

Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7 (1985) 85–91

Abteilung für Parasitologie des Hygiene-Instituts und Institut für Tropenhygiene und öffentliches Gesundheitswesen am Südasien-Institut der Universität Heidelberg

## Echinococcus multilocularis: Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Superinfektionen bei der experimentell infizierten Maus<sup>1)</sup>

Erhard Hinz

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

### Einleitung

Untersuchungen über den Einfluß sogenannter Super- oder Belastungsinfektionen sind ein Mittel, zusätzliche Einblicke in die Wechselbeziehungen zwischen Krankheitserreger und Wirtsorganismus zu erhalten. Dies gilt insbesondere dann, wenn es sich wie bei den Helminthiasen um Infektionen handelt, die keine Dauerimmunität hinterlassen. Für Helminthiasen hat sich allerdings in vielen Fällen herausgestellt, daß ein bestehender Befall einen Schutz gegenüber Superinfektionen bilden kann. Bereits aus den 30er Jahren liegen entsprechende Beobachtungen auch für die *Hydatigera taeniaeformis*- und *Taenia pisiformis*-Cysticercose von Ratte und Kaninchen vor (MILLER und MASSIE 1932, MILLER und KERR 1932), während Ergebnisse über Superinfektionen mit den Metacestoden von *Echinococcus multilocularis*, *Taenia crassiceps* und *Mesocestoides corti* erst wesentlich später hinzutraten (RAU und TANNER 1973, KAZACOS 1976, SIEBERT et al. 1978, HINZ 1979, SIEBERT und GOOD 1980).

Eine erneute experimentelle Untersuchung der Zusammenhänge schien jedoch aufgrund verschiedener Befunde über die Echinococcose der Turkana in Kenya angeraten: 1. Bei den Turkana, die eine besonders hohe Prävalenz aufweisen, kommt es nach der Cystenruptur vergleichsweise selten zu anaphylaktischen Reaktionen; 2. die gängigen serologischen Nachweisverfahren führen zu einem extrem hohen Anteil falsch negativer Resultate; 3. die Echinococcus-Cysten sind zumeist fertil, d.h. sie enthalten Protoscoleces (FRENCH et al. 1982, MACPHERSON 1983). Ziel unserer experimentellen Bearbeitung war es festzustellen, ob Superinfektionen, wie sie angesichts der hohen Endemizität bei den Turkana häufiger zu erwarten sind, als Mitursache für die angeführten Besonderheiten in Frage kommen.

### Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 128 Mäuse-♀♀ (NMRI-Orig./Kisslegg, SPF-Auszucht), die zu Versuchsbeginn 3 Wochen alt waren. Die Haltung erfolgte zu je 8 Tieren in Makrolonkäfigen (Typ III) auf Weichholzgranulat in konventioneller Weise. Als Nahrung standen die Standarddiät Altromin und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

Das benutzte Infektionsmaterial geht auf den von H. Vogel, Hamburg, auf der Schwäbischen Alb isolierten *Echinococcus multilocularis*-Stamm zurück, den wir auf NMRI-Mäusen weiterführten. Die Herstellung und Applikation der Metacestoden-Suspension wurde auf bereits früher beschriebene Weise vorgenommen (HINZ 1972).

Je 32 Tiere wurden zu Versuchsbeginn intraperitoneal oder subkutan infiziert. Gruppen von jeweils 8 dieser Mäuse erhielten nach 4, 8 oder 16 Wochen eine Superinfektion mittels der anderen Infektionsart; d. h. auf eine intraperitoneale Erstinfektion folgte eine subkutane Superinfektion und umgekehrt. Jeweils eine Subgruppe (8 Tiere) wurde nicht superinfiziert. Insgesamt 48 Tiere, die keine Erstinfektion erhalten hatten, dienten als Kontrollen für die Superinfektion; ihnen wurde in Subgruppen von je 8 Mäusen zeitgleich zu den Superinfektionen Echinococcenmaterial der gleichen Charge als Einzelinfektion intraperitoneal oder subkutan appliziert. 16 Tiere blieben nicht infiziert.

Die Blutentnahme erfolgte in 14-tägigen Abständen bis zu der 30. Woche nach der Erstinfektion vorgenommenen Sektion. Als serologisches Nachweisverfahren zur Antikörperbestimmung kam der indirekte Immunfluoreszenztest zur Anwendung. Serumproteine wurden mittels CAF-Elektrophorese aufgetrennt.

