

Anja Blankenburg

**Untersuchungen zur alveolären Echinokokkose
bei Bartaffen (*Macaca silenus*)**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Aus der Abteilung Infektionspathologie
des Deutschen Primatenzentrums Göttingen**

**Untersuchungen zur alveolären Echinokokkose
bei Bartaffen (*Macaca silenus*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Anja Blankenburg
aus Berlin

Hannover 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Hannover, Univ., Diss., 2004
ISBN 3-86537-125-6

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
2. Gutachter: PD Dr. H. Sann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2004

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-125-6

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	13
2	Literaturübersicht	15
2.1	Bartaffen (<i>Macaca silenus</i>)	15
2.1.1	Systematik	15
2.1.2	Vorkommen und Lebensweise	16
2.1.3	Haltung in der Obhut des Menschen	19
2.2	Alveoläre Echinokokkose	21
2.2.1	Ätiologie	21
2.2.2	Epidemiologie	24
2.2.3	Klinik und Pathogenese	29
2.2.4	Pathologie	35
2.2.5	Therapie	37
2.3	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) ..	41
2.3.1	Struktur und Funktion der MHC-Moleküle	42
2.3.2	Die Gene der MHC-Moleküle	45
3	Tiere, Material und Methoden	49
3.1	Tiere und Material	49
3.1.1	Tiere	49
3.1.2	Probenmaterial	51
3.1.3	Lösungen und Puffer	52
3.1.4	Primer	52
3.2	Methoden	52
3.2.1	Bildgebende Verfahren	52
3.2.2	Blutuntersuchung	53
3.2.2.1	Hämatologische Untersuchungen	53
3.2.2.2	Serologische Untersuchungen	53
3.2.3	Pathomorphologische Untersuchungen	55
3.2.3.1	Paraffineinbettung	55
3.2.3.2	Anfertigung von Gewebeschnittpräparaten	55

3.2.3.3	Färbungen für die histopathologische Untersuchung.....	55
3.2.3.4	Immunhistochemische Untersuchungen	56
3.2.3.5	Elektronenmikroskopische Präparation.....	56
3.2.3.6	Auswertung und Dokumentation	57
3.2.4	Genetische Untersuchungen.....	58
3.2.4.1	DNA-Isolierung.....	58
3.2.4.2	Bestimmung der optischen Dichte	59
3.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	59
3.2.4.4	Agarosegelelektrophorese	62
3.2.4.5	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	62
3.2.4.6	Reinigung von PCR-Produkten.....	63
3.2.4.7	Sequenzierung, Auswertung und Registrierung der DNA-Sequenzen	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Bildgebende Verfahren	65
4.1.1	Röntgen	65
4.1.2	Ultraschall	66
4.2	Blutuntersuchung	66
4.2.1	Hämatologische Untersuchungen.....	67
4.2.2	Serologische Untersuchungen.....	67
4.3	Pathologie.....	68
4.3.1	Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchungen	68
4.3.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.....	72
4.3.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.....	75
4.3.4	Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	82
4.4	Genetische Untersuchungen.....	91
4.4.1	Identifizierung von <i>Masi</i> MHC-Klasse-II-Allelen.....	91
4.4.2	Stammbaumdarstellungen der Bartaffenkolonie.....	94
5	Diskussion.....	97
5.1	Überlegungen zur Infektion	97
5.2	Klinische Veränderungen.....	99
5.3	Pathomorphologische Veränderungen	101

