

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 103 - 114

Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim
(Leiter: Prof. Dr. Werner Frank)

Experimentelle Untersuchungen zur Empfänglichkeit des Schweines für *Echinococcus multilocularis*

T. Pfister, W. Frank

Einleitung

Obwohl die Zwischenwirtspektren beider bei uns vorkommenden *Echinococcus*-Arten weitgehend abgeklärt sind, blieben die Angaben über *E. multilocularis* im Schwein bis heute widersprüchlich. Die Situation scheint zusätzlich dadurch verworren zu sein, daß *E. granulosus*, der normalerweise zur zystischen Form der Echinokokkose führt, gelegentlich auch ein atypisches Finnenwachstum zeigt. Dieses besitzt gewisse Ähnlichkeiten mit der durch *E. multilocularis* hervorgerufenen alveolären Echinokokkose in Nagern und wurde von Veterinär- und Humanmedizern in der Vergangenheit nicht selten, aber fälschlicherweise ebenfalls als *E. multilocularis* bezeichnet. Durch eine orale Infektion bei Ferkeln sollte geklärt werden, inwieweit das Schwein für eine Infektion mit diesem Zestoden empfänglich ist.

Sollte es tatsächlich zu einem Finnenwachstum im Schwein kommen, hätte man ein wesentlich geeigneteres Modell für die menschliche alveoläre Echinokokkose als die heute verfügbaren Stämme in Labornagern. Angesichts vieler physiologischer Ähnlichkeiten zwischen Schwein und Mensch wäre dies sicher ein Fortschritt in der Erforschung von Therapiemöglichkeiten dieser gefährlichen Parasitose.

Nicht unbedeutend wäre aber ein positiver Ausgang der Versuche auch deshalb, weil die Verfütterung roher Schlachtabfälle an Hund und Katze bei Hausschlachtungen die Gefahr des Überspringens des Zyklus in den urbanen Bereich provozieren würde.

Auch wenn sich die *Echinococcus*-Finne nicht entwickeln sollte, kann man annehmen, daß es zu einer Auseinandersetzung auf immunologischer Basis zwischen dem Wirt und dem Parasiten kommt. Durch eine serodiagnostische Verlaufskontrolle wurde versucht, einen sich eventuell aufbauenden Antikörpertiter gegen *Echinococcus* aufzudecken. Damit könnten wenigstens teilweise solche Fälle beim Menschen erklärt werden, in denen serologisch ein nachweisbarer Titer gegen *Echinococcus*-Antigen besteht, der Verdacht einer Echinokokkose sich aber klinisch nicht bestätigen läßt.

Material und Methode

Als Versuchstiere dienten sechs Wurfgeschwister aus dem Württemberger Hybridzuchtprogramm. Dabei handelt es sich um eine 3-Weg-Hybridzüchtung aus den Rassen „Deutsche Landrasse“, „Large White“ und „Piétrain“. Es wurden ausschließlich Kastrate verwendet.

Die *Echinococcus*-Eier stammten aus natürlich infizierten Füchsen (*Vulpes vulpes*), die zur Untersuchung auf Tollwut vorwiegend aus dem Einzugsgebiet der Schwäbischen Alb in das Tierärztliche Untersuchungsamt Aulendorf eingesandt worden waren. Um die Infektionsfähigkeit des Eimaterials zu überprüfen, wurde es einer In vitro-Verdauung mit künstlichem Magensaft (8) und künstlichem Dünndarmsaft (14) unterzogen.

Die vier Versuchstiere bekamen im Alter von 7 Wochen jeweils das Eimaterial aus 50 reifen Proglottiden oral in einer Gelatinekapsel verabreicht, was einer Infektionsdosis von mindestens 10.000 Eiern entspricht.

Je zwei Versuchstiere wurden 94 bzw. 172 d. p. i. geschlachtet. Nach einer makroskopischen Inspektion der Lebern erfolgte eine Bearbeitung der knotig veränderten Stellen nach den üblichen pathohistologischen Methoden. Fixiert wurde in 4%-igem, gepuffertem Formol und in Susa, als Übersichtsfärbung kam eine Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Delafield und eine Gegenfärbung mit einer 0,05% Azophloxinlösung zur Anwendung.

Zur quantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper gegen *Echinococcus* wurde ein ELISA eingesetzt. In Anlehnung an das Makro-ELISA-System von RUITENBERG et al. (13) und den Ausführungen von BANKS und CARTWRIGHT (2) wurde der Test als Mikro-ELISA mit alkalischer Phosphatase als umsetzendes Enzym durchgeführt. Als Antigen stand *E. multilocularis*-Larvenmaterial aus experimentell infizierten Feldmäusen (*Microtus arvalis*) zur Verfügung, das nach GOTTSTEIN et al. (9) aufbereitet und im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie bereits erfolgreich verwendet worden war (12).

