

## Empfänglichkeit von *Culicoides nubeculosus* und *Odamia ornata* für Mikrofilarien von *Onchocerca gutturosa* und *Onchocerca lienalis*

Jutta Blinn, J. Dohnal, G. Wahl

### Einleitung

In der Onchozerkoseforschung besteht heute ein großer Bedarf an dritten Larven von *O. volvulus* zur Beantwortung immunologischer, biochemischer und parasitologischer Fragestellungen. Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, diesen Parasiten im Labor zu etablieren. Gerade die Haltung seiner Vektoren — Simuliiden des *damnosum*-Komplexes — erwies sich als sehr schwierig (12, 5). Die Entwicklung von *in vitro*-Kulturen zur Gewinnung bestimmter Stadien zeigte bisher ebenfalls noch nicht den gewünschten Erfolg (13, 6).

Nahe verwandte Arten des Humanparasiten, wie *O. gutturosa* und *O. lienalis* in unseren einheimischen Rindern, haben so zunehmend an Interesse gewonnen. Ihre Mikrofilarien aus den Fellen frisch geschlachteter Weidetiere sind relativ einfach zu gewinnen. Als Überträger kommen Simuliiden und Ceratopogoniden in Betracht (2). Es wird versucht, auf diese Rinderfilarien auszuweichen und die dabei gewonnenen Ergebnisse auf *O. volvulus* zu übertragen.

Die vorliegende Arbeit sollte die Entwicklungsfähigkeit der Mikrofilarien in den Vektoren untersuchen. Weiterhin sollte sie zur Klärung der Frage beitragen, ob sich die Filarien jeweils artspezifisch nur in *O. ornata* bzw. *C. nubeculosus* entwickeln oder von beiden übertragen werden können. Dazu wurden beide Vektoren mit frisch isolierten oder kryokonservierten Mikrofilarien infestiert.

### Methoden

#### Herkunft der Parasiten

Am Schlachthof Tübingen wurde aus dem Nabel- und dem Nackenbereich frisch geschlachteter Weidetiere je eine Hautprobe entnommen und auf Mikrofilarien untersucht. Mikrofilarienpositive Hautstücke wurden rasiert, skarifiziert und bei Raumtemperatur in RPMI 1640 (+ HEPES, Glutamin, 200 iu/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin, 10% FCS) bis zu zwölf Stunden inkubiert. Das Inkubationsmedium mit den ausgewanderten Mikrofilarien wurde anschließend durch einen Filter passiert (4) und dann 10 min bei 700 g zentrifugiert. Die so konzentrierten Mikrofilarien wurden zur Membranfütterung in defibriniertem Rinderblut und zur intrathorakalen Injektion in Graces Insect Tissue Medium (+ 100 iu/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 u/ml Amphotericin B, 20% FCS) resuspendiert.

Mikrofilarien, die nicht sofort weiterverwendet werden konnten, wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (9).

#### Fütterung von *C. nubeculosus* an der künstlichen Membran

Zwei bis drei Tage alte Weibchen von *C. nubeculosus* (Laborzucht) wurden über eine künstliche Membran (Latexmembran) infestiert (7): Nach einer 24- bis 48stündigen Hungerperiode wurde den Mücken eine Suspension aus defibriertem Rinderblut und Mikrofilarien durch eine Latexmembran angeboten (8). Die Bluttemperatur betrug 37° C, die Mikrofilariendichten lagen zwischen 40 und 1200 Mf/ $\mu$ l Blut.

Alle Mücken, die Blut aufgenommen hatten, wurden in gazebespannte Käfige (12 × 12 × 12 cm) gebracht und bei vierzehnstündiger Neonbeleuchtung, 25° C und einer Luftfeuchte von 80-90% gehalten.

Während der ersten 24 Stunden *post infestationem* (p. i.) wurden zwischen 5 und 36 Mücken seziiert, um die mittlere Mikrofilarienaufnahme zu bestimmen.