5.3.1	Pathologisch-anatomische Merkmale	101
5.3.2	Histologische Merkmale	102
5.3.3	Ultrastrukturelle Merkmale	103
5.4	Genetische Untersuchungen	105
5.4.1	Zusammenhänge zwischen MHC und alveolärer Echinokokkose	106
5.4.2	Identifizierung von <i>Masi</i> MHC-Klasse-II-Allelen	108
6	Zusammenfassung	109
7	Summary	112
8	Literaturverzeichnis	114
9	Anhang	134
9.1	Lösungen und Puffer	134
9.2	Primer	135
9.3	Protokolle für die Histologie	136
9.3.1	Hämalaun & Eosin-Färbung	136
9.3.2	Giemsafärbung	137
9.3.3	Periodic Acid Schiff- (PAS) Reaktion	137
9.3.4	Trichromfärbung nach Goldner	138
9.3.5	Amyloid-Färbung mit Kongorot	138
9.4	Protokoll für die Immunhistochemie	139
9.5	Protokolle der elektronenmikroskopischen Präparation	142
9.5.1	Epongemisch nach LUFT (1961)	142
9.5.2	Protokoll der Epon-Einbettung nach LUFT (1961)	143
9.5.3	Methylenblaufärbung nach RICHARDSON et al. (1960)	143
9.6	Stammbäume der Bartaffen-Kolonie (nach Informationen von GLEDHILL 1997)..	144

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt
AE	Alveoläre Echinokokkose
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
CE	Zystische Echinokokkose (cystic echinococcosis)
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
DBB	Differentialblutbild
DDSA	2-Dodecenylnbernsteinsäure-Anhydrid (<i>2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydrid</i>)
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMP	2,4,4-Dimethylaminomethylphenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
<i>E.</i>	<i>Echinococcus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEP	Europäisches Erhaltungszuchtprogramm
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
forw.	forward
g	Gramm
GC	Guanin, Cytosin
GU	Genetische Untersuchung
h	Stunde
ha	Hektar
Hb	Hämoglobin

H.-E.	Hämalaun-Eosin
HK	Hämatokrit
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basen (1 kb entspricht 1000 Basenpaaren eines DNA-Stranges)
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
klin.	klinisch
km	Kilometer
M (mM, µM)	molar (millimolar, mikromolar)
<i>M.</i>	<i>Macaca</i>
m	männlich / Meter
<i>Masi</i>	Bartaffen (<i>Macaca silenus</i>)
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCV	mean corpuscular volume
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNA	Methylnadic-Anhydrid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nK	negative Kontrolle
nm	Nanometer
Nu	Nukleus

OD	optische Dichte
OP	Operation
PAS	Periodic Acid Schiff
PU	Pathomorphologische Untersuchung
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCR-SSP	PCR mit sequenzspezifischen Primern
pK	positive Kontrolle
pmol	picomol
rev.	reverse
RU	Röntgenologische Untersuchung
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SABC	Streptavidin-Biotin-Complex
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SSP	Species Survival Plan
spp.	Spezies
STE	Natriumchlorid-Tris-EDTA (sodiumchlorid-tris-EDTA)
T _A	Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TB	Tuberkulin-Test
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
U	Einheiten (units)
u. a.	unter anderem
US	Ultraschalluntersuchung
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

Vergr.	Vergrößerung
w	weiblich
Wdh.	Wiederholung
Wo	Woche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Die alveoläre Echinokokkose (AE) wird durch das Larvenstadium des Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* verursacht und ist seit Jahrzehnten hinsichtlich der entsprechenden Zoonoserisiken und der Übertragungswege auf den Menschen in der Diskussion (KIMMIG u. SCHELLING 1991; ECKERT 1996, 1997, 1998; ECKERT u. DEPLAZES 1999; ECKERT et al. 2001 b).

Nach dem Auftreten spontaner Erkrankungsfälle in der Bartaffenkolonie (*Macaca silenus*) des Deutschen Primatenzentrums (BLANKENBURG et al. 2001, 2002) bot sich die Möglichkeit, grundlegende Untersuchungen zu diesem Krankheitsgeschehen in einer dem Menschen nahe stehenden Spezies durchzuführen. Dabei sollten in einem ersten Schritt die entsprechenden Veränderungen umfassend morphologisch charakterisiert werden, um diese mit den bekannten Veränderungen beim Menschen zu vergleichen. Gleichzeitig bestand bei zwei Tieren die Gelegenheit, entsprechende klinische Diagnostikverfahren bei nicht menschlichen Primaten in ihrer Aussagefähigkeit zu überprüfen.