Alle im ELISA positiven Seren wurden zusätzlich mit dem Echinokokkose-Hämagglutinationstest CELLOGNOST (Behringwerke AG, Marburg) getestet.

Ergebnisse

Pathoanatomischer Befund

Die Lebern aller vier infizierten Versuchstiere zeigten sowohl bei den zwei 94 d. p. i. als auch bei den zwei 172 d. p. i. geschlachteten Schweinen solitäre oder multiple grauweiße granulomartige Knötchen, die stecknadelkopf- bis erbsengroß waren (Abb. 1). Ein einzelner Herd erreichte sogar fast die Größe einer Haselnuß. Alle subkapsulär gelegenen Herde erhoben sich kaum über die Oberfläche der im übrigen unverändert erscheinenden Lebern. Die Begrenzung zum gesunden Organewebe war unterschiedlich scharf ausgeprägt. Auch in der Tiefe des Lebergewebes saßen Knötchen, von denen die größeren beim Durchtasten des Organes festgestellt werden konnten, während man kleinere Exemplare nur beim Anlegen von Schnitten entdeckte. Die Schnittflächen der Lebern zeigten sonst keine Veränderungen. Pro Schwein betrug die Anzahl der Echinokokken-Herde 1, 12, 31 und 136 Stück, ein bevorzugter Sitz in der Leber konnte nicht festgestellt werden. Andere Organe waren nicht betroffen, auch die Lymphknoten zeigten keine Veränderung. Im Anschnitt war

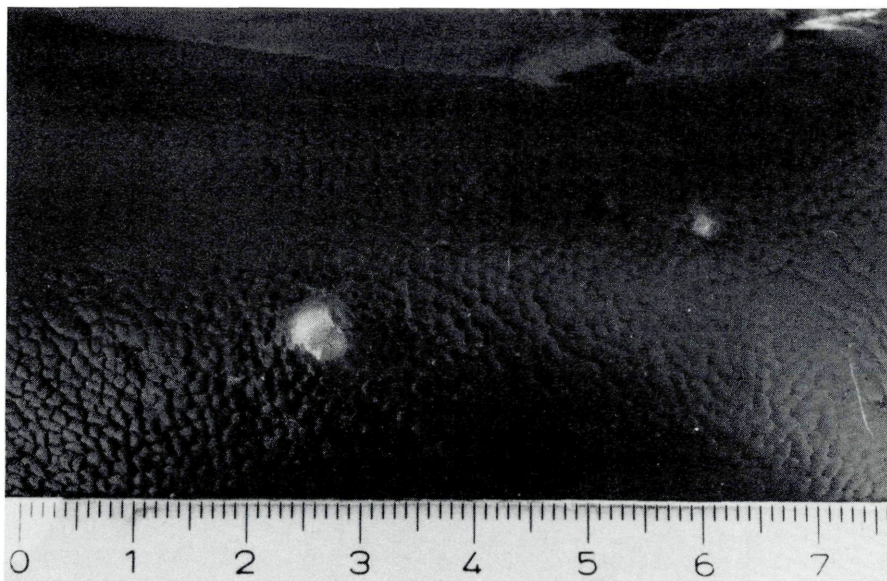


Abb. 1: Makroaufnahme unterschiedlich großer Zysten in der Leber, 94 d. p. i.

ein zystischer Aufbau der Knoten zu erkennen: innerhalb einer festen Bindegewebshülle lag eine weiße, käsig-krümelige Masse, die sich leicht aus der derben Zysten- hülle herauschälen ließ. In den beiden Kontrolltieren konnten keine Veränderungen festgestellt werden, Granulome wie bei den infizierten Schweinen waren nicht nachzuweisen.