#### Intrathorakale Injektion von Mikrofilarien in *O. ornata*

Aus einem für *O. ornata* monospezifischen Brutgewässer wurden Puppen abgesammelt und im Labor zum Schlüpfen gebracht. Vor der Injektion wurden die Mücken einen Tag mit 10%iger Honiglösung + Methyl-4-hydroxybenzoat (0,2% [w/v], 200 iu/ml Penicillin, 200  $\mu$ g/ml Streptomycin) gefüttert. Zur Injektion wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> betäubt. Unter einem Binokular wurde ihnen dann eine definierte Menge an Mikrofilarien durch die Pleuralmembran injiziert. Die dazu verwendeten Haematokritkapillaren hatten einen Durchmesser von 40-80  $\mu$ m. Die Mücken wurden einzeln in Plastikröhrchen (4ml) mit Gazeverschluß bei 70-80% relativer Luftfeuchte und 25-27° C im Dunkeln gehalten. Für zwei Stunden pro Tag wurden die Mücken dem Licht ausgesetzt.

#### Präparation der infestierten Mücken

Täglich wurden Mücken abgesammelt. Kopf, Thorax und Abdomen wurden in separaten Salinetropfchen zerzupft und auf parasitäre Entwicklungsstadien untersucht.

Zur Berechnung der mittleren Entwicklungsrate der Mikrofilarien in den Mücken wurden die dritten Larven der nach neun Tagen (und später) seziierten Tiere herangezogen.

## Ergebnisse

Von 438 untersuchten Weidetieren wiesen 40,4% Mikrofilarien in der Haut auf. Die Mikrofilarien fanden sich bei 38,6% nur am Nabel, bei 11,6% nur am Nacken und bei 7,5% der Tiere in beiden Hautpartien.

#### Empfänglichkeit der Vektoren

Aus den Hautproben von 20 Weidetieren konnten genügend Mikrofilarien isoliert werden, um damit insgesamt 26 Infestationsversuche mit *C. nubeculosus* und/oder *O. ornata* durchzuführen. Bei beiden Dipterenarten fanden sich die ersten dritten Larven acht Tage p. i.

In sechs von sieben Injektionsversuchen mit Mikrofilarien aus dem Nabelbereich entwickelten sich in *O. ornata* dritte Larven, die aufgrund ihrer Morphologie als *O. lienalis* bestimmt wurden. In neun von sechzehn Versuchen, in denen *C. nubeculosus* Mikrofilarien über eine Membran angeboten wurden, entwickelten sich dritte Larven mit einer für *O. gutturosa* charakteristischen Morphologie.

In drei weiteren Versuchen konnten *C. nubeculosus* Mikrofilarien aus der Nackenregion angeboten werden. In zwei dieser Versuche kam es zur Entwicklung dritter Larven, die als *O. guttuosa* bestimmt wurden.

Mit Mikrofilarien aus sechs Hautproben der Nabelregion konnten beide Vektoren parallel infestiert werden. In vier dieser Versuche entwickelten sich dritte Larven ausschließlich in *O. ornata*, einmal nur in *C. nubeculosus*. In einem weiteren Versuch wiesen beide Überträger dritte Larven auf. In Abhängigkeit vom jeweiligen Vektor konnten die dritten Larven klar unterschieden werden: *O. lienalis* entwickelte sich nur in *O. ornata* und *O. guttuosa* nur in *C. nubeculosus*.

#### Maße der dritten Larven

Aufgrund der Lage verschiedener morphologischer Strukturen (Nervenring, Analporus usw.) (3) und der Maße der dritten Larven konnten diese eindeutig *O. guttuosa* oder *O. lienalis* zugeordnet werden.

Von den dritten Larven, die sich in *O. ornata* entwickelten, konnten 74 vermessen werden. Ihre mittlere Länge betrug  $506,2 (\pm 38,0) \mu\text{m}$  bei einem Durchmesser von  $16,6 (\pm 1,3) \mu\text{m}$  (Schwankungsbereich:  $416,5\text{-}583,3 \mu\text{m} \times 13,1\text{-}20,2 \mu\text{m}$ ). In der Literatur wird die Länge von *O. lienalis* mit  $431,6 \mu\text{m}$  (9),  $540,0\text{-}563,0$  bzw.  $650,0 \mu\text{m}$  (3) angegeben.

