

Onchocerca ochengi in afrikanischen Rindern als Screening-Modell für filarizide Substanzen

H. Schulz-Key, G. Wahl, Sabine Kläger, A. Renz¹

Einleitung Durch den Einsatz des Ivermectin (Mectizan®) hat die Behandlung der Onchozerkose einen entscheidenden Durchbruch erfahren. Mit einer einzigen oralen Dosis von 150 µg/kg Körpergewicht lassen sich die Mikrofilariendichten in der Haut für viele Monate unterdrücken, die sehr langlebigen adulten Filarien allerdings nicht eliminieren. Sie sind nach einem längeren Intervall wieder in der Lage, neue Mikrofilarien in den Wirt zu entlassen (5). Daher sind für eine längerfristige chemotherapeutische Bekämpfung der Onchozerkose regelmäßige Nachbehandlungen notwendig. Sie in endemischen Onchozerkosegebieten in großem Maßstab zu organisieren, erfordert eine gute Infrastruktur des Public Health und eine große Compliance der Bevölkerung. Erste Erfahrungen haben gezeigt, wie schwierig solche Massenkampagnen in der Praxis durchzuführen sind (2). Daher hält die Suche nach einem makrofilariziden Medikament, das auch die adulten Filarien abtötet und somit nur eine einmalige Applikation notwendig macht, an. Für ihre Entwicklung werden geeignete Screeningmöglichkeiten gebraucht.

Wegen der ausgeprägten Wirtsspezifität von *Onchocerca volvulus* gibt es für diesen Parasiten kein direktes Screening-Modell in einem Labortier. Wir sind somit auf alternative Filarienmodelle angewiesen. Die nächsten Verwandten des Humanparasiten, andere Arten der Gattung *Onchocerca*, finden wir in Wiederkäuern, z. B. in Rindern (Abb. 1), die wegen ihrer Größe und der physiologischen Besonderheiten ihres Darmtrakts für Chemotherapieversuche aber sehr ungünstig sind. Daher müssen alle Testsubstanzen zunächst einfachere Screening-systeme, sogenanntes „primäres“ und „sekundäres“ Screening durchlaufen, bevor sie in fortgeschrittener Testphase an Rindern erprobt werden können (Tab. 1). Bisher wurden für ein solch „tertiäres“ Screening Rinder in Australien verwendet, die dort regelmäßig mit *Onchocerca gibsoni* infiziert sind. Erst in jüngster Zeit fand die Filarie *Onchocerca ochengi* der afrikanischen Rinder als Alternative für bisherige Screeningmodelle ein Interesse. Beide Rinderfilarien erfüllen die wichtige Voraussetzung, ähnlich wie der Humanparasit in Bindegewebsknoten eingeschlossen und dadurch für ein Medikament nicht ohne weiteres erreichbar zu sein, denn das Onchozerkom stellt aus pharmakologischer und chemotherapeutischer Sicht besondere Anforderungen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob *O. ochengi* in afrikanischen Rindern das australische Screeningmodell der WHO ergänzen oder gar ersetzen kann.

