

# Parasitologische und immunologische Methoden zum Nachweis von *Echinococcus multilocularis* bei Füchsen

J. Eckert, P. Deplazes, D. Ewald, B. Gottstein

## Einleitung

In den letzten Jahren ist der Öffentlichkeit in zunehmendem Maße bewußt geworden, daß der sogenannte „Gefährliche Fuchsbandwurm“, *Echinococcus multilocularis*, in verschiedenen Gebieten Europas ein Bedrohungspotential darstellt, weil Larvalstadien dieses Parasiten beim Menschen die alveoläre Echinokokkose hervorrufen können. Diese Krankheit kommt zwar selten vor, sie verläuft jedoch in der Regel gravierend und hat in unbehandelten Fällen eine sehr ungünstige Prognose (5). Aus diesem Grunde werden in jüngster Zeit vermehrt Füchse und zum Teil auch Hunde und Katzen auf Befehl mit intestinalen Stadien von *E. multilocularis* untersucht. Dabei besteht das Problem, daß die bisher verfügbaren parasitologischen Methoden recht arbeitsaufwendig sind und bei der Untersuchung ein Infektionsrisiko für die Untersucher besteht. Daher erscheint es angezeigt, verbesserte Untersuchungsmethoden zu entwickeln.

Diese Arbeit soll über den derzeitigen Stand der Methoden, Ansätze zu neuen Entwicklungen sowie einige Aspekte der bei Laborarbeiten notwendigen Sicherheitsvorkehrungen orientieren.

## Parasitologische Methoden

### 1. Formalin-Methode

Der parasitologische Nachweis von *E. multilocularis* im Dünndarm von Füchsen beruht auf der Feststellung der Parasiten bei der Sektion. Um das Infektionsrisiko für die Untersucher bei den auf die Sektion folgenden Schritten zu reduzieren, können Teile des eröffneten Dünndarmes (z. B.  $3 \times 10$  cm des hinteren Dünndarmes) nach der Sektion in Gläser mit physiologischer Kochsalzlösung überführt und etwa zwei Stunden darin belassen werden, damit sich möglichst viele Parasiten von der Darmwand ablösen. Danach wird Formalin in einer bestimmten Menge zugegeben, so daß eine Endkonzentration von mindestens 4% entsteht. Nach einer Fixationszeit von etwa 24 Stunden werden die Gläser in einem Wasserbad unter einem Abzug für mindestens 20 Minuten auf 70 bis 80° C erhitzt. Nach Abkühlung kann dann gefahrlos eine stereomikroskopische Untersuchung der Fixierungsflüssigkeit (im Durchlicht) und gegebenenfalls auch der Darmwand (im Auflicht) erfolgen.

Diese Methode hat sich aus folgenden Gründen nicht bewährt: Sie erfaßt nur etwa die Hälfte aller infizierten Füchse, sie ist sehr zeitaufwendig, und die mikroskopische Untersuchung der Flüssigkeit erfordert Schutzmaßnahmen gegen das Einatmen der Formalindämpfe.

## 2. Darmabstrich-Methode

Die in den Untersuchungen von ZEYHLE und FRANK (pers. Mitt.) sowie von SCHOTT und MÜLLER (10) angewandte Darmabstrichmethode wird in unserem Labor in folgender Modifikation eingesetzt: Mit Objektträgern werden von verschiedenen Stellen des Dünndarmes 15 Abstriche angefertigt. Das abgestrichene Material wird dann mit Hilfe der Objektträger in eckigen Plastikschalen zu einer dünnen Schicht gepreßt und anschließend stereomikroskopisch untersucht. Diese Untersuchungen erfolgen nur an Füchsen, die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren waren (siehe „Sicherheitsvorkehrungen“).

Mit Hilfe dieser Methode wurden 1988/89 zunächst 93 Füchse aus dem Kanton Zürich und 13 aus dem Thurgau untersucht. Von diesen 106 Tieren waren 14,0% mit *E. multilocularis* befallen. Von Mai bis Oktober 1990 wurden weitere 382 Füchse aus verschiedenen Regionen des Kantons Zürich untersucht. Davon waren durchschnittlich 39,8% befallen. Die Ursachen für die Unterschiede in den Befallshäufigkeiten der beiden untersuchten Fuchsgruppen müssen noch analysiert werden.