## Ergebnisse

### 1. Befallsstärke

Was die als Cystengewicht gemessene Befallsstärke anbetrifft, so läßt sich für den zeitlichen Abstand zwischen Erst- und Superinfektion kein statistisch gesicherter Unterschied nachweisen. Insgesamt wird jedoch der bereits früher erhobene Befund (HINZ 1979) bestätigt, daß ein vorangehender intraperitonealer *E. multilocularis*-Befall wachstumshemmend auf nachfolgend subkutan applizierte Parasiten wirkt (vgl. Tab. 1); mit durchschnittlich 0,96 g subkutaner Cystenmasse bei superinfizierten Tieren ist die Befallsstärke deutlich um ca. 60% gegenüber den entsprechenden Kontrollen (2,42 g) reduziert.

TABELLE 1

*Echinococcus multilocularis*: Befallsstärke (rücktransformierte Durchschnittswerte) bei einfach- und superinfizierten NMRI-Mäusen

E = Erstinfektion  
K = Kontrolltiere

S = Superinfektion

Abstand zwischen E und S	Befallsstärke (Cystengewicht in g)							
	ip. E	+	sc. S	sc. K	sc. E	+	ip. S	ip. K
4 Wochen	11,06	+	1,79	4,04	4,59	+	6,06	3,74
8 Wochen	8,18	+	3,76	3,73	3,63	+	7,76	3,79
16 Wochen	8,86	+	0,13	0,94	5,29	+	0,42	0,55
gesamt	9,29	+	0,96	2,42	4,45	+	2,69	1,65
K zu E	9,94		—	—	7,70		—	—

Völlig anders verhält es sich dagegen bei umgekehrter Infektionsfolge: Intraperitoneale Echinococcen weisen bei zuvor subkutan infizierten Tieren mit 2,69 g ein signifikant (um 63%) höheres Gewicht auf als bei Mäusen ohne vorangegangene subkutane Infektion (1,65 g). Darüber hinaus wird aber auch das Wachstum der subkutanen Parasiten durch die intraperitoneale Superinfektion beeinflusst; und zwar handelt es sich dabei um eine deutliche Wachstumshemmung (4,45 g gegenüber 7,70 g).

## 2. Protoscolex-Anzahl

Wie bereits früher nachgewiesen werden konnte (HINZ und KIRSTEN 1973), eignet sich die Anzahl von Protoscolexes als zusätzliches Kriterium für die Beurteilung von Unterschieden zwischen verschiedenen Versuchstiergruppen. Dies trifft auch für die hier vorgelegten Befunde zu (Tab. 2). Sie weichen jedoch insofern von den Ergebnissen für die Befallsstärke ab, als eine intraperitoneale Erstinfektion die Entwicklung von Protoscolexes nicht inhibiert, sondern fördert; d.h. trotz geringerem Cystengewicht (0,96 g gegenüber 2,42 g; vgl. Tab. 1) entstehen in den subkutanen Echinococcen der superinfizierten Mäuse mehr Protoscolexes als in denjenigen der Kontrolltiere (198 gegenüber 139). In allen übrigen Fällen stimmen die Unterschiede in der Protoscolex-Anzahl mit den Differenzen in der Befallsstärke prinzipiell überein. Eine deutliche graduelle Abweichung ergibt sich allerdings für die Verhältnisse in den auf eine Superinfektion zurückgehenden intraperitonealen Cysten, in denen eine um das Zehnfache höhere Protoscolex-Anzahl nachzuweisen ist als in den interaperitonealen Parasiten der Kontrolltiere (327 gegenüber 32; vgl. Tab. 2).

TABELLE 2

*Echinococcus multilocularis*: Protoscolex-Anzahl (rücktransformierte Durchschnittswerte) bei einfach- und superinfizierten NMRÍ-Mäusen

E = Erstinfektion

S = Superinfektion

K = Kontrolltiere

Abstand zwischen E und S	Protoscolex-Anzahl							
	ip. E	+	sc. S	sc. K	sc. E	+	ip. S	ip. K
4 Wochen	630	+	282	256	441	+	580	100
8 Wochen	1095	+	506	275	384	+	756	31
16 Wochen	543	+	8	7	256	+	6	2
gesamt	740	+	198	139	357	+	327	32
K zu E	610		—	—	670		—	—

## 3. Antikörpertiter

Die an Paraffinschnitten im indirekten Fluoreszenztest gemessene Immunantwort wird deutlich stärker durch eine intraperitoneale als durch eine subkutane Erstinfektion stimuliert. Für den zusätzlichen „Booster“-Effekt spielt es jedoch keine Rolle, ob eine Superinfektion dann intraperitoneal oder subkutan gesetzt wird; unabhängig vom zeitlichen Abstand zwischen beiden Infektionen läßt sich jeweils zwei Wochen nach der Superinfektion ein Anstieg um 2—3 Titerstufen registrieren, dem innerhalb weite-

rer zwei Wochen dann wieder ein Abfall folgt; und zwar sinkt die Antikörperkonzentration bei den Tiergruppen, die im Abstand von 4 Wochen erst- und superinfiziert wurden, auf das Titerniveau der Kontrolltiere mit intraperitonealen Echinococcen, bei wachsendem zeitlichen Abstand (8 bzw. 16 Wochen) sogar auf zunehmend geringere Werte als diejenigen dieser Kontrolltiere.

