

Bei etwa einem Drittel der Männchen wurde ein Vorrat an übertragungsreifen Spermien in den Testes nachgewiesen, bei den übrigen Männchen wurden sämtliche Speramtogenesestadien, aber keine Spermien gefunden und einige wenige Männchen hatten völlig leere Testes. Bei diesen handelte es sich um alte Männchen mit Kalkeinlagerungen in Leibeshöhle, Darm oder Testes. Die Anzahl übertragungsreifer Spermien wurde bei 19 Männchen festgestellt und lag im Mittel bei 300.000.

Diskussion

Wir haben Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *O. gibsoni* und *O. volvulus* hinsichtlich der Reproduktivität herausgearbeitet, um den Wert des *O.-gibsoni*-Modells für die menschliche Onchozerkose besser beurteilen zu können.

In den *O.-gibsoni*-Knoten wurde ein auffallend ausgeglichenes Geschlechtsverhältnis festgestellt, während es bei *O.-volvulus*-Knoten deutlich zugunsten der Weibchen verschoben ist. *O.-volvulus*-Männchen verlassen regelmäßig die Knoten und können deshalb bei Nodulektomien teilweise nicht erfaßt werden. *O.-gibsoni*-Männchen scheinen ebenfalls, wenn auch nicht so häufig, zu wandern, wie die Knoten mit graviden, solitären Weibchen zeigen.

Der Prozentsatz degenerierter, d. h. vor dem Entfernen der Knoten abgestorbener Filarien, liegt bei den Weibchen weitaus höher als bei den Männchen. Männchen sterben möglicherweise auch außerhalb des Knotens und haben eine geringere und somit wohl schneller resorbierbare Körpermasse. *O.-gibsoni*-Männchen sind im Mittel 4,3 cm lang, die ausgewachsenen Weibchen dagegen weit über 100 cm (2).

O.-volvulus-Weibchen haben eine sehr lange Lebenserwartung von 11 - 12 Jahren und die Ausbildung der Mikrofilarien verläuft nicht kontinuierlich, sondern in dreimonatigen Reproduktionsschüben mit dazwischenliegenden Ruhephasen (9, 10). *O. gibsoni* hat eine erheblich kürzere Lebenserwartung von nur 18 Monaten (COPEMAN, persönliche Mitteilung). Nur bei zwei Weibchen wurde eine Lücke zwischen den aufeinanderfolgenden Embryonalstadien entdeckt, die auf eine periodische Ausschüttung der Mikrofilarien hindeuten würde. Nur 20% der Weibchen standen am Beginn oder am Ende der Reproduktion, da sie entweder nur Oozyten oder degenerierte Mikrofilarien enthielten. Der Hauptanteil von fast 80% der Weibchen hatte sämtliche embryonale Stadien in den Uterusschläuchen. Im Gegensatz dazu findet man bei *O. volvulus* nur 50 - 60% der Weibchen mit Embryonalstadien, während sich die übrigen Weibchen in einer Ruhephase zwischen zwei Reproduktionsschüben befinden. Eine zyklische Ausbildung von Mikrofilarien ist demnach für *O. gibsoni* nicht anzunehmen.

Die Uteri von *O. gibsoni* enthalten im Mittel sechsmal mehr Entwicklungsstadien als die von *O. volvulus* , sind aber auch mehr als dreimal so lang. Embryonalstadien und Spermatogenesestadien beider *Onchocerca*-Arten sind sich morphologisch sehr ähnlich. Die ovalen Spermien aus dem Männchen wandeln sich nach der Insemination innerhalb des weiblichen Geschlechtstraktes zu amöboiden befruchtungsfähigen

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Spermien um und müssen entgegen dem Strom der Embryonen die Länge der Uteri bis zum Eintritt der Ovidukte durchqueren, was bei *O. gibsoni* gut einen Meter ausmachen kann.

Bei *O. volvulus* sind für jeden neuen Reproduktionszyklus mehrere Inseminationen notwendig. Um alle Embryonen entwickeln zu können, sind auch bei *O. gibsoni* wiederholte Inseminationen erforderlich. Ob Inseminationen nur vor der Reproduktionsphase oder aber auch während der Gravidität der Weibchen erfolgen kann, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Ein auffallend hoher Anteil der Männchen enthielt nur Spermatiden, aber keine Spermien. Diese sehen wir — wie schon bei *O. volvulus* gezeigt (6) — als die gerade fortpflanzungsaktiven Männchen an.

O. gibsoni und *O. volvulus* zeigen hinsichtlich der Reproduktivität zahlreiche Gemeinsamkeiten. So verwundert es nicht, daß die Wirkung von Medikamenten auf die Embryogenese bei beiden Arten im allgemeinen gleich ausfällt (4).