Die in *C. nubeculosus* gefundenen Larven waren im Mittel  $769,0 (\pm 9,7) \mu\text{m}$  lang und hatten einen Durchmesser von  $19,2 (\pm 0,3) \mu\text{m}$  ( $n = 51$ , Schwankungsbereich:  $609,0\text{-}871,5 \mu\text{m} \times 13,1\text{-}24,2 \mu\text{m}$ ). Dies deckt sich mit den für *O. guttuosa* bekannten Angaben  $837$  ( $680\text{-}900 \mu\text{m} \times 18,2$  ( $17\text{-}19 \mu\text{m}$ ) (3).

#### Entwicklungserfolg zu dritten Larven in den Vektoren

Rund 48% der infestierten *C. nubeculosus* und *O. ornata* lebten bis zum neunten Tag p. i. Dieser Zeitraum genügt, um bei den gegebenen Temperaturen eine Entwicklung der Mikrofilarien bis zur dritten Larve zu gewährleisten (Tab. 1). Insgesamt wurden in 57 infestierten Simuliiden 385 und in 76 Ceratopogoniden 106 dritte Larven gefunden.

In *C. nubeculosus* gelang es lediglich 10-20% der Mikrofilarien die peritrophische Membran zu durchdringen. Nur rund zwei Prozent der aufgenommenen Mikrofilarien entwickelten sich zu dritten Larven. Beim Vergleich frisch angebotener mit zuvor kryokonservierten Mikrofilarien zeigt sich, daß mehr kryokonservierte Mikrofilarien aufgenommen werden. Es gelang jedoch nur etwa halb sovielen, in den Thorax vorzudringen, bzw. sich zu dritten Larven zu entwickeln, wie nach einer Infestation mit frischen Mikrofilarien.

Das gleiche Bild ergab sich nach intrathorakaler Injektion, auch hier entwickelten sich aus frisch verabreichten Mikrofilarien fast doppelt sovielen dritte Larven wie nach vorangegangener Kryokonservierung. Insgesamt wurden in den Injektionsversuchen rund zehnmal mehr dritte Larven gefunden als nach Membranfütterung.

## Diskussion

Es war aus arbeitstechnischen Gründen am Schlachthof nicht möglich, die Weidetiere auch auf Adultwürmer hin zu untersuchen. Eine Artbestimmung allein auf der Basis der isolierten Mikrofilarien läßt sich nur schwer durchführen. Dazu müssen große Mengen an Mikrofilarien vermessen und anschließend statistisch ausgewertet oder mittels der sauren Phosphatase-Technik angefärbt werden (14). Wesentlich klarere Artkriterien finden sich bei den dritten Larven (3).

TABELLE 1

**Entwicklung von Rindermikrofilarien aus dem Nabelbereich nach Infestation von *C. nubeculosus* und eine Membran bzw. von *O. ornata* durch intratorakale Injektion**  
(Mf = Mikrofilarien · L3 = dritte Larven · fr. = Frisch infestiert · kryo. = vor der Infestation kryokonserviert · d.p.i. = Tage nach Infestation)

	Infestation von <i>C. nubeculosus</i>			Infestation von <i>O. ornata</i>	
	fr. Mf ■	fr. Mf ●	kryo. Mf ●	fr. Mf ▲	kryo. Mf ●
<u>Infestation des Vektors</u>					
Anzahl verwendeter Mf-Proben (= Zahl der Versuche)	1	4	3	1	3
Gesamtzahl der infestierten Vektoren	69	239	497	57	122
<u>Aufnahme u. Wanderung der Mf</u>					
mittlere Mf-Aufnahme (Standardabweichung)	12,1 (±0,3)	15,0 (±2,1)	51,7 (±8,3)	27,5 (±13,6)	26,7 (±9,3)
mittlere Anzahl der Mf, die den Thorax erreichten (% der aufgenommenen Mf)	1,3 (11)	2,4 (16)	3,1 (6)	— —	— —
<u>Wiedergefundene L3</u>					
Zahl der 9 d.p.i. noch lebenden Vektoren (%)	20 (44)	39 (39)	132 (52)	28 (49)	57 (47)
Zahl der Vektoren L3	3	9	64	22	35
Gesamtzahl gefundener L3	5	14	87	171	214
Entwicklungsrate der auf- genommenen/injizierten Mf zu L3 in %	2,1	2,4	1,3	22,2	14,1