Diese Bedeutung des zeitlichen Abstands zwischen Erst- und Superinfektion kommt in der Verteilung der Antikörpertiter klar zum Ausdruck; die am Beispiel der Infektionsfolge ip + sc vorgenommene Darstellung (Abb. 1) beruht auf 7 im Abstand von 14 Tagen vorgenommenen Bestimmungen (beginnend 2 Wochen nach Superinfektion). Aus dem Vergleich der drei Verteilungsmuster geht eine Linksverschiebung der Antikörpertiter von superinfizierten Tieren und eine Rechtsverschiebung für die Titer der Kontrolltiere hervor; d.h. Superinfektionen können die Immunantwort deutlich negativ beeinflussen.

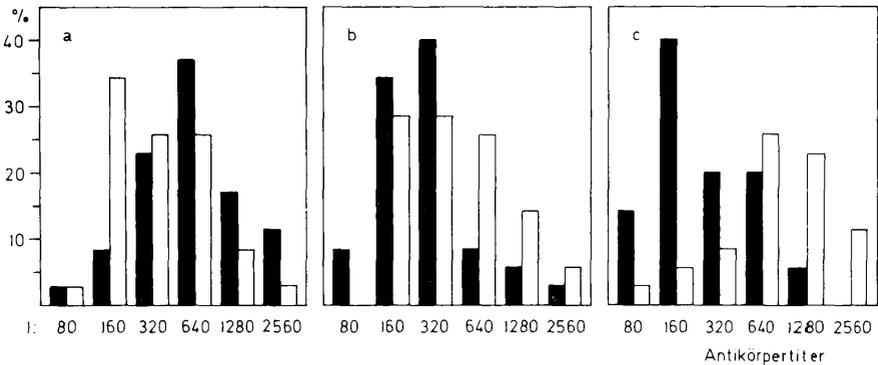


Abb. 1: *Echinococcus multilocularis*: Verteilung der Antikörpertiter bei superinfizierten (□) und einfachinfizierten (■) NMRI-Mäusen  
a—c: subkutane Superinfektion 4 (a), 8 (b) oder 16 (c) Wochen nach intraperitonealer Erstinfektion

#### 4. Serumproteine, weißes und rotes Blutbild

Für Serumproteine, weißes und rotes Blutbild gilt ebenfalls, daß die stärksten Veränderungen bei denjenigen Tieren zu beobachten sind, die eine intraperitoneale Erstinfektion erhielten, und hier vor allem solche, die 4 Wochen später subkutan superinfiziert wurden (vgl. Tab. 3). Gegenüber den nicht infizierten Kontrollen sind bei diesen Tieren vor allem  $\beta_2$ - und  $\gamma$ -Globuline erhöht, was sich auch auf den Gesamtgehalt des Serums an Proteinen auswirkt, da keine entsprechende Verminderung der Albuminfraktion stattfindet. Veränderungen im weißen Blutbild sind vor allem auf die Zunahme der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten zurückzuführen. Einen geringen Anteil daran haben auch die Monozyten, die bei infizierten Mäusen signifikant höhere Werte aufweisen. Charakteristisch ist darüber hinaus, daß eine *E. multilocularis*-Infektion keine Bluteosinophilie verursacht, was sie von den meisten anderen Helminthiasen deutlich unterscheidet. Die Beeinflussung des roten Blutbildes durch den Parasitenbefall stellt sich im vorliegenden Versuch als geringfügig dar (vgl. Tab. 3).