Da mehrere Bartaffen aus den Außengehegebereichen des Deutschen Primatenzentrums von der Echinokokkose betroffen waren, stellte sich die Frage, ob Bartaffen möglicherweise eine besondere genetisch determinierte Empfänglichkeit für die Infektion mit dem Fuchsbandwurm besitzen. Da kaum Informationen zum Genom bei dieser vom Aussterben bedrohten Spezies vorliegen, sollte ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin liegen, einen Bereich des Genoms näher zu charakterisieren, der bei anderen Infektionskrankheiten in Hinblick auf Krankheitsverläufe und Empfänglichkeit involviert ist (HILL 1998). Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Schritte unternommen, den MHC bei Bartaffen zu analysieren (BLANKENBURG et al. 2003).

Die vorliegende Dissertation dient daher zwei Zielen. Zum einen sollte das Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose bei Bartaffen umfassend morphologisch und klinisch untersucht und mit dem humanen Krankheitsbild verglichen werden. Zum anderen sollte ein Beitrag zur genetischen Charakterisierung des MHC bei dieser vom Aussterben bedrohten Art geliefert

werden, um möglicherweise, davon ausgehend in weiteren Untersuchungen, Hinweise auf die unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber dieser invasiven Infektionskrankheit bei Bartaffen zu finden.



Abb. 1:

Bartaffe aus der Kolonie des Deutschen Primatenzentrums

2 Literaturübersicht

2.1 Bartaffen (*Macaca silenus*)

2.1.1 Systematik

Die Ordnung der Primaten beinhaltet die Unterordnungen der Halbaffen mit Nasenspiegel (*Strepsirrhini*) und der Herrentiere ohne Nasenspiegel (*Haplorrhini*). In Letzterer sind die Teilordnungen der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) und Altweltaffen (*Catarrhini*) zu finden (GRZIMEK 1988a; SHOSHANI et al. 1996). Bartaffen (*Macaca silenus*), auch Wanderus genannt, sind Altweltaffen. Sie gehören zur Überfamilie der geschwänzten Altweltaffen (*Cercopithecoidea*) und zur Familie der Meerkatzenverwandten (*Cercopithecidae*). Zusammen mit acht weiteren Gattungen zählt der Bartaffe (*Macaca silenus*) zur Unterfamilie der Meerkatzenartigen (*Cercopithecinae*). Zur Gattung der Makaken (*Macaca* - *M.*) gehören zahlreiche Arten, die sich aber in ihren Körpermerkmalen oft sehr unterscheiden. Am auffälligsten ist hierbei die Schwanzlänge. Während der Javaneraffe (*M. fascicularis*) einen Schwanz besitzt, der länger als sein Körper ist, besitzt zum Beispiel der Berberaffe (*M. sylvanus*) keinen oder einen stark zurückgebildeten Schwanz. Mit Ausnahme des Berberaffen, welcher im nordwestafrikanischen Atlasgebirge lebt, sind alle anderen Makakenarten im südostasiatischen Raum beheimatet. Die Makaken haben sich nach dem Menschen von allen Primaten am besten an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen angepasst (GRZIMEK 1988a). Einige Arten leben in tropischen Regenwäldern, andere in trockenen Baumsavannen oder im Gebirge. Es gibt Makaken, die weitgehend am Boden leben, wie zum Beispiel der Rhesusaffe (*M. mulatta*), der Rundgesichtsmakak (*M. cyclopis*) und der Bergrhesus oder Assammakak (*M. assamensis*). Andere leben auf Bäumen, wie zum Beispiel auch der Bartaffe (*M. silenus*) und wieder andere sind an eine schneebedeckte Landschaft gewöhnt, wie der Rotgesichtsmakak (*M. fuscata*).