- = Reine *O. gutturosa*-Population, da bei Injektionsversuch in *O. ornata* mit Mf der gleichen Probe keine Entwicklung beobachtet werden konnte.
- = Keine Aussage über die Zusammensetzung der Mf-Population möglich, da nur in einem Vektor auf Entwicklung getestet.
- ▲ = Reine *O. lienalis*-Population, da bei Infestation von *C. nubeculosus* mit Mf der gleichen Probe keine Entwicklung beobachtet werden konnte.

In unseren Untersuchungen lagen die Maße aller in *O. ornata* gefundenen dritten Larven in einem Bereich, der in der Literatur als charakteristisch für *O. lienalis* angegeben wird. Demgegenüber fanden sich in *C. nubeculosus* nur dritte Larven, deren Morphologie auf *O. gutturosa* hinweist.

Die Beobachtung, daß sich dritte Larven von *O. lienalis* nur in *O. ornata* und von *O. gutturosa* nur in *C. nubeculosus* entwickelten, stimmt mit der These von MULLER (10) überein. Dieser postulierte, daß alle bisher bekannten Filarien der Gattung *Onchocerca* entweder nur von Simuliiden oder nur von Ceratopogoniden übertragen werden. Diese Vektorspezifität könne demnach als zusätzliches Kriterium zur Unterscheidung der Arten herangezogen werden.

In den Versuchen, in denen wir beide Vektoren parallel mit Mikrofilarien gleicher Herkunft infestierten, war es möglich, rückblickend festzustellen, daß vier der Weidetiere am Nabel nur mit *O. lienalis*, eines nur mit *O. guttuosa* und ein weiteres mit beiden Filarien infiziert waren.

In allen weiteren Versuchen, in denen jeweils nur einer der Vektoren infestiert werden konnte, gab die Entwicklung bzw. Nichtentwicklung nur Auskunft über das Vorhandensein oder Fehlen einer Filarienart. Mögliche Doppelinfektionen konnten so nicht nachgewiesen werden.

Unsere Untersuchung lieferte auch weitere Informationen über die Mikrofilarienverteilung in den Körperregionen der untersuchten Weidetiere. Die Ergebnisse widersprechen einer artspezifischen Mikrofilarienverteilung von *O. lienalis* nur am Nabel und *O. guttuosa* nur am Nacken, wie sie von BAIN (2) beschrieben wurde. Über die Hälfte der Nabelproben enthielten auch, in einem Falle sogar ausschließlich, *O. guttuosa*-Mikrofilarien. Dies stützt Befunde von TREES (14) und FAHRNER (8), denen zufolge beide Filarienarten am Nabel gemeinsam vorkommen können.

Sowohl die Membranfütterung als auch die intrathorakale Injektion sind wichtige Methoden, um die Entwicklung von Filarien in den *Onchocerca*-Vektoren zu verfolgen. Zum Transport und zur Lagerung können die Mikrofilarien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bei Bedarf aufgetaut und dann infestiert werden.

Ein Vorteil der intrathorakalen Injektion ist der wesentlich geringere Mikrofilarienbedarf. Außerdem bietet sich diese Infestationsmethode dann an, wenn die Vektoren unter Laborbedingungen kein Blut aufnehmen. Auch können Insekten, die nicht als natürliche Überträger in Betracht kommen, als Surrogatvektoren eingesetzt werden.

Bei dieser Methode ist auch eine höhere Entwicklungsrate zu erwarten, da die Mikrofilarien hier direkt in den Thorax gelangen, ohne die peritrophische Membran durchdringen zu müssen. Der Entwicklungserfolg ist allein von den physiologischen Bedingungen in der Muskulatur abhängig. Kommt es bei dieser Infestationsmethode nicht zu einer Weiterentwicklung der Mikrofilarien zu dritten Larven, können die getesteten Insekten als natürliche Vektoren nahezu ausgeschlossen werden.