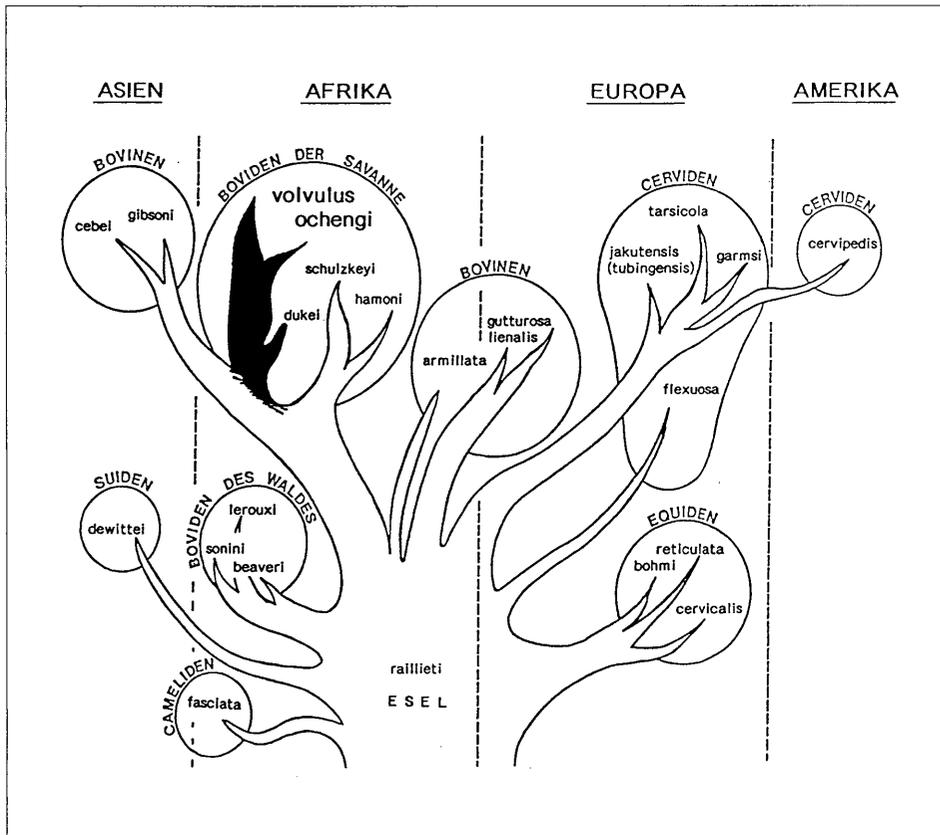


Abbildung 1:
Hypothetischer Stammbaum der Gattung *Onchocerca* (nach BAIN 1981; verändert)

Tabelle 1:
Filarienarten und ihre Wirte, die für ein Screening neuer filarizider Medikamente verwendet werden. (* Für die WHO inzwischen nicht mehr offizielles Screening-Modell.)

Screening-Modelle für filarizide Substanzen	
1.	Primäres Screening <i>Acanthocheilonema viteae</i> in <i>Meriones</i> (Blutmikrofilarien) <i>Monanema viteae</i> in <i>Lemniscomys striatus</i> (Hautmikrofilarien) <i>Litomosoides carinii</i> in <i>Sigmodon hispidus</i> (Blutmikrofilarien)*
2.	Sekundäres Screening <i>Brugia pahangi</i> in Katzen (Blutmikrofilarien) <i>Dirofilaria immitis</i> in Hunden (Blutmikrofilarien)
3.	Tertiäres Screening <i>Onchocerca gibsoni</i> in australischen Rindern (Hautmikrofilarien) <i>Onchocerca ochengi</i> in afrikanischen Rindern (Hautmikrofilarien)

Material und Methoden

Untersuchung von Onchozerkomen

Das parasitologische Untersuchungsmaterial wurde am Schlachthof in Ngaoundéré, Kamerun, gewonnen. Ventrale Hautpartien geschlachteter Rinder, die palpable Onchozerkome zeigten, wurden von den Fellen abgeschnitten und ins Labor gebracht. Dort wurden die meist intradermal gelegenen Knoten mit einem Skalpell aus der Haut herausgeschält und sorgfältig von anhängendem Gewebe befreit, ohne die Parasiten zu verletzen (Abb. 3C, D, F). Der Knoten wurde dann in eine 0,4 - 0,5%ige Kollagenaselösung in Zellkulturmedium RPMI 1640, das Penicillin/Streptomycin enthielt, über Nacht bei etwa 30° C inkubiert (5). Das angedaute Gewebe wurde am nächsten Tag unter der Stereolupe bei schwacher Vergrößerung vorsichtig mit einer feinen Pinzette und durch regelmäßiges Spülen mit dem Strahl aus einer Spritzflasche entfernt und die Würmer anschließend mikroskopisch untersucht.