TABELLE 3

*Echinococcus multilocularis*: Blut-Serum-Werte bei super- und nicht infizierten NMRI-Mäusen

(Infektionsfolge: ip. + sc. nach 4 Wochen)

Infektion	Serumproteine in g/l							Ges.
	Alb.	Globuline					Ges.	
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$		
+	29,4	2,0	5,2	5,7	15,7	23,7	81,7	
—	33,2	2,9	3,7	5,6	7,1	7,3	59,8	

	Leukozyten						HK	Ery Mio	Hb g%
	eo	st	seg	Ly	Mo	Ges.			
+	335	39	4220	6400	655	12270	50,2	7,56	14,2
—	478	24	1325	6600	357	8785	52,0	8,13	16,0

### Diskussion

Die vorgelegten Ergebnisse stellen erneut Sonderheiten der Parasit-Wirt-Beziehungen für die *Echinococcus multilocularis*-Infektion der Maus unter Beweis. Die von den Verhältnissen bei anderen Helminthiasen abweichenden Befunde lassen sich vermutlich in erster Linie auf Unterschiede zurückführen, die in der Biologie des Parasiten begründet sind. Der als Metagenese ausgebildete, durch Polyembryonie im Larvenstadium charakterisierte Zyklus der Gattung *Echinococcus* stellt — von wenigen Ausnahmen abgesehen — eine klare Abgrenzung gegenüber der Entwicklung anderer Helminthenarten der Säugetiere dar. Proliferatives, potentiell unbegrenztes Wachstum und exogene Absiedlung von Keimschichtinseln, die zu protoscolexhaltigen Cysten heranreifen, und Perpetuierung dieses Vorgangs heben die Metacestoden von *E. multilocularis* deutlich ab von den sich als Individuen zu Adultwürmern entwickelnden Larven anderer Wurmspecies. Diese *Echinococcus*-spezifische Entwicklung stellt die Immunabwehr des Zwischenwirtes vor entsprechend andersartige Probleme. Welche Mechanismen allerdings dafür verantwortlich sind, daß z.B. superinfizierte intraperitoneale Cysten zu einer Wachstumsbeschleunigung mit deutlich vermehrter Protoscolex-Bildung angeregt werden und wachstumshemmend auf die subkutanen Parasiten der Erstinfektion zurückwirken, entzieht sich zur Zeit noch jeglicher Erklärungsmöglichkeit. Dies gilt auch für die in superinfizierten subkutanen Cysten trotz genereller Wachstumshemmung verstärkt stattfindende Protoscolex-Bildung.

Die beobachteten Veränderungen in der Konzentration von Serumantikörpern lassen ebenfalls noch keine klaren Deutungen zu. Wir können lediglich feststellen, daß 8 oder 16 Wochen auf eine Erstinfektion folgende Superinfektionen sich negativ auf den Antikörpertiter auswirken. Dies geht allerdings niemals soweit, daß die Werte unterhalb der Nachweisgrenze sinken, daß also falsch negative Resultate erhalten werden. In

diesem Zusammenhang sei aber auf früher gewonnene Ergebnisse verwiesen (HINZ 1979), aus denen sich eine Korrelation zwischen Befallsstärke und Antikörpertiter in Form einer zunächst auf-, dann absteigenden Parabel ableiten ließ. Dieser Zusammenhang wurde damit erklärt, daß der heranwachsende Parasit zunächst die Immunantwort stimuliert (mit der Folge eines Titeranstiegs), bei weiterem Wachstum durch Belastung des Zwischenwirtes dessen Abwehr jedoch zunehmend schädigt und schließlich völlig lahmlegt, so daß sich Antikörper der Nachweisbarkeit entziehen. Auf die hier vorgelegten Ergebnisse angewandt, könnte diese Erklärung bedeuten, daß eine zusätzliche Superinfektion diesen Schädigungsprozeß früher einleitet, so daß sich daraus ein Titerabfall gegenüber den einfachinfizierten Tieren ergibt. Ob sich solche für die sekundäre *E. multilocularis*-Infektion der Maus abzeichnenden Möglichkeiten auch auf die Verhältnisse der menschlichen Echinococose übertragen lassen, erfordert allerdings weitere Untersuchungen und kritische Analysen.

### **Zusammenfassung**

Intraperitoneal oder subkutan mit *Echinococcus multilocularis* infizierte NMRI-Mäuse wurden nach 4, 8 oder 16 Wochen einer sc. oder ip. Superinfektion ausgesetzt. Aufgrund der Sektionsergebnisse ließ sich ein hemmender Einfluß einer vorhandenen ip. Infektion auf das Wachstum von sc. Parasiten nachweisen. Für die Bildung von Protoscolex ergab sich dagegen ein positiver Effekt. Bei umgekehrter Infektionsfolge (sc. + ip.) wurde eine solche positive Auswirkung sowohl für die Befallsstärke als auch für die Protoscolex-Anzahl von ip. Echinococcen beobachtet. Darüber hinaus wirkte die ip. Superinfektion negativ auf die sc. Erstinfektion zurück.