Histopathologischer Befund

Histopathologisch zeigen die Zysten alle Merkmale einer granulomatösen Entzündung. Im Zentrum des Herdes befindet sich ein nekrotisch-entzündlicher Bereich, entweder mit reichlich Kernmaterial, das auf eine Ansammlung zerfallender Zellen zurückzuführen ist, oder mit flächenhaftem, stark eosinophilen amorphem Material, das wahrscheinlich Bakterienkolonien darstellt. In den meisten Fällen ist das nekrotische Zentrum bereits mehr oder weniger stark verkalkt (Abb. 2). Der zentrale Bereich des Granuloms wird von einer epitheloidzelligen Zone umgeben, die von phagozytierenden Monozyten bzw. Histiozyten gebildet wird, stellenweise vergesellschaftet mit mehrkernigen Riesenzellen. In diese Zone von Makrophagen sind in der Regel auch eosinophile Granulozyten eingestreut, wie es gerade für parasitäre Granulome typisch ist. Nach außen hin schließt sich ein schmaler Saum von Lymphozyten und Plasmazellen an. Regelmäßig findet man auch follikelartige Lymphozytenansammlungen, die in manchen Herden gehäuft und gelegentlich allseitig von Bindegewebe umschlossen auftreten (Abb. 3). Die Granulome sind von faserreichem kollagenem Bindegewebe kapselartig umgeben und schirmen das angrenzende Lebergewebe so gut von den entzündlichen Prozessen ab, daß das Parenchym normalerweise unverändert bleibt. Verbreitet findet man jedoch auch Immunozyten außerhalb der Bindegewebskapsel, besonders gehäuft in zystennahen Periportalfeldern. Regelmäßig liegen neugebildete Kapillaren verstreut im Granulationsgewebe. Protoscolices, Häkchen oder eindeutige Reste der „Parasitenkutikula“ fehlen stets.

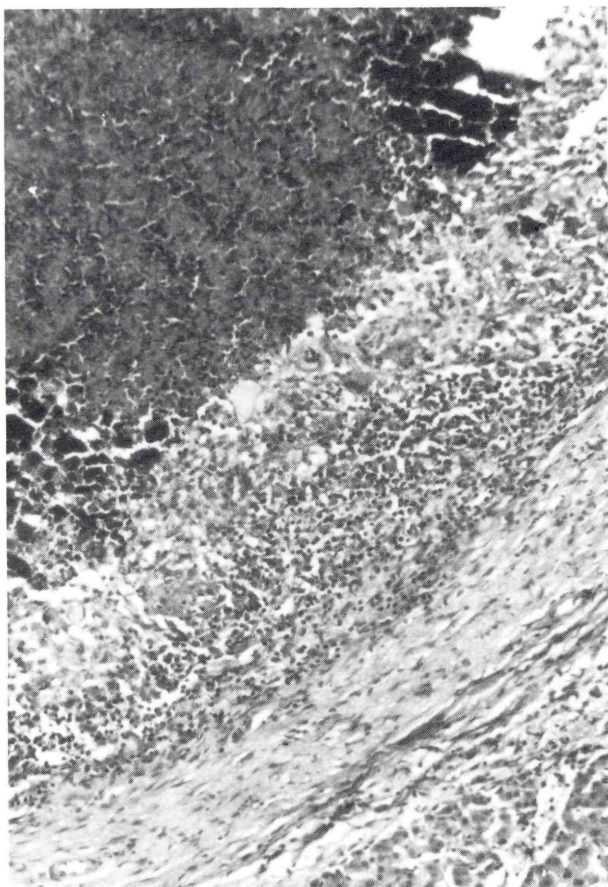


Abb. 2:
Randbereich einer Zyste.
Schwarze Bereiche links oben und Mitte rechts stellen Verkalkungen dar.
Kalkfärbung nach Kossa ($\times 110$).

Serologische Ergebnisse

Die serologischen Ergebnisse sind in den Abb. 4 - 6 dargestellt.

Für den ELISA wurde als Grenztiter die Serumverdünnung festgelegt, bei der die durchschnittlich gemessene Extinktion gerade noch größer war als die mittlere Extinktion plus ihrer 3-fachen Standardabweichung aller negativen Seren aus den beiden Kontrollschweinen. Einige Extinktionen wurden mehrfach unabhängig voneinander nachbestimmt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Der Bereich zwischen den gemessenen Extremwerten ist in den entsprechenden Abbildungen jeweils als vertikaler Balken dargestellt (Abb. 5, 6).

Der eingesetzte IHAT-Kit ist für die Verwendung von Humanserum ausgelegt und erwies sich für Schweineserum nur sehr bedingt als geeignet. Vielfach waren die Sedimentationsbilder uncharakteristisch, was das Ablesen von Grenztitern erschwerte.