Die Darmabstrich-Methode hat sich von den beiden erwähnten Verfahren als die bessere erwiesen.

## Immunologische Methoden

Aufgrund neuerer Untersuchungen australischer Autoren (9) ist bekannt, daß intestinale Stadien von *Taenia*- oder *Echinococcus*-Arten in Endwirten die Bildung zirkulierender Antikörper stimulieren, die gegen Antigene dieser Adult-Stadien oder gegen Onkosphären-Antigene gerichtet sind. Diese Antikörper sind im Serum oder in der Körperflüssigkeit der Endwirte feststellbar.

Ferner besteht die Möglichkeit, Antigene nachzuweisen, die von den Zestoden in den Darminhalt abgesondert werden und somit im Kot ausgeschieden werden (= Koproantigene).

### 1. Antikörpernachweis

Im Rahmen einer internationalen Studie (2, 9) haben wir versucht, im Serum oder in Flüssigkeit aus der Pleurahöhle mit Hilfe eines ELISA unter Verwendung des sehr spezifischen Em2-Antigens Antikörper nachzuweisen (= Ermittlung der Seroprävalenz); gleichzeitig wurden die Prävalenzen des Befalls mit intestinalen Stadien von *E. multilocularis* ermittelt (abgekürzt: E. m.-Prävalenzen).

Bei einer Gruppe von 98 norwegischen Farmfüchsen, die nachweislich frei von *E. multilocularis* waren, konnten keine parasiten-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Hingegen wurden bei Füchsen aus Endemiegebieten unterschiedliche E. m.-Prävalenzen und Seroprävalenzen festgestellt (Tab. 1).

Die Daten der Tabelle zeigen, daß offenbar eine gewisse Abhängigkeit zwischen der durchschnittlichen E. m.-Prävalenz und der Seroprävalenz in einer Fuchspopulation besteht. Die Seroprävalenz dürfte somit Rückschlüsse auf die E. m.-Prävalenz in einer Fuchspopulation ermöglichen.

Die näher aufgeschlüsselten Daten machen jedoch deutlich, daß Antikörper zu einem hohen Prozentsatz nicht nur bei den mit *E. multilocularis* befallenen Füchsen nachweisbar waren, sondern auch bei einem hohen Anteil von Tieren, bei denen keine Echinokokken gefunden wurden. Da die Spezifität des Tests sehr hoch ist (9), dürften die Füchse ohne nachweisbaren *E. multilocularis*-Befall früher einmal Kontakt mit Antigenen des Erregers gehabt haben. Daraus folgt, daß der von uns durchgeführte ELISA nicht zur Diagnose des *E. multilocularis*-Befalles am Einzeltier geeignet ist, jedoch zur Abschätzung der Infektionsrate der Fuchspopulationen anwendbar ist.

TABELLE 1  
**Durchschnittliche *Echinococcus multilocularis*-Prävalenzen (E-P)  
 und Seroprävalenzen (S-P)\* bei Füchsen**

Füchse Herkunft	Zahl	Durchschnittswerte in %		% der S-P bei Füchsen mit ohne Befall durch <i>E. multilocularis</i>	
		E-P	S-P		
Deutschland	244	54,9	59,6	61,9	57,2
Schweiz	106	14,1	38,8**	(50,0)	37,6
Österreich	139	3,6	12,2	(40,0)	11,2
Norwegen	98	0,0	0,0	0,0	0,0

\*) Seroprävalenz = Antikörper nachgewiesen

\*\*\*) 103 Tiere. In Klammern: aus kleinen Zahlen errechnete Werte.