Zusammenfassung

In 173 *O.-gibsoni*-Knoten aus australischen Rindern wurden 175 Weibchen und 163 Männchen gefunden, von denen 21,7% bzw. 10,4% degeneriert waren. 78,7% der lebenden Weibchen enthielten Embryonen, 61,0% der Männchen waren gerade fortpflanzungsaktiv. Gravide Weibchen enthielten im Mittel $1{,}59 \times 10^6 \pm 756.000$ intrauterine Entwicklungsstadien, Männchen durchschnittlich 300.000 Spermien. Periodische Reproduktionszyklen, wie sie für *O. volvulus* typisch sind, konnten für *O. gibsoni* nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigen die Untersuchungen, daß auch hinsichtlich der Reproduktivität ausreichend Gemeinsamkeiten bestehen. Somit kann man *O. gibsoni* für die Erprobung neuer Medikamente gegen *O. volvulus* als ein geeignetes Modell ansehen.

Schlüsselwörter

Fortpflanzungsbiologie, Tiermodell, Medikamenten-screening, Australien.

Summary

Investigations on reproductivity of Onchocerca gibsoni, a bovine filarial parasite.

Reproductivity of *Onchocerca gibsoni,* a filarial parasite of cattle. 173 nodules of *O. gibsoni* from Australian cattle contained 175 female and 163 male worms. 21.7% of the feamales and 10.4% of the males were degenerated. 78.7% of the living females had embryos in their uteri and 61.0% of the living males were reproductively active,
i. e. they had just transfered their sperm during mating. Gravid female worms contained on average $1.59 \times 10^6 \pm 756{,}000$ developmental stages, male worms on average 300,000 spermatozoa. Periodical reproductive cycles as observed for *O. volvulus* could not be proved for *O. gibsoni.* Nevertheless the investigations confirm in general that the *O. gibsoni* model is suitable for the screening of new drugs against *O. volvulus.*

Key words

Reproduction, animal model, drug screening, Australia.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Danksagung

Für die Anregung für diese Untersuchung danken wir Dr. D. B. Copeman, Townsville. Diese Arbeit wurde von der Europäischen Gemeinschaft und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterstützt.

Literatur

1. BERVERIDGE, I., KUMMEROW, E. L., WILKINSON, P. (1980): Observations on Onchocerca gibsoni and nodule development in naturally-infected cattle in Australia. Tropenmed. Parasit. 31, 75-81.
2. BAIN, O., BEVERIDGE, I. (1979): Redescription d'Oncocerca gibsoni C. et J., 1910. Ann. Parasit. 54, 69-80.
3. COPEMAN, D. B. (1979): An evaluation of bovine — Onchocerca gibsoni, Onchocerca gutturosa model as a tertiary screen for drugs against Onchocerca volvulus in man. Tropenmed. Parasit. 30, 469-474.
4. COPEMAN, D. B., VANKAN, D. M., NOWACK (1986): Bovine Onchocerca species are good chemotherapeutic models for Onchocerca volvulus. VI. Int. Congr. Parasitology, Brisbain, Australien, 1986, Handbook, 115.
5. HUTCHINSON, G. W. (1986): Onchocerciasis research in North Queensland. Parasit. Today 2 (H. 7), Australien Suppl., 14-15.
6. KLÄGER, S., KARAM, M., SCHULZ-KEY, H. (1985): The reproductivity of male Onchocerca volvulus in areas with and without vector control. Tropeumed. Parasit. 36, 21.
7. MÖSSINGER, J., WENK, P. (1986): Fecundity of Litomosoides carinii (Nematoda, Filarioidea) in vivo and in vitro. Z. Parasitenkd. 72, 121-131.
8. SCHULZ-KEY, H., ALBIEZ, E. J., BÜTTNER, D. W. (1977): Isolation of living Onchocerca volvulus from nodules. Tropenmed. Parasit. 28, 428-430.
9. SCHULZ-KEY, H., JEAN, B., ALBIEZ, E. J. (1980): Investigation on female Onchocerca volvulus for evaluation of drug trails. Tropenmed. Parasit. 31, 34-40.
10. SCHULZ-KEY, H., KARAM, M. (1986): Periodical reproduction of Onchocerca volvulus. Parasit. Today 2, 284-286.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl. Biol. Sabine Kläger
Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen

Wilhelmstraße 31
D-7400 Tübingen

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: 9

Autor(en)/Author(s): Kläger Sabine, Vancan Diana, Höflacher Roswitha, Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: Untersuchungen zur Reproduktivität von Onchocerca gibsoni, einer Filarie des Rindes. 195-201