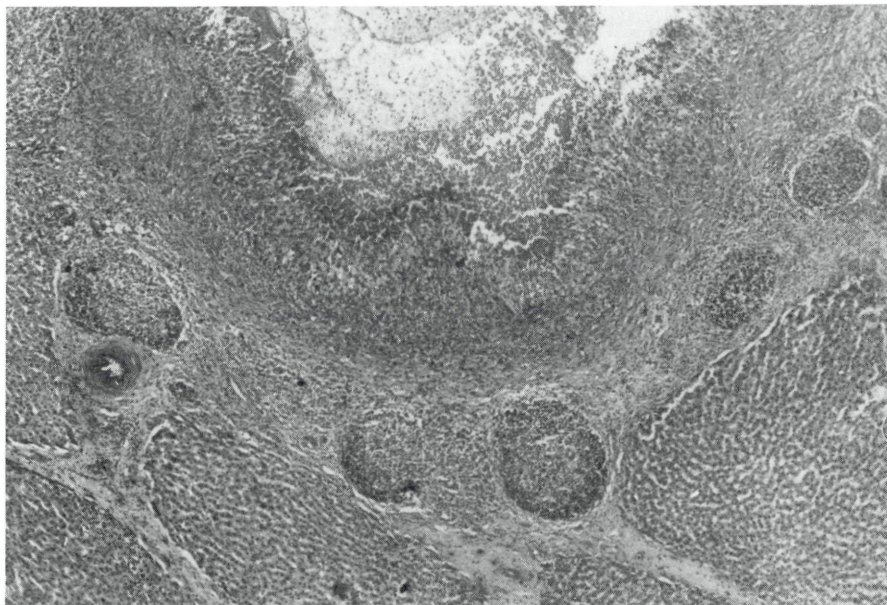


Abb. 3:
Zahlreich follikelartige Lymphozytenansammlungen im Randbereich einer Zyste.
Färbung nach Giemsa (X 50).

Diskussion

Ein Vergleich unserer pathologischen Ergebnisse mit den Befunden bei menschlicher Alveolarechinokokkose ist zunächst dadurch erschwert, daß die tumorartigen Hydatiden im Menschen fast immer bereits mehrere Zentimeter groß sind und nicht selten auch erst in einem inoperablen Zustand entdeckt werden. Im Anschnitt besitzen sie im typischen Falle eine schwammige Struktur, deren Hohlräume eine gelatinöse Masse enthalten. Pathoanatomisch besitzen sie deshalb kaum Ähnlichkeit mit den kleinen, weißen, kaum zentimetergroßen Zysten, wie sie hier in der Schweineleber gefunden wurden. Histologisch zeigt der alveoläre *Echinococcus* des Menschen ein verzweigtes, feinkammeriges Hohlraumsystem und einzelnen kleine Bläschen. Diese sind von einer Kutikula ausgekleidet, an deren Innenfläche sich zum Teil eine dünne Keimschicht befindet. Häufig fehlen Brutkapseln und Protoscolices, d. h. die Bläschen sind steril. Durch exogene Sprossung und Bildung kleiner Tochterblasen wächst der Herd ausgesprochen destruktiv und proliferativ und gleicht so einem lokal infiltrierenden malignen Neoplasma (4, 6, 15). Bei großen Larvalherden kommt es oft zur Nekrose des Zentrums mit Verkäsung und Verkalkung. Es bilden sich zystische, mit Eiter gefüllte Zerfallshöhlen, die die für *E. multilocularis* typische Kammerung verloren haben (1).

Interessant für einen Vergleich mit den Herden im Schwein ist aber weniger das Zentrum, sondern die Proliferationszone der Zysten. Sie ist gekennzeichnet durch eine intensive entzündliche Reaktion. Insbesondere dort, wo gerade Bläschen zugrunde gehen, kommt es zur Bildung von epitheloidzelligem Granulationsgewebe mit mehrkernigen Riesenzellen und wechselnden Infiltraten.

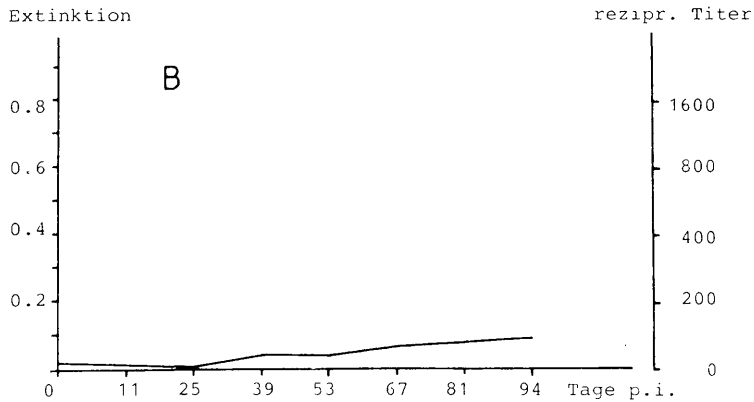
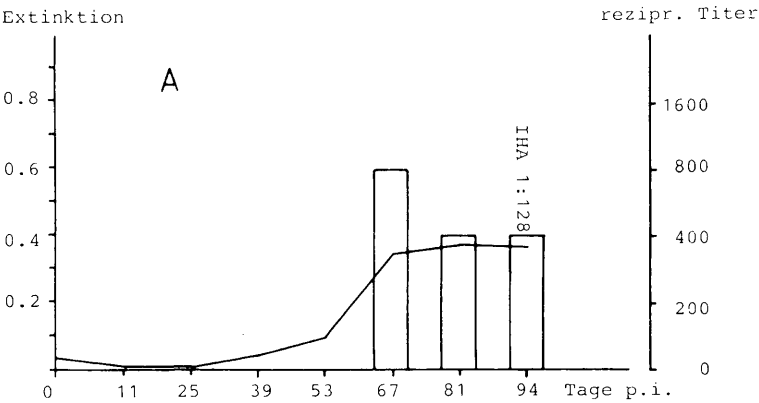


Abb. 4:
ELISA-Titer der Schweine bis 94 d. p. i.