Serologische Stichprobenuntersuchungen von 402 Füchsen aus verschiedenen Kantonen der westlichen Schweiz (FR, GE, NE, VD, VS) ergaben Seroprävalenzen von 23% bis 65%, die auf eine ziemlich hohe Durchseuchung der Fuchspopulationen mit *E. multilocularis* hindeuten. Hingegen wiesen nur 4% von 26 Füchsen aus dem Tessin (Südschweiz) und 6% von 54 Füchsen aus Schleswig-Holstein (Norddeutschland) gegen Em2-Antigen gerichtete Antikörper auf (9). In den beiden letztgenannten Gebieten ist *E. multilocularis* bisher unseres Wissens nicht nachgewiesen worden. Die niedrigen Seroprävalenzen sollten jedoch Anlaß dazu sein, die dortigen Fuchspopulationen durch parasitologische Untersuchungen zu überprüfen.

## 2. Nachweis von Koproantigenen

In unserem Institut wurde von DEPLAZES et al. (3) ein Sandwich-ELISA zum Nachweis löslicher Antigene von *Taenia hydatigena* in Kotproben von Hunden entwickelt. Damit konnten bei allen sechs künstlich mit je zehn Zystizerken von *T. hydatigena* infizierten Hunden Koproantigene nachgewiesen werden, und zwar während der Präpatenz ab dem 18. bis 45. Tag nach der Infektion (p. i.) und auch während der Patenz. Innerhalb von fünf Tagen nach Elimination der Zestoden durch Chemotherapie (bei drei Hunden) verschwanden die Koproantigene.

Dieser Test ist unterdessen in einer Kooperation mit der Clinic of Parasitic and Tropical Diseases (Prof. Z. Pawlowski), in Poznan/Polen zum Nachweis von Koproantigenen bei Patienten mit *Taenia saginata*-Befall adaptiert worden (4). Die Spezifität dieses Tests liegt bei 95%, die Sensitivität bei 85%. Diese Sensitivität ist höher als jene der üblichen parasitologischen Untersuchungsmethoden. Einen ähnlichen Test setzten ALLEN et al. (1) zum Nachweis der Koproantigene von *Taenia solium* (Wirte: Goldhamster, Mensch) oder *Taenia saginata* (Wirt: Mensch) ein.

Mit dem oben erwähnten Sandwich-ELISA ließen sich bei sechs von neun Hunden, die experimentell mit *Echinococcus granulosus* infiziert worden waren, erstmalig am 15. Tag p. i. Koproantigene nachweisen. Der Test erwies sich als spezifisch für die Gattung *Echinococcus*. Kreuzreaktionen traten nur bei Füchsen mit *E. multilocularis*-Befall auf (2). Diese vorläufigen Ergebnisse erscheinen hinsichtlich der prinzipiellen Möglichkeiten des Nachweises von Koproantigen bei *Echinococcus*-Befall von Karnivoren ermutigend, doch sind noch weitere Abklärungen zur Sensitivität und Spezifität des Verfahrens erforderlich.

Die neuen Möglichkeiten des Nachweises von Antikörpern und Koproantigenen werden wahrscheinlich das diagnostische Repertoire zur Diagnose des *Echinococcus*-Befalles bei Karnivoren sowie zur Durchführung weiträumiger epidemiologischer Studien verbessern. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) zum Nachweis von *Echinococcus*-DNA in Abstrichen der Darmschleimhaut oder in Kotproben, die ganze Zestoden, Proglottiden oder Eier enthalten (7, 8).

### Sicherheitsvorkehrungen

Bei diagnostischen Arbeiten mit adulten Stadien von *E. multilocularis* und *E. granulosus* besteht für die Untersucher ein Infektionsrisiko, das bezüglich der möglichen Folgen in eine hohe Gefährdungsstufe einzuordnen ist. Daher sollten von den verantwortlichen Stellen möglichst umgehend Vorschriften über Sicherheitsvorkehrungen für Labors erlassen werden. Untersuchungslabors sollten Arbeiten mit den erwähnten Parasiten nur dann durchführen, wenn bestimmte Sicherheitsvorkehrungen eingehalten werden können. Dazu gehören mehrere Maßnahmen, die hier nicht alle beschrieben werden können. Es sei jedoch erwähnt, daß nach Untersuchungen von FRANK et al. (6), eigenen Feststellungen (unveröffentl.) und Literaturangaben, die Eier von *E. multilocularis* bei  $-80^{\circ}\text{C}$  innerhalb von 48 Stunden abgetötet werden. Daher werden in unserem Institut sämtliche Füchse vor der Sektion eine Woche lang bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Außerdem werden die an der Untersuchung beteiligten Personen 1 bis 2 mal jährlich im ELISA mit dem für *E. multilocularis* hochspezifischen Em2-Antigen sowie mit anderen *Echinococcus*-Antigenen auf Antikörper untersucht. Solche Vorsorge- oder Überwachungsuntersuchungen haben wir kürzlich auch für Jäger eingeführt, die Kontakt mit Füchsen hatten, bei denen *E. multilocularis*-Befall nachgewiesen worden ist.