2.1.2 Vorkommen und Lebensweise

Bartaffen oder Wanderus (*M. silenus*) gehören zu den am stärksten vom Aussterben bedrohten Primatenarten (GRZIMEK 1988a; KAUMANNNS et al. 2000). Sie leben in den feuchten, immergrünen tropischen Bergwäldern der Westghats im Südwesten Indiens. Sie haben von allen Makakenarten eines der kleinsten Verbreitungsgebiete und sind deshalb besonders gefährdet. Die Westghats sind eine Gebirgskette in Südindien, die über eine Strecke von 1400 km von Bombay bis zur Südspitze der indischen Halbinsel verläuft und eine Fläche von 61000 km² umfasst. Durch die starken Niederschläge während der Monsunregen kam es zur Ausbildung des tropischen immergrünen Regenwaldes, welcher sich auf ein schmales Band an der Westseite der Western Ghats in einer Höhe zwischen 460 und 1370 m beschränkt. Dieses Gebiet weist eine besonders große biologische Vielfalt auf. Viele Arten sind hier endemisch verbreitet, kommen also nur hier vor. Dazu zählen neben den Bartaffen Säugetierarten, wie die Nilgiri-Languren (*Presbytis johnii*), die Malabarzibetkatzen (*Paradoxurus jerdoni*), 16 Vogelarten und einige Reptilien- und Amphibienarten. Die immer weiter fortschreitende Besiedlung, aber auch Holzwirtschaft und Plantagenanbau, haben einen großen Einfluss auf die Einengung und Fragmentierung des Lebensraumes (KAUMANNNS et al. 2000). Bartaffen wurden früher stark wegen ihres Pelzes und auch ihres Fleisches bejagt (GRZIMEK 1988a). Dieser Faktor hat wohl neben dem begrenzten Lebensraum einen starken Einfluss auf die Populationsgröße. Die Gesamtzahl an freilebenden Bartaffen liegt heute zwischen 2000 bis 3500 Individuen (KAUMANNNS et al. 2000).

Bartaffen haben ein glänzendes schwarzes Fell und einen abstehenden silberweißen Mähnenkranz. Das Gesicht ist, außer bei Jungtieren, schwarz (GRZIMEK 1988a). Die Geschlechter sind gleich gefärbt; sie unterscheiden sich jedoch in Größe und Gewicht. Während die Männchen bis zu 13 kg wiegen können und eine Körperlänge zwischen 45 und 61 cm aufweisen, werden die Weibchen bis zu 8 kg schwer und sind zwischen 40 und 45 cm lang. Der Schwanz hat eine Länge von 24 bis 38 cm und weist am Ende ein schwarzes Haarbüschel auf.

Bartaffen sind baumbewohnende Makaken, die nur selten den Boden aufsuchen. Nur die Futtersuche bringt sie dazu, von den bis zu 30 m hohen Baumriesen auf den Boden herabzusteigen. Sie sind sehr scheu und flüchten bei der geringsten Störung wieder in die Bäume. Bartaffen sind gute Schwimmer (ROWE 1996).

Zum Nahrungsspektrum der Bartaffen zählen sowohl pflanzliche als auch tierische Nahrungsquellen. Sie fangen Insekten, kleinere Reptilien, aber auch Kleinsäuger. Weiterhin zählen Baumpilze, Vogeleier und Honigwaben zum Speiseplan. Zum pflanzlichen Nahrungsspektrum gehören mehr als 100 Pflanzenspezies. Sie fressen Feigen sowie Früchte und Blüten des *Cullenia*-Baumes (*Cullenia excelsa*). Um die Früchte dieses Baumes fressen zu können, benötigen die Tiere ein hohes Geschick, da sie sehr stachelig sind. Dieses Geschick zeigt sich auch beim Erwerb und Verzehr von tierischer Nahrung. So gehören Bartaffen zu den wenigen Primaten, bei denen im Freiland Werkzeuggebrauch nachgewiesen wurde. Zum Beispiel befreien sie Raupen vor dem Fressen mit Hilfe von Blättern und "Rubbelbewegungen" von den unangenehmen Nesselhaaren (GRZIMEK 1988a; HOHMANN 1988; KAUMANNNS et al. 2000). Es wird angenommen, dass die Streifgebiete von Bartaffen vor allem vom Nahrungsangebot bestimmt werden. Diese Streifgebiete können zwischen 100 und 500 ha groß sein (KAUMANNNS et al. 2000).