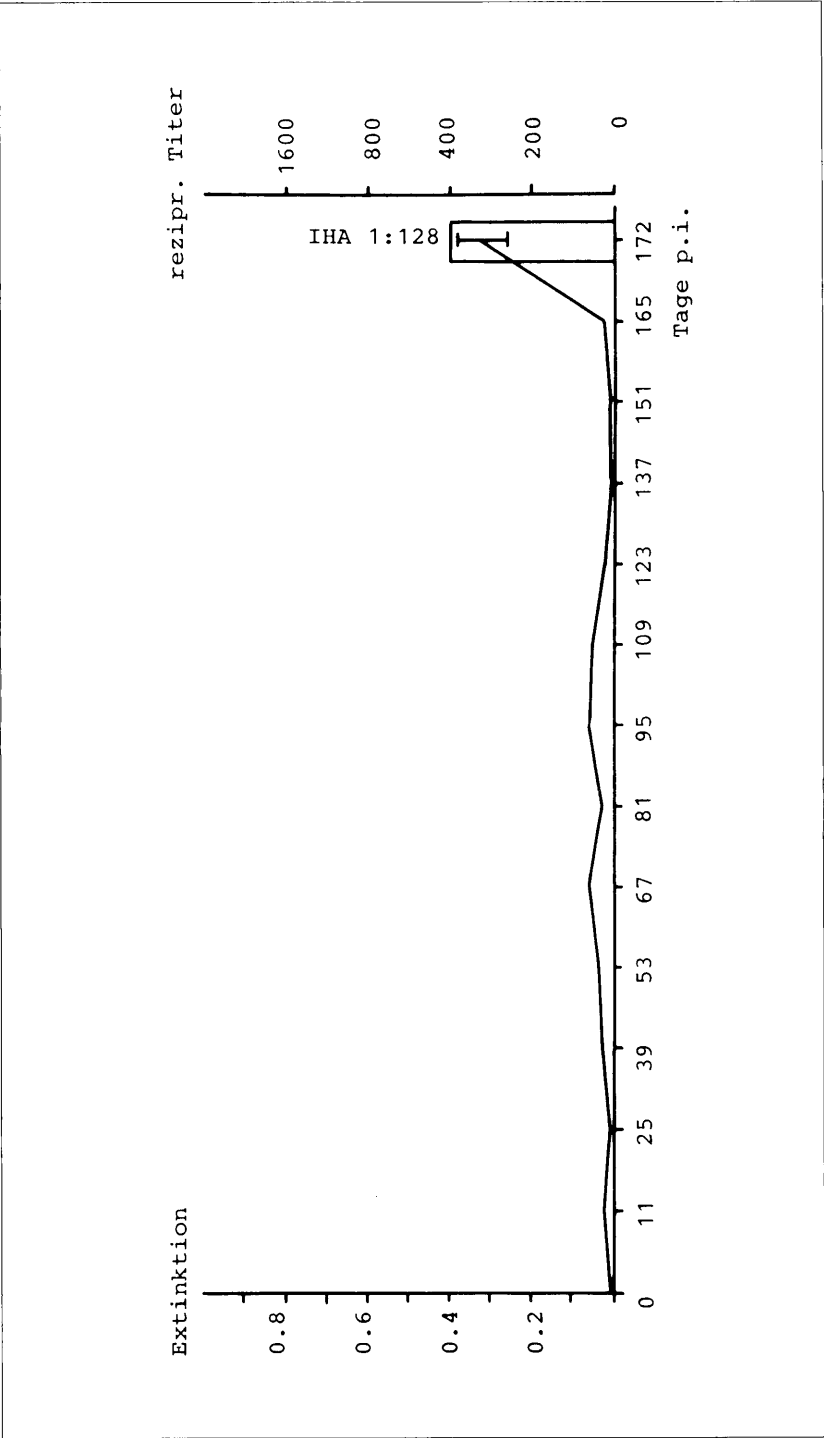


Abb. 5:
ELISA-Titer eines der Schweine bis 94 d. p. i.