Parasitologische Untersuchungen am lebenden Rind

Da chemotherapeutisch behandelte Tiere wiederholt und über einen längeren Zeitraum parasitologisch untersucht werden sollen, wurde dieser Vorgang auf einer nahegelegenen Farm an unbehandelten Rindern erprobt. Rinder wurden in einen Pferch getrieben, mit einem Lasso zu Fall gebracht, von drei bis vier Helfern am Boden gehalten und an den Füßen gefesselt. Mit einem Skalpell wurde die Haut des Bauches an drei Stellen rasiert und für den qualitativen und quantitativen Mikrofilariennachweis mit dem Skalpell oder einer Trephine (Abb. 3A, B) eine Hautprobe entnommen. Diese wurde zum Ausschlüpfen der Mikrofilarien bei einer Umgebungstemperatur von ca. 25 - 30° C in Medium RPMI 1640 gelegt und Mikrofi-

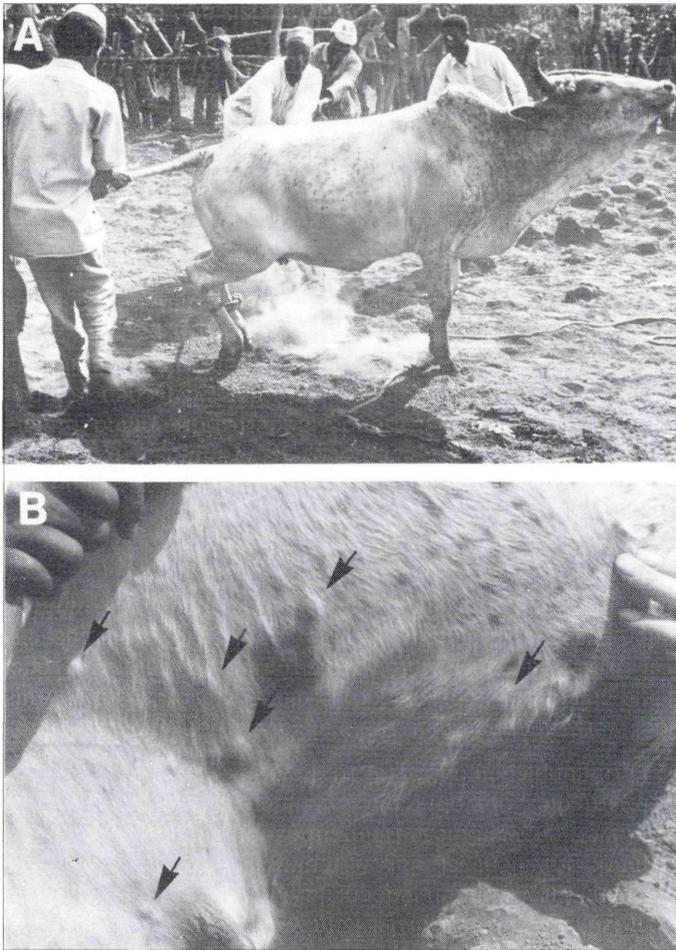


Abbildung 2:

- (A) Ein Rind wird mit dem Lasso eingefangen.
- (B) Palpable Onchozerkome von *O. ochengi* auf der Ventralseite eines Rindes (Pfeile).

Untersuchung der Onchozerkome

Wurmlast

Vorkommen und Verteilung der Mikrofilarien

Die Mikrofilarien halten sich überwiegend auf der Ventralseite der Rinder auf, wo auch die Onchozerkome sitzen (6). Sie sind im Mikrohabitat keineswegs gleichmäßig verteilt, sondern kumulieren in „Nestern“ ähnlich wie es für *Onchocerca lienalis* in europäischen Rindern beschrieben wird (7) und befinden sich zu über 80% in der obersten epidermalen Schicht von 1 mm Tiefe. Nur der kleinere Teil der Mikrofilarien verläßt bei der Inkubation in Kulturmedium die Biopsie.

Die Verdauung des Wirtsgewebes war nach 12 bis 24 Stunden so weit fortgeschritten, daß die adulten Filarien ohne Beschädigung isoliert werden konnten. Temperaturen über 30° C beschleunigten zwar den Verdauungsprozeß, verminderten die Vitalität der Filarien aber recht deutlich. Wegen der starken Gewebsauflagerungen auf der Kutikula blieb oft unverdautes Wirtsgewebe an den Würmern haften und mußte mühsam mit der Pinzette oder durch häufiges Spülen entfernt werden. Solche Auflagerungen fanden sich vor allem auf Weibchen, gelegentlich auch auf Männchen, besonders wenn sie älter waren.