### Zusammenfassung

Die Arbeit bietet einen Überblick über die gegenwärtig verfügbaren oder in Evaluation befindlichen parasitologischen und immunologischen Methoden zum Nachweis von *E. multilocularis* bei Füchsen.

Für den Nachweis von *E. multilocularis* im Dünndarm von Füchsen bei der Sektion ist die Darmabstrich-Methode unter Verwendung von 15 Schleimhautabstrichen pro Darm und anschließender stereomikroskopischer Untersuchung der Abstriche hinreichend effizient. Zur Minimierung des Ansteckungsrisikos des Untersuchers werden die Füchse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  während einer Woche vor der Sektion tiefgefroren, da die Eier von *E. multilocularis* unter diesen Bedingungen abgetötet werden. Dies konnten eigene Beobachtungen bestätigen.

In den Jahren 1988/89 und 1990 wurden zwei Gruppen von 106 und 382 Füchsen aus den Schweizer Kantonen Zürich und Thurgau mit der Darmabstrich-Methode untersucht; 14,0% bzw. 39,8% waren mit *E. multilocularis* infiziert.

Für den Nachweis von Antikörpern in Körperflüssigkeiten (Serum oder Flüssigkeit aus der Pleurahöhle) von Füchsen wurde ein ELISA unter Verwendung des sensiblen und für *E. multilocularis* hochspezifischen Em2-Antigens eingesetzt. Während 98 zestodenfreie Farmfüchse aus Norwegen keine Antikörper gegen Em2-Antigene aufwiesen, waren 59,6%, 38,8% bzw. 12,2% der Füchse aus endemischen Regionen Deutschlands, der Schweiz und Österreichs antikörperpositiv. Diesen Seroprävalenzen entsprachen in den gleichen Fuchspopulationen Prävalenzen von *E. multilocularis* von 54,9%, 14,1% bzw. 3,6%. Der Em2-ELISA ist für die Diagnose am Einzeltier nicht geeignet, er dürfte jedoch für großräumige Voruntersuchungen von Fuchspopulationen einsetzbar sein.

Als weitere Techniken von potentiellem Wert zur Diagnose des *E. multilocularis*-Befalles bei Füchsen werden der Koproantigen-Nachweis im ELISA und der Nachweis von Parasiten-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion diskutiert. Diese Techniken sind von unserer Gruppe bereits zur Diagnose des *Taenia*-Befalles bei Hunden und Menschen erfolgreich eingesetzt worden.

### Schlüsselwörter

*Echinococcus multilocularis*, *Taenia sp.*, Fuchs, parasitologische Diagnose, Immun-diagnose, Epidemiologie.

### Summary

Parasitological and immunological methods for the detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes.

This paper reviews parasitological and immunological techniques for the detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes.

For the detection of *E. multilocularis* in the small intestine of foxes at necropsy the smear technique, using 15 mucosal smears from different locations of the intestine, with subsequent stereomicroscopical examination of the smears is sufficiently effective. In order to minimize the infection risk for the examiner, foxes are deep-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for one week prior to necropsy as eggs of *Echinococcus multilocularis* are most likely killed under these conditions. This could be confirmed by own observations.

In 1988/89 and 1990 two groups of 106 and 382 foxes (Swiss Cantons of Zürich and Thurgau) were examined using the smear technique; 14.0 and 39.8% were infected with *E. multilocularis*, respectively.