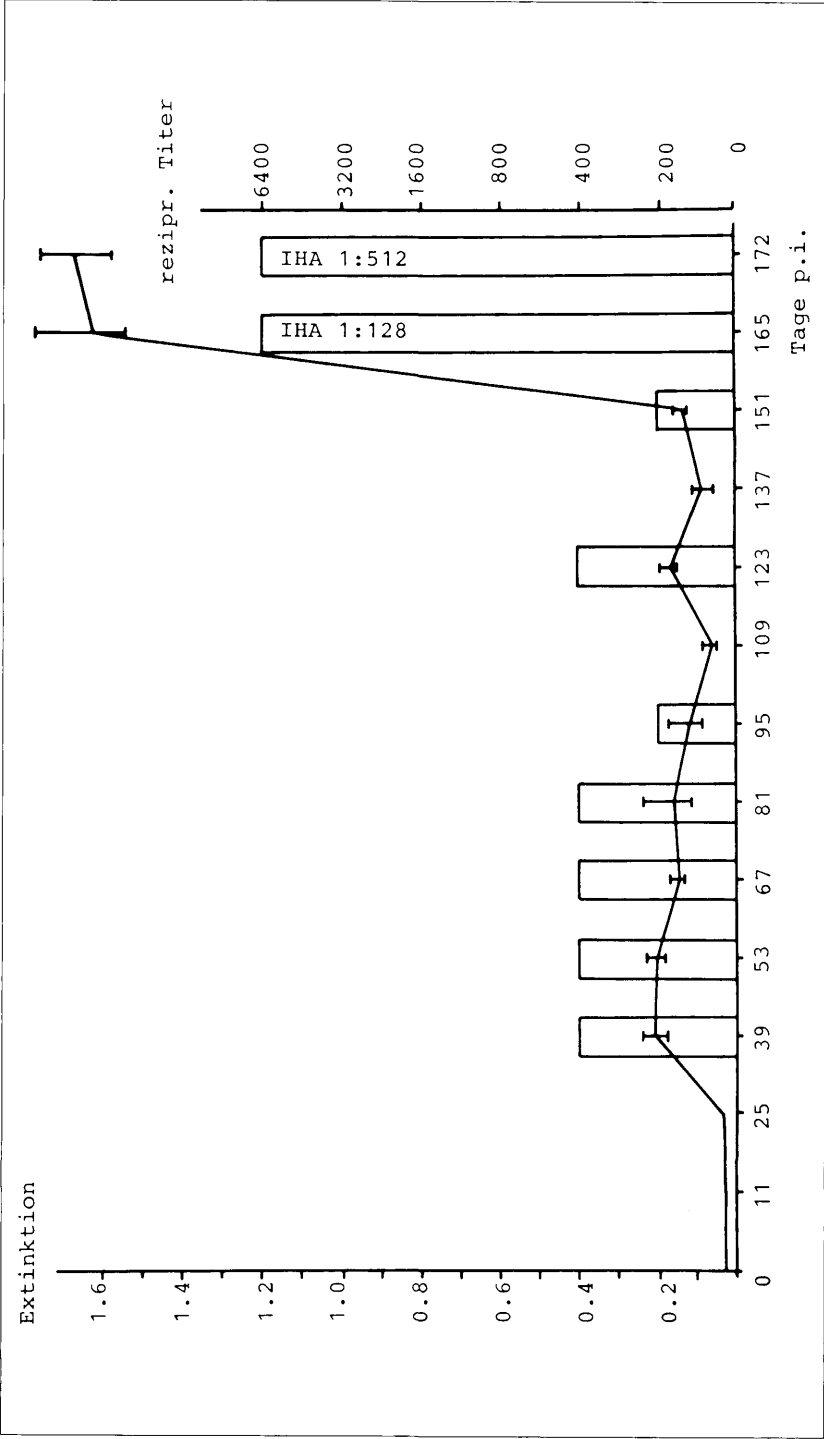


Abb. 6:
ELISA-Titer eines der Schweine bis 172 d. p. i.

Die Bildung von Narbengewebe kann sehr ausgeprägt sein (4). Somit gleicht die Gewebsreaktion in diesem Bereich genau den Vorgängen, die man auch in den Leberherden der Schweine findet. Der wesentliche Unterschied besteht aber darin, daß beim Schwein wohl aufgrund der starken Fibrosierung der Zystenwand keine Keimspore in das umgebende Lebergewebe auswachsen. Im Gegensatz zum Menschen werden deshalb in aller Regel auch keine Tochterblasen gebildet und der Parasit wächst nicht infiltrativ. Offensichtlich ist das Schwein in der Lage, den Herd erfolgreich bindegewebig abzukapseln und das Parasitengewebe abzutöten. Man kann allerdings nicht ausschließen, daß solche erfolgreiche Abwehrreaktionen, bei denen der *Echinococcus* in frühem Stadium abstirbt, bevor dieser klinisch apparent wird, unerkannt auch im Menschen ablaufen. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, daß bei seroepidemiologischen Untersuchungen in Endemiegebieten des *E. multilocularis* viel häufiger Probanden gefunden werden, die einen positiven Titer gegen *Echinococcus*-Antigen besitzen, ohne daß sich mit bildgebenden Verfahren (Computertomographie, Sonographie) eine Echinokokkose bestätigen läßt (7, 10, 12, 18).