Die Membranfütterung entspricht dem natürlichen Infestationsweg. Eventuell vorhandene Pharyngealbewehrung und die peritrophische Membran verhindern oder beeinträchtigen zumindest das Vordringen der Mikrofilarien in den Thorax (11). Die Entwicklung von dritten Larven nach Membranfütterung kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß der betreffende Vektor auch im natürlichen System den jeweiligen Parasiten übertragen kann, sofern Wirtspräferenz und Anflugverhalten der Insekten dem nicht widersprechen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stützen frühere Befunde, nach denen *C. nubeculosus* als natürlicher Überträger von *O. guttuosa* in Europa in Betracht kommt (1, 8). Dies müßte durch Feldstudien noch eindeutig abgeklärt werden.

## Zusammenfassung

Am Schlachthof Tübingen untersuchte Hautproben aus dem Nabel- und Nackenbereich von 438 Weidetieren waren zu 40,4% mit Mikrofilarien infiziert. Die Frage, ob die Tiere mit *O. guttuosa* oder *O. lienalis* oder beiden Arten infiziert waren, ist auf der Basis der Mikrofilarien allein nur schwer zu beantworten. Zur Artbestimmung wurden retrospektiv die sich in *O. ornata* bzw. *C. nubeculosus* entwickelnden dritten Larven herangezogen. Diese sind anhand ihrer Morphologie deutlich zu unterscheiden.

In neun von sechzehn Versuchen mit Mikrofilarien aus dem Nabelbereich entwickelten sich nach Membranfütterung in *C. nubeculosus* dritte Larven von *O. guttuosa*. Bei sie-

ben weiteren Proben, deren Mikrofilarien in *O. ornata* intrathorakal injiziert wurden, fanden sich sechsmal dritte Larven von *O. lienalis*.

Vektorspezifität: Mit Mikrofilarien aus sechs Hautproben des Nabelbereiches konnten beide Vektoren parallel infestiert werden. Dritte Larven von *O. lienalis* fanden sich nur in *O. ornata*, während die dritten Larven in *C. nubeculosus* ihrer Morphologie nach *O. gutturosa* zuzuordnen waren. Die Nabelproben dieser sechs Tiere enthielten viermal nur *O. lienalis*, einmal nur *O. gutturosa* und einmal Mikrofilarien beider Arten.

Kryokonservierte Mikrofilarien entwickelten sich nur etwa halb so oft zu dritten Larven wie frisch angebotene. Der Entwicklungserfolg zu dritten Larven lag nach intrathorakaler Injektion rund zehnmal höher als nach Membranfütterung, bei der die Mikrofilarien dem natürlichen Infestationsweg folgen und erst die peritrophische Membran durchdringen müssen, bevor sie in den Thorax gelangen.

## Schlüsselwörter

Membranfütterung, intrathorakale Injektion, Rinderfilarien, infektiöse Larven, Vektoren.

## Summary

### Susceptibility of *Culicoides nubeculosus* and *Odagmia ornata* to microfilariae of *Onchocerca gutturosa* and *Onchocerca lienalis*

In South West Germany bovine *O. gutturosa* and *O. lienalis* are endemic. At the abattoir of Tübingen 40,4% of umbilical and cervical skin samples taken from 438 freshly slaughtered pasture cattle contained microfilariae. The differentiation of both microfilariae based on morphological criteria renders different. However, third stage larvae are clearly distinguishable by their morphology. We determined the species retrospectively using third stage larvae that had developed in *O. ornata* respectively *C. nubeculosus*.

With microfilariae from the umbilical region in 9 of 16 trials third stage larvae of *O. gutturosa* were found in *C. nubeculosus* after membrane feeding. After intrathoracic injection in 6 of 7 trials third stage larvae of *O. lienalis* were obtained in *O. ornata*.

With 6 skin samples of the umbilical region it was possible to infest both vectors parallelly. Third stage larvae of *O. lienalis* were only observed in *O. ornata* while all third stage larvae from *C. nubeculosus* had a morphology characteristic for *O. gutturosa*. So we could confirm that the umbilical samples of these animals contained four times only *O. lienalis*, once only *O. gutturosa* and in another case both species.