Ein Teil der Knoten enthielt keine Männchen, andere dagegen bis zu neun (Tab. 2). Insgesamt war das Geschlechterverhältnis in etwa ausgeglichen. Weibchen waren fast ausschließlich in Einzahl vorhanden. Gelegentlich trafen wir in einem Knoten zwei Weibchen an, in Ausnahme-

larien, die die Haut verlassen hatten, ausgezählt. Auch in der Haut verbliebene Mikrofilarien ließen sich später nach Kollagenaseverdauung des Wirtsgewebes noch nachweisen.

Zur Exstirpation der Onchozerkome wurde eine Lokalanästhesie gegeben und danach die Knoten aus der Haut exzidiert (Abb. 3C). Die etwa 1 cm große Wunde wurde mit einem antibiotischen Spray behandelt, brauchte aber nicht vernäht zu werden. Bis zu drei Nodulektomien wurden an einem Rind nacheinander durchgeführt, was pro Inzisionsstelle bis zu zehn Minuten dauerte.

Ergebnisse

Entnahme der Hautproben und Onchozerkome

Die gefesselten Rinder ließen sich ohne größere Probleme am Boden halten und die Entnahme der oberflächlichen Hautproben willig über sich ergehen. Wegen ihrer meist intradermalen Lage waren die Knoten etwas prominent (Abb. 2) und ließen sich somit zuverlässig palpieren. Eine Differenzierung von anderen Hautverdickungen durch Fremdkörper, Reaktionen auf Zeckenbisse etc. bereitete meist keine Schwierigkeiten. Die Knoten lagen alle ventral bis lateral, wobei eine Konzentration in der Nähe des Euters oder auch am Euter selbst festgestellt werden konnte. Sie waren teilweise benachbart, lagen aber überwiegend getrennt. Ihre Größe war – im Gegensatz zu *O. volvulus*-Knoten – recht homogen; sie wogen fast alle zwischen 0,1 und 0,3 g. Untersuchungen an Rindern im Schlachthof zeigten gelegentlich auch tiefer gelegene Knoten, entweder subkutan oder auch intramuskulär im subkutanen Hautmuskel (Abb. 3E).