Betrachtet man den Verlauf der Antikörpertiter bzw. der Extinktionen, so fällt auf, daß sich entweder überhaupt keine Antikörper gebildet haben oder aber eine sprunghafte Reaktion stattgefunden hat. Dem widerspricht die Tatsache, daß sich in allen Versuchsschweinen Larvalherde in unterschiedlicher Anzahl gebildet haben. Berücksichtigt man jedoch das träge reagierende Immunsystem junger Schweine (5, 11, 16) und nimmt an, daß die Echinokokkenlarven bereits in einem relativ frühen Stadium ihrer Entwicklung bindegewebig abgekapselt werden, wie sich aus Vergleichen mit Entwicklungsstadien in der Feldmaus (*Microtus arvalis*) ableiten läßt (3, 17), ist es wahrscheinlich, daß der Antigenkontakt zu Beginn der Infektion nicht ausgereicht hat, um eine nachweisbare Antikörperbildung in den Ferkeln zu stimulieren. Im weiteren Verlauf des Versuches erreichen die Schweine zwar recht bald ihre immunologische Reife, doch kann man annehmen, daß gleichzeitig die Zystenwand immer mächtiger wird und den Herd immer vollkommener gegen das umgebende Gewebe abschirmt, sodaß der Kontakt des Antigens mit dem Wirt weitgehend unterbunden wird, wie dies auch bei den stark bindegewebig abgegrenzten Hydatiden des *E. granulosus* in der Lunge beim Menschen der Fall ist. Allein die Isolierung des Herdes kann ausreichen, eine Stimulierung der Antikörperbildung zu verhindern. Einen sprunghaften Anstieg des Antikörpertiters kann man damit erklären, daß es ab und zu zu Mikroläsionen in einer Zystenwand kommt, die einen vorübergehenden Antigenkontakt ermöglichen. Diese Theorie eines diskontinuierlichen Antigenkontaktes wird dadurch unterstützt, daß nach einer solchen plötzlichen starken Antikörperbildung der Titer wieder kontinuierlich abnimmt, der Antigenkontakt offenbar wieder unterbunden wird (Abb. 6). Bei wiederholtem Antigenkontakt kommt es eindeutig zu einer nachhaltig verstärkten Immunantwort (Abb 6), die man im Sinne eines Booster-Effektes interpretieren kann.

Zusammenfassung

Um die Empfänglichkeit von Schweinen für *Echinococcus multilocularis* abzuklären, wurden vier Ferkel im Alter von 7 Wochen oral mit ca. 10.000 Eiern infiziert. Als Kontrollschweine dienten zwei Ferkel desselben Wurfs.

Je zwei Versuchstiere wurden 94 d. p. i. und 172 d. p. i. geschlachtet. Der pathoanatomische Befund ergab kleine, wenige millimeter- bis knapp zentimetergroße, derbe, weiße Knötchen, die sich in unterschiedlicher Anzahl (1 - 136 Stück) subkapsulär oder in der Tiefe des Leberparenchyms befanden. Ein bevorzugter Sitz konnte nicht festgestellt werden.

Histopathologisch stellten sich die knotigen Veränderungen als typische Granulome dar, deren nekrotisches Zentrum sehr wahrscheinlich bakteriell besiedelt und regelmäßig verkalkt war. Brutkapseln, Protoscolices, Hähkchen oder eindeutige Reste einer „Kutikula“ konnten nicht gefunden werden.

Zusätzlich wurde eine serologische Verlaufskontrolle auf *Echinococcus*-Antigen mittels ELISA und IHAT durchgeführt. Dabei zeigten sich entweder keine oder sprunghafte Antikörpertiter, die in Zusammenhang mit der Art der Abkapselung der Parasitenherde in der Leber gebracht und auf einen diskontinuierlichen Antigenkontakt zurückgeführt werden.

Schlüsselwörter

Echinococcus multilocularis, Schwein, experimentelle Infektion, ELISA, IHAT

Summary

Experimental studies on the susceptibility of pigs to *Echinococcus multilocularis*

4 piglets at 7 weeks of age were experimentally inoculated with *Echinococcus multilocularis*, 2 littermates were controls. The egg dose was at least 10,000. Two infected pigs from each group were killed 3 months and 6 months p. i. respectively.