Bartaffen leben in Gruppen von 10 bis 20 Tieren. Diese Gruppen umfassen zeitweise bis zu vier erwachsene Männchen und dauerhaft mehrere erwachsene Weibchen und Kinder. Häufiger sind jedoch Gruppen mit nur einem erwachsenen Männchen. Die Männchen haben eine mobilere Stellung in der Gruppe und gelten als eine Art "Wächter". Hierbei verfolgen sie die Aktivitäten von anderen Gruppen, beschützen ihre Weibchen und führen ihre Gruppe, wenn nötig, weg. Ein für Bartaffenmännchen typisches Verhaltensmerkmal ist der laute Ruf, den das führende Männchen erschallen lässt. Dieses Merkmal unterscheidet den Bartaffen von den anderen Makaken. Der Ruf wird zum Beispiel ausgestoßen, wenn sich die Gruppe in Bewegung setzt oder dient dazu, anderen Gruppen die Anwesenheit der eigenen Gruppe anzuzeigen (GRZIMEK 1988a; ROWE 1996). Weibchen gelten als die "Stabilisatoren" einer Gruppe. Sie halten die Gruppe durch enge soziale Beziehungen untereinander zusammen (matriarchalische Struktur). Konkurrenz zwischen den Weibchen entsteht, wenn mehrere

Weibchen brünstig sind, denn dann sucht jedes den Zugang zu den wenigen Männchen (KAUMANNNS et al. 2000).

Die Streifgebiete der Bartaffengruppen können sich überschneiden. Gruppenbegegnungen können aggressiv, freundlich oder neutral ablaufen. Das tägliche Zusammenleben verläuft normalerweise spannungsarm mit wenigen Kontakten zwischen den Tieren. In einer Mehrmännchengruppe hält sich ein Männchen meist in der Nähe der Weibchen auf, während die anderen eine eher randständige Position, sowohl auf räumlicher, als auch auf sozialer Ebene, einnehmen. Sie beobachten hauptsächlich die Aktivitäten anderer Gruppen, wodurch sie sich oft auch außer Sichtweite der Weibchen aufhalten. Erst wenn die Weibchen brünstig werden, verringert sich diese Distanz und Interaktionen werden häufiger. Hierbei können die Männchen den Weibchen stunden- bis tagelang folgen. Die Brunst der Weibchen ist gekennzeichnet durch eine Genitalschwellung sowie durch den „Kopulationsruf“ der Weibchen. Die Genitalschwellung dehnt sich breit und hoch aus und umwächst auch die Schwanzwurzel nierenförmig. Bartaffen sind die einzigen Makaken mit Kopulationsrufen bei Männchen und Weibchen (ROWE 1996). In der Regel führen bei Bartaffen nur wenige Kopulationsakte direkt zur Ejakulation, jedoch steigt die Zahl der Kopulationsakte mit Ejakulation, wenn die Weibchen den höchsten Genitalschwellungsgrad erreicht haben (KAUMANNNS et al. 2000).

Neugeborene Bartaffen wiegen zwischen 350g und 750g. Die Tragzeit beträgt ca. 162-186 Tage, und normalerweise kommt pro Geburt nur ein Jungtier zur Welt. Die Mütter tragen das Kind während der ersten Lebenswochen ausschließlich unter dem Bauch. Mit frühestens acht Wochen reiten sie auch gelegentlich auf deren Rücken. In einem Alter von 6-12 Monaten werden die Jungtiere entwöhnt und erlangen die Geschlechtsreife mit 2,5-4 Jahren. Die Abstände zwischen den Geburten eines Weibchens liegen durchschnittlich bei 2,8 Jahren, wobei freilebende Weibchen ihr erstes Kind frühestens mit sechs Jahren gebären. Dies lässt nur eine Produktion von wenigen Kindern pro Lebenszeit zu, weshalb eine Verminderung der Population durch Jagd, Holzeinschlag und Plantagenwirtschaft nicht kurzfristig ausgeglichen werden kann (KAUMANNNS et al. 1998; KAUMANNNS et al. 2000). Bartaffen können in der Wildnis bis zu 20 Jahre alt werden.