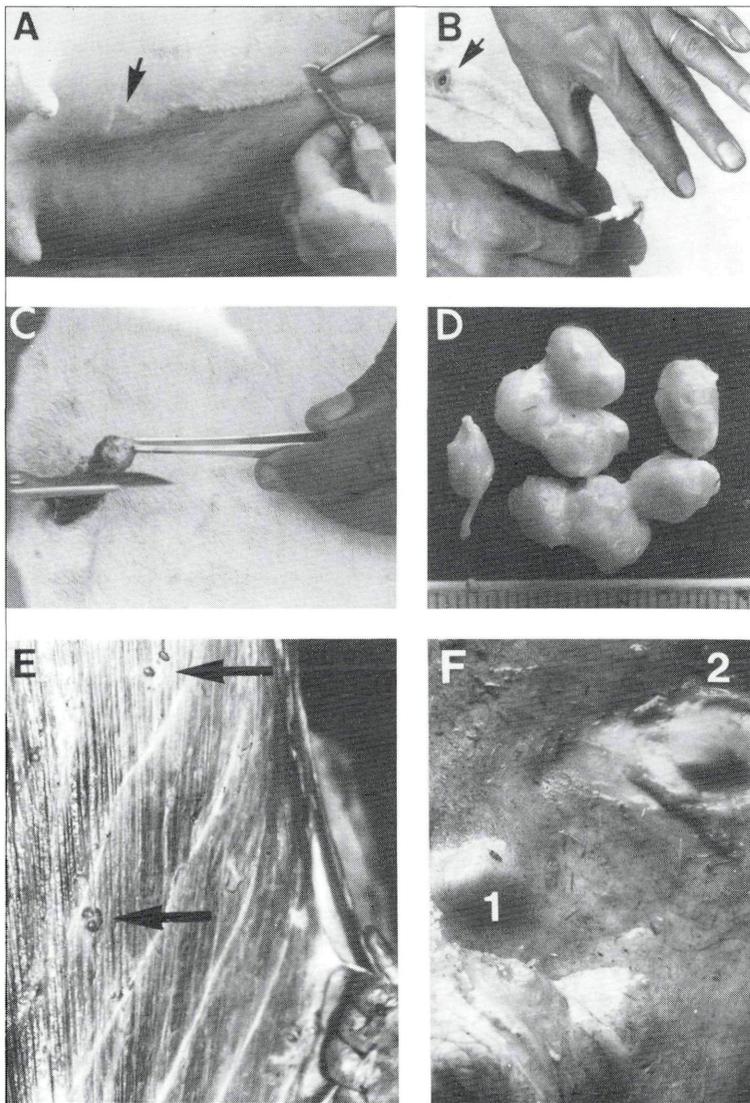


Abbildung 3:

Parasitologische Untersuchungen an Rindern, die mit *Onchocerca ochengi* infiziert waren:

- (A) Entnahme einer Hautbiopsie mit dem Skalpell zum Mikrofilariennachweis; Pfeil: rasierte Stelle vor Probenentnahme
- (B) Entnahme einer Biopsie mit einer Hauttrephine; Pfeil: Wunde nach Biopsieentnahme
- (C) Exstirpation eines Onchozerkoms in Lokalanästhesie
- (D) Exstirpierte Onchozerkome, mit Maßstab (mm)
- (E) Seltene Lokalisation von Onchozerkomen subkutan auf dem Hautmuskel bei sehr starkem Befall (Pfeil)
- (F) Zwei intradermale Onchozerkome in einem Rinderfell von der Fellinnenseite aus gesehen. Das obere Onchozerkom (2) wurde mit dem Skalpell etwas freigelegt.

fällen sogar drei. Dabei ließ sich nicht sicher ausschließen, daß es sich nicht um sehr eng benachbarte Knoten mit eigentlich solitären Weibchen handelte. Alte Filarien konnten wir an Hand ihrer gelblich-bräunlichen Färbung, die durch verschiedene Einlagerungen entstehen, von den kleineren und sehr klaren jungen Filarien unterscheiden. Verkalkte Weibchen waren im Vergleich zu *O. volvulus* relativ selten. Freie Filarien wurden nicht gefunden.

Uterusinhalt der Weibchen

Nur etwas mehr als die Hälfte der Weibchen enthielt Mikrofilarien oder embryonierte Stadien in den paarigen Uterusschläuchen. Sie ähnelten denen von *O. volvulus* in Morphologie und Zusammensetzung (5). Gelegentlich trafen wir Weibchen, die wenige, aber ausschließlich tote Mikrofilarien enthielten, wie wir es für *O. volvulus* am Ende der für diese Filarien typischen periodischen Reproduktionsschübe nachweisen konnten (4).

Diskussion

Morphologische und epidemiologische Gemeinsamkeiten lassen *O. ochengi* als den nächsten Verwandten des Humanparasiten *O. volvulus* erscheinen. Der Mensch steht als Wirt einer *Onchocerca*-Art ziemlich isoliert da (Abbildung 1), denn das Wirtsspektrum der abgeleiteten Vertreter dieser Gattung umfaßt nur die Ruminantia (1). Vermutlich hat der Mensch diesen Parasiten erworben, als er begann, Rinder als Haustiere in seine Nähe zu holen. Hierfür geben auch die ähnlichen Proteinprofile beider Parasiten (3) und die Übertragung durch den gleichen Vektor, *Simulium damnosum* s. l., Hinweise. So gesehen, bietet sich dieser Parasit für ein Medikamentenscreening für die Onchozerkose geradezu an.

Besonders interessant ist es aus gleichem Grunde auch, die Unterschiede beider Parasiten gegenüberzustellen und somit Veränderungen aufzuzeigen, die erst seit dem Übergang auf den Menschen erfolgten. Beide Parasiten haben sich als selbständige Parasiten auseinanderentwickelt, und *O. volvulus* hat schließlich seine eigene Wirtsspezifität erworben. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß beim Menschen durch die ständige Inokulation von infektiösen *O. ochengi*-Larven offenbar eine schützende Kreuzimmunität entsteht (3). Die wichtigsten Unterschiede beider Parasiten sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

O. volvulus bildet seine uterinen Mikrofilarien in regelmäßigen, nicht synchronen Schüben aus (4). Ob dies auch für *O. ochengi* gilt, ist nicht sicher zu sagen, obwohl

Tabelle 2:

Vergleichende parasitologische Untersuchung der Onchozerkome von *O. ochengi* und *O. volvulus*. (* Tote Mikrofilarien eines auslaufenden Reproduktionsschubes.)