An ELISA using the sensitive and highly species-specific *E. multilocularis* 2-antigen (Em2-antigen) was applied for antibody detection in body fluids (serum or fluid from the pleural cavity) while 98 cestode-free foxes from Norwegian fox farms did not contain antibodies against Em2-antigen, 59.6%, 38.8% and 12.2% of foxes from endemic areas in Germany, Switzerland and Austria were antibody-positive. These sero-prevalences were related to prevalences of *E. multilocularis* of 54.9%, 14.1% and 3.6% in the same fox populations. The Em2-ELISA is unreliable for the diagnosis of *E. multilocularis* in individual animals but it appears suitable for large-scale pre-screening of fox populations. As further techniques of potential value for the diagnosis of *E. multilocularis* in foxes, copro-antigen detection by ELISA and the identification of parasite DNA by the Polymerase Chain Reaction are discussed. These techniques have already been successfully applied by our group for the diagnosis of *Taenia* infections in dogs and man.

### Key words

*Echinococcus multilocularis*, *Taenia sp.*, fox, parasitological diagnosis, immunodiagnosis, epidemiology.

Mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds (Projekt-Nr.: 31-28259.90).

## Literatur

1. ALLAN, J. C., AVILA, G., GARCIA NOVAL, G., FLISSER, A., CRAIG, P. S. (1990): Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 101, 473-477.
2. DEPLAZES, P., ECKERT, J., GOTTSTEIN, B. (1990 a): Antibody- and coproantigen detection for intestinal *Taenia* and *Echinococcus* infection in foxes and dogs. Second Internat. Symposium on Echinococcosis, August 16-17, 1990, Zürich, Abstract.
3. DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., STINGELIN, Y., ECKERT, J. (1990 b): Detection of *Taenia hydatigena* copro-antigens by ELISA in dogs. *Vet. Parasitol.* 36, 91-103.
4. DEPLAZES, P., ECKERT, J., PAWLOWSKI, Z. S., MACHOWSKA, L., GOTTSTEIN, B. (1991): An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* copro-antigens in humans. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 391-396.
5. ECKERT, J., AMMANN, R. (1990): Informationen zum sogenannten „Fuchsbandwurm“. *Schweiz. Ärztezeitung* 71, 63-67.
6. FRANK, W., SCHÄFER, J., PFISTER, T., SCHAD, V. (1989): Potential ways of decontamination of food from *Echinococcus multilocularis* eggs and sensitivity of eggs against physical and chemical methods of disinfection. WHO Informal Consultation on Alveolar Echinococcosis, 14. - 16. August, 1989, Hohenheim.
7. GOTTSTEIN, B. (1990): The polymerase-chain-reaction (PCR) for the diagnosis and specific identification of *Echinococcus* spp. Second Internat. Symposium on Echinococcosis, 16. - 17. August, 1990, Zürich, Abstract.
8. GOTTSTEIN, B., DEPLAZES, P., TANNER, I., SKAGGS, J. (1991): Diagnostic identification of *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 248-249.
9. GOTTSTEIN, B., DEPLAZES, P., ECKERT, J., MÜLLER, B., SCHOTT, E., HELLE, O., BOUJON, P., WOLFF, K., WANDELER, A., SCHWIETE, U., MOEGLE, H. (1990): Serological (Em2-ELISA) and parasitological examinations of fox populations for *Echinococcus multilocularis* infections. *J. Vet. Med. B* 38, 161-168.
10. SCHOTT, E., MÜLLER, B. (1989): Zum Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* beim Rotfuchs im Regierungsbezirk Tübingen. *Tierärztl. Umsch.* 44, 367-370.

## KORRESPONDENZADRESSE:

Prof. Dr. J. Eckert  
Institut für Parasitologie, Universität Zürich

Winterthurer Str. 266 a  
CH-8057 Zürich · Helvetia

# 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: 1991

Band/Volume: [13](#)

Autor(en)/Author(s): Eckert J., Deplazes Peter, Ewald D., Gottstein Bruno

Artikel/Article: [Parasitologische und immunologische Methoden zum Nachweis von Echinococcus multilocularis bei Füchsen. 25-30](#)