Cryopreservation is a good technique to store and to transport microfilariae although the capability of subsequent development to third stage larvae is limited. After intrathoracic injection ten times more microfilariae developed to third stage larvae than after membrane feeding after which they have to penetrate the peritrophic membrane.

## Key words

Membrane feeding, intrathoracic injection, bovine filariae, infective larvae, vectors.

## Literatur

1. BAIN, O. (1979):  
Transmission de l'Onchocerca bovine, *Onchocerca gutturosa*, par *Culicoides*.  
*Ann. Parasit. Hum. Comp.* 54, 483-488.
2. BAIN, O., PETIT, G., POULAIN, B. (1978):  
Validité des deux espèces *Onchocerca lienalis* et *O. gutturosa* chez les Bovins.  
*Ann. Parasit. Hum. Comp.* 53, 421-430.
3. BAIN, O., CHABAUD, A. G. (1986):  
Atlas des larves infestées de filaires. *Trop. Med. Parasit.* 37, 301-340.
4. BIANCO, A. E., HAM, G. S., EL SINNARY, K., NELSON, G. S. (1980):  
Large scale recovery of *Onchocerca microfilariae* from naturally infected cattle and horses.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 109-110.
5. CUPP, E. W., LOK, J. B., BERNARDO, M. J., POLLACK, R. J., SCOLES, G. A. (1981):  
Complete generation rearing of *Simulium damnosum* s. l. (Diptera: Simuliidae) in the laboratory.  
*Zeitschr. Tropenmed. und Parasit.* 32, 119-122.
6. DEVANEY, E., HOWELLS, R. E. (1983):  
The differentiation of microfilariae of *Onchocerca lienalis* in vitro.  
*Annals Trop. Med. Parasitol.* 77, 103-105.
7. FAHRNER, J., BARTHELMESS, E. (1988):  
Rearing of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) by natural or artificial feeding in the laboratory.  
*Vet. Parasitol.* 28, 307-313.
8. FAHRNER, J., VANKAN, D., SCHULZ-KEY, H. (1988):  
Ingestion of microfilariae from different sources by *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) through an artificial membrane.  
*Vet. Parasitol.* 28, 315-320.
9. HAM, P. J., TOWNSON, S., JAMES, E. R., BIANCO, A. E. (1981):  
An improved technique for the cryopreservation of *Onchocerca microfilariae*.  
*Parasitol.* 83, 139-146.
10. MULLER, R. (1979):  
Identification of *Onchocerca*.  
*Symp. Brit. Soc. Parasitol.* (ed. A. E. R. Taylor, R. Muller, Oxford 9 Blackwell) 17, 175-206.
11. OMAR, M. S., GARMS, S. (1975):  
The fate and migration of microfilariae of a Guatemalan strain of *Onchocerca volvulus* in *Simulium ochraceum* and *S. metallicum* and the role of the buccopharyngeal armature in the destruction of microfilariae.  
*Z. Tropenmed. Parasit.* 26, 183-190.
12. RAYBOULD, J. N., GRUNEWALD, J. (1975):  
Recent progress towards the laboratory colonization of African Simuliidae.  
*Zeitschr. Tropenmed. und Parasit.* 26, 155-168.
13. SCHILLER, E. L., TURNER, V. M., MARROQUIN, H. F., D'ANTONIO, R. (1979):  
The cryopreservation and in vitro cultivation of larval *Onchocerca volvulus*.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 997-1009.
14. TREES, A. J., MC CALL, P. J., CROZIER, S. J. (1987):  
Onchocerciasis in British cattle: a study of *Onchocerca gutturosa* and *O. lienalis* in North Wales. *J. Helm.* 61, 103-113.

## KORRESPONDENZADRESSE:

Jutta Blinn

Tropenmedizinisches Institut der Universität Tübingen

Wilhelmstraße 31

D-7400 Tübingen · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Blinn Jutta, Dohnal J., Wahl G.

Artikel/Article: [Empfänglichkeit von \*Culicoides nubeculosus\* und \*Odamiga ornata\* für Mikrofilarien von \*Onchocerca gutturosa\* und \*Onchocerca lienalis\*. 95-102](#)