	<i>Onchocerca ochengi</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
Onchozerkome		
Lokalisation	intradermal, gelegentlich subkutan	subkutan, teilweise tiefer
Größe und Aufbau	uniform, gleichmäßig aufgebaut, Verkalkung selten	sehr variabel; oft zusammengesetzt; verkalkende oder nekrotische Zentren
Gewicht	0,1 bis 0,3 g, sehr selten mehr	0,1 bis über 15 g
Wurmlast pro Onchozerkom		
Männchen (lebend)	0 bis 9; Ø = 0,9 (a. m.) Männchen fehlt häufig	0 bis über 25; Ø = 1,8 (a. m.)
Männchen (degeneriert)	1 - 2%	2 - 3%
Weibchen (lebend)	1 bis 2; Ø = 1,0	1 bis über 25; Ø = 2,4 (a. m.)
Weibchen (degeneriert)	unter 5%; selten verkalkt	ca. 10%; oft verkalkt
Fertilitätszustand der Weibchen		
gravide (Embr. + Mf)	etwas mehr als die Hälfte	etwas mehr als die Hälfte
leerer Uterus	gelegentlich	regelmäßig
nur tote Mf („Rest-Mf“)*	gelegentlich	regelmäßig
immatur	unter 2%	unter 5%

die genaue Analyse der Embryogramme Hinweise dafür gibt. Diese Homologie wäre für die Untersuchung von Medikamenten, die mit der embryonalen Ausbildung der Mikrofilarien interferieren, eine wichtige Voraussetzung.

Ähnlich wie die Männchen des Humanparasiten scheinen auch die Männchen von *O. ochengi* ihre Weibchen in den Knoten regelmäßig aufzusuchen und wieder zu verlassen. Der sehr hohe Anteil an Weibchen mit leerem Uterus könnte natürlich auch auf mangelnde Insemination und nicht auf eine endogene Reproduktionspause zurückzuführen sein. Schließlich befinden sich die Knoten intrakutan in sehr festem Gewebe, dürften für die Männchen mühsam zu erreichen sein und für die Weibchen möglicherweise längere Pausen ohne Insemination mit sich bringen.

Das *O. ochengi*-Modell ist für das Screening makrofilarizider Substanzen dem *O. gibsoni*-Modell deutlich überlegen. Onchozerkome von *O. gibsoni* sind mit drei bis vier pro Rind zahlenmäßig gering, sie sind außerdem tiefer gelegen und von außen nicht palpabel. Daher sind sie nur bei einer Obduktion zugänglich. *O. ochengi*-Knoten sind dagegen nicht nur zahlreich

(bis zu 60), sondern auch oberflächlich gelegen und lassen sich dadurch in Lokalanästhesie einfach exzidieren. Dies ermöglicht longitudinale Untersuchungen am selben Rind und ist besonders für die Beurteilung von Substanzen von Interesse, deren Wirkung erst nach Wochen oder Monaten einsetzt, wie dies z. B. beim Suramin der Fall ist. Afrikanische Rinder sind außerdem kleiner und sehr viel einfacher zu handhaben als die sehr starken Tiere in Australien. Die nähere Verwandtschaft von *O. ochengi* mit dem Humanparasiten ist natürlich ein weiterer Vorteil.

Vergleichende Untersuchungen der Behandlung mit Substanzen, deren Wirkung beim Humanparasiten bekannt ist, müssen jetzt zeigen, ob sich alle Erwartungen an dieses vielversprechende Modell erfüllen.