Hinsichtlich der Immunantwort führte die Superinfektion zu einer kurzfristigen Steigerung des Antikörpertiters um das 2–3fache; anschließend sanken die Werte bei 4wöchigem Infektionsabstand wieder auf das Niveau der ip. infizierten Kontrollen; bei größerem zeitlichen Abstand waren die Titer der superinfizierten Tiere gegenüber denjenigen der Kontrolltiere erniedrigt. Veränderungen anderer Blut-Serum-Werte (Serumproteine, weißes und rotes Blutbild) waren am deutlichsten bei den Mäusen ausgeprägt, die eine ip. Erstinfektion erhalten hatten. Sie waren darüber hinaus umso stärker, je früher die Superinfektion gesetzt wurde.

### **Summary**

#### ***Echinococcus multilocularis*: Further investigations of the significance of superinfections in experimentally infected mice**

Intraperitoneally or subcutaneously *Echinococcus multilocularis* infected NMRI-mice were challenged after 4, 8 and 16 weeks respectively by infections via the opposite route. Dissection of the animals showed that an existing ip. infection inhibited the growth of superinfected subcutaneous parasites, but caused an increase of the protoscolex number in these cysts. In case a sc. primary infection was followed by an ip. superinfection ip. parasites exhibited higher weights and protoscolex numbers as well, if compared with non-superinfected controls. Beyond that the ip. superinfection reacted also on the sc. primary infection in suppressing cyst growth and protoscolex formation.

Relating to the immune response superinfections led to a shorttime two- to threefold increase of the antibody titre, which then decreased again. In mice challenged after 4 weeks the decrease reached the antibody level of ip. infected control animals, whereas in mice superinfected after 8 and 16 weeks respectively the titre dropped well below the control values. Changes in the composition of serum proteins and of the red and white blood cell picture were most pronounced in animals having got an ip. primary infection, especially if challenged after 4 weeks.

## Literatur

- FRENCH, C. M., G. S. NELSON, M. WOOD (1982): Hydatid disease in the Turkana District of Kenya. I. The background to the problem with hypotheses to account for remarkably high prevalence of the disease in man. *Ann. trop. Med. Parasit.* 76, 425—437.
- HINZ, E. (1972): Die Entwicklung des sekundären *Echinococcus multilocularis* in der experimentell infizierten Maus. Eine quantitative Analyse. *Z. Tropenmed. Parasit.* 23, 256—265.
- HINZ, E. (1979): *Echinococcus multilocularis*: Superinfektionen bei der experimentell infizierten Maus. *Tropenmed. Parasit.* 30, 387—390.
- HINZ, E., C. KIRSTEN (1973): Die Protoscolex-Bildung bei *Echinococcus multilocularis* in der experimentell infizierten Maus in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Versuchstiere und von der Infektionsdosis. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 223, 255—264.
- KAZACOS, K. R. (1976): Immunization of mice against *Mesocestoides corti* by subcutaneous inoculation of living tetrathyridia. *J. Parasitol.* 62, 161—163.
- MACPHERSON, C. N. L. (1983): An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 32, 397—404.
- MILLER, H. M., K. B. KERR (1932): Attempts to immunize rabbits against a larval cestode, *Cysticercus pisiformis*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 29, 670—671.
- MILLER, H. M., E. MASSIE (1932): Persistence of acquired immunity to *Cysticercus fasciolaris* after removal of the worms. *J. prev. Med.* 6, 31—36.
- RAU, M. E., C. E. TANNER (1973): *Echinococcus multilocularis* in the cotton rat. The effect of preexisting subcutaneous cysts on the development of a subsequent intraperitoneal inoculum of protoscolices. *Can. J. Zool.* 51, 55—59.
- SIEBERT, A. E., A. H. GOOD (1982): *Taenia crassiceps*: Immunity to metacestodes in BALB/c and BDF<sub>1</sub> mice. *Exp. Parasitol.* 51, 418—430.
- SIEBERT, A. E., A. H. GOOD, Y. E. SIMMONS (1978): Kinetics of primary and secondary infections with *Taenia crassiceps* metacestodes (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Cyclophyllidae). *Int. J. Parasitol.* 8, 45—53.

## ANSCHRIFT DES AUTORS:

Prof. Dr. Erhard Hinz  
Abteilung für Parasitologie des Hygiene-Instituts  
Im Neuheimer Feld 324  
D-6900 Heidelberg

# 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: 1985

Band/Volume: [7](#)

Autor(en)/Author(s): Hinz Erhard

Artikel/Article: [Echinococcus multilocularis: Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Superinfektionen bei der experimentell infizierten Maus. 85-91](#)