Post mortem examination revealed rounded nodules in the livers of all infected pigs. The nodules were measuring up to 10 mm in diameter, pale and were found in numbers ranging from 1 to 136 superficially or deeply in the parenchyma of the liver.

Histopathologically the foci appeared as typical granulomas. The nodule was composed of the thick outer fibrous layer and a central necrotic area, probably bacterially infected and calcified as a rule. Brood capsules, protoscolices or hooklets and probably residues of a cuticular layer were lacking.

Serum antibody response was studied by the application of the indirect haemagglutination test (IHAT) and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Serologically we found either negative reactions or erratically increasing antibody titers, which may be the effect of strong encapsulation of the foci. In this case we assume a discontinuous antigen contact in cases of micro lesions of the connective tissue layer.

Key words

Echinococcus multilocularis, pig, experimental infection, ELISA, IHAT

Literatur

1. BÄHR, R. (1981):
Die Echinokokkose des Menschen.
Enke, Stuttgart.
2. BANKS, M., CARTWRIGHT, S. (1983):
Comparison and evaluation of four serological tests to detection of antibodies to Aujeszky's disease virus.
Vet. Rec. 113, 38 - 41.

3. BOSCH, Dagmar (1979):
Untersuchungen über die Entwicklung der Onkosphären von *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 im natürlichen Zwischenwirt, der Feldmaus (*Microtus arvalis* Pallas, 1779).
Diplomarbeit aus der Abteilung Parasitologie der Universität Hohenheim.
4. COTTIER, H. (1980):
Pathogenese Bd. 2, Springer/Heidelberg.
5. CURTIS, Jill; BOURNE, F. J. (1971):
Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs.
Bioch. biophys. acta 236, 319 - 322.
6. FRANK, W. (1976):
Parasitologie. Ulmer/Stuttgart.
7. FRANK, W. (1987):
Echinococcus multilocularis in Süddeutschland — Persistenz einer Zoonose im mitteleuropäischen Raum.
Heidelberger geographische Arbeiten, Heft 83, 86 - 113.
8. GÖNNERT, R., THOMAS, H. (1969):
Einfluß von Verdauungssäften auf die Eihüllen von *Taenia*-Eiern.
Z. Parasitenkd. 32, 237 - 253.
9. GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., FEY, H. (1983):
Serological differentiation between *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* infections in man.
Z. Parasitenkd. 69, 347 - 356.
10. KIMMING, P., MÜHLING, Annette (1985):
Erhöhte Gefährdung durch *Echinococcus multilocularis* für Menschen im Endemiegebiet „Schwäbische Alb“?
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 181, 184, - 196.
11. KLOBASA, F., WERHAHN, E., BUTLER, J. E. (1981):
Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin.
Res. Vet. Sci. 31, 195 - 206.
12. MÜHLING, Annette (1986):
Zur Epidemiologie der alveolären Echinokokkose in Süddeutschland — eine serologische Studie.
Dissertation, Universität Hohenheim.
13. RUITENBERG, E. J., STEERENBERG, P. A., BROSI, B. J. M., BUYS, Jannie (1976):
Reliability of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in conventionally raised pigs.
Tijdschr. Diergeneesk. 101, 57 - 70.
14. SILVERMAN, P. H. (1954):
Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova, and some criteria of their viability.
Ann. Trop. Med. Parasit. 48, 207 - 215.
15. STUCKE, K. (1980):
Echinokokkose der Leber. In: KÜHN, H. A., WENZE, H.
Klinische Hepatologie. Thieme/Stuttgart.
16. WILSON, M. R. (1974):
Immunologic development of the neonatal pig.
J. Anim. Sci. 38, 1018 - 1021.
17. ZEITLER, Maren (1984):
Histologische Untersuchungen der Entwicklungsstadien von *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 in der Feldmaus (*Microtus arvalis* Pallas, 1779).
Diplomarbeit aus der Abteilung Parasitologie der Universität Hohenheim.
18. ZEYHLE, E., FRANK, W. (1982):
Antikörper gegen *Echinococcus multilocularis*.
Münch. Med. Wschr. 124, 1133 - 1134.

KORRESPONZADRESSE:

Dipl. Biol. Thomas Pfister
Prof. Dr. Werner Frank

Abteilung Parasitologie
Universität Hohenheim

Emil-Wolff-Straße 34
D-7000 Stuttgart 70
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: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Pfister Thomas, Frank Werner

Artikel/Article: [Experimentelle Untersuchungen zur Empfänglichkeit des Schweines für Echinococcus multilocularis. 103-114](#)