Zusammenfassung

Für die Bekämpfung der Onchozerkose werden filarizide Substanzen gesucht, die den adulten Parasiten abtöten können. Hierfür wird ein geeignetes Screening-Modell gebraucht, denn wegen der Wirtsspezifität gibt es für den Humanparasiten *O. volvulus* kein Labormodell in kleinen Säugern. *Onchocerca ochengi* ist eine Filarie der afrikanischen Rinder, die dem Humanparasiten phylogenetisch am nächsten steht. In Nord-Kamerun wurden Onchozerkome aus geschlachteten Rindern gewonnen, die Filarien enzymatisch isoliert und mikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde auf einer Farm die Entnahme von parasitologischem Material an lebenden Rindern geprobt, um die Durchführbarkeit von Chemotherapieversuchen im Feld einschätzen zu können. Hautbiopsien wurden entnommen, Knoten palpiert und teilweise unter Lokalanästhesie exstirpiert. Die parasitologischen Untersuchungen zeigten, daß dieses Filariosemodell die wichtigsten Voraussetzungen für ein erfolgreiches Screening von filariziden Substanzen erfüllt.

Schlüsselwörter Onchozerkosebekämpfung, Kamerun, Medikamenten-Screening, Rinderonchozerkose, parasitologische Untersuchungen.

Summary *Onchocerca ochengi* in African cattle as screening model for filaricidal compounds

Macrofilaricidal drugs for the treatment of onchocerciasis are urgently needed and therefore reliable screening models are required. However, there is no laboratory model for *Onchocerca volvulus* available due to the host specificity of this parasite. *Onchocerca ochengi* in African cattle is a filarial species phylogenetically closely related to the human parasite. In northern Cameroon intracutaneous onchocercomata were collected from slaughtered cattle and the worms enzymatically isolated. Skin biopsies and nodules were also taken from living animals on a farm in order to study the feasibility of longitudinal parasitological investigations required for the evaluation of drug trials. *O. ochengi* in African cattle turned out to be a promising screening model for new antifilarial compounds.

Key words Control of onchocerciasis, Cameroon, drug screening, bovine onchocerciasis, parasitological investigations.

Danksagung Den afrikanischen Mitarbeitern in Ngaoundéré sei für ihre verlässliche Mithilfe bei den Arbeiten auf der Rinderfarm und im Labor recht herzlich gedankt. Diese Studie wurde von der Kommission der Europäischen Gemeinschaft (STD2 und STD3) und dem Ministry of Higher Education and Research of Cameroon unterstützt.

Literatur

1. BAIN, O. (1981):
Le genre *Onchocerca*: hypothèse sur son évolution et clé dichotomique des espèces.
Ann. Parasit. Hum. Comp. 56, 503-562.
2. HEUSCHKEL, C., SOBOSLAY, P. T., BANLA, M., GÖRGEN, H., SCHULZ-KEY, H. (1990):
Erfahrungen bei einer Massenbehandlung von Onchozerkosepatienten mit Ivermectin.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasit. 12, 125-132.
3. 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.
4. SCHULZ-KEY, H., KARAM, M. (1986):
Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*.
Parasit. Today 10, 284-286.
5. SCHULZ-KEY, H. (1988):
The collagenase technique: How to isolate and examine adult *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug trials.
Trop. Med. Parasit. 39, 423-440.
6. WAHL, G. (1991):
Die *Onchocerca*-Arten der Rinder in Nord-Kamerun und ihre Bedeutung für die Epidemiologie der menschlichen Onchozerkose.
Dissertation, Fak. Biologie, Universität Tübingen, 103 S.
7. ZAHNER, S., SCHULZ-KEY, H. (1990):
Rinderonchozerkose in Süddeutschland: Verteilung der Mikrofilarien in ihrem Wirtshabitat.
Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasit. 12, 87-94.

Korrespondenzadresse: Priv. Doz. Dr. Hartwig Schulz-Key
Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Wilhelmstraße 27
D-72074 Tübingen 1 · Bundesrepublik Deutschland

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: 1993

Band/Volume: [15](#)

Autor(en)/Author(s): Schulz-Key Hartwig, Wahl G., Kläger Sabine, Renz Alfons

Artikel/Article: [Onchocerca ochengi in afrikanischen Rindern als Screening-Modell für filarizide Substanzen. 17-24](#)