2.1.3 Haltung in der Obhut des Menschen

Da Bartaffen zu den am stärksten bedrohten Primatenarten gehören, stellen die in Obhut des Menschen gehaltenen Vertreter dieser Art eine wichtige Genreserve dar, dienen aber auch als Modell für naturschutzrelevante Forschung (KAUMANNNS et al. 1998; KAUMANNNS et al. 2000; KAUMANNNS et al. 2001).

Seit dem 20. Jahrhundert wurden weltweit ca. 1500 Bartaffen gehalten, wobei es sich bis in die fünfziger Jahre fast ausschließlich um Wildfänge handelte. Die Zucht war meist wenig erfolgreich. Erst ab 1960 gelang die Zucht besser, und es entstammten mehr Bartaffen aus der Zucht durch Menschenhand. Zwar hat sich die Zahl der erfolgreich aufgezogenen Bartaffen seitdem stark vergrößert, sie ist jedoch immer noch unbefriedigend. Hohe Kindersterblichkeit sowie ein Rückgang der Produktivität sind hierfür die Ursachen (KAUMANNNS et al. 2000; KAUMANNNS et al. 2001). Zoos spielen eine wichtige Rolle beim Schutz der Bartaffen in ihrem natürlichen Lebensraum und auch außerhalb davon. Von amerikanischen Zoos wurden die ersten internationalen „Bartaffenkonferenzen“ organisiert. Sie erarbeiteten auch ein internationales Zuchtbuch und gründeten 1985 den „Species Survival Plan“ (SSP) für speziell in den USA und Kanada gehaltene Bartaffen. Im internationalen Zuchtbuch waren 1997 575 Bartaffen verzeichnet; hiervon 277 Männchen, 262 Weibchen und 36 Tiere mit unbestimmtem Geschlecht (GLEDHILL 1997). Diese Tiere wurden überwiegend in Zoos gehalten, das heißt von 105 Institutionen waren 103 Zoologische Gärten. Die einzelnen Gruppen der in Menschenobhut gehaltenen Bartaffen umfassen durchschnittlich sechs Tiere (KAUMANNNS et al. 2000). Einzelne Einrichtungen haben auch Gruppen mit mehr als zehn Individuen. Die amerikanische Bartaffenpopulation umfasste 1997 240 Tiere, die europäische zählte, soweit zu ermitteln, 1994 147 Individuen in 25 Einrichtungen (WILDE et al. 1994). Die restlichen Bartaffen verteilten sich auf indische, japanische, chinesische und australische Zoos.

1989 gründeten auch europäische Zoos ein dem SSP entsprechendes Programm für die in Europa gehaltenen Bartaffen. Das Europäische Erhaltungszuchtprogramm (EEP) dient allgemein dazu, die Zucht von den vom Aussterben bedrohten Tierarten grenzüberschreitend

in vielen europäischen Zoos zu koordinieren, um eine angemessen große Zuchtpopulation zu erhalten. Die EEPs wurden 1985 zum ersten Mal begründet. Zunächst waren es nur 17 EEPs, darunter zum Beispiel der kleine Panda und der Europäische Fischotter. Inzwischen gibt es schon über 60, darunter auch der Bartaffe. Als 1989 das EEP für Bartaffen gegründet wurde, nahmen 12 Institutionen daran teil. Zehn Jahre später hatte sich die Zahl schon auf 33 erhöht. Die Bartaffenpopulation des EEP vergrößerte sich zwischen 1989 und 1998 von 90 auf ca. 200 Individuen. Dieser Anstieg ist nicht allein darauf zurückzuführen, dass neue Tiere in die Population geboren wurden; dieser Teil macht 70 % des Zuwachses aus. Die restlichen 30 % sind mit der Integration neuer Kolonien in das EEP zu erklären. Wirft man jedoch einen genaueren Blick auf die Demographie der Population, fällt sehr schnell auf, dass sich die Alterskomposition in Richtung Adulte verschiebt, das heißt es gibt immer mehr Tiere, die älter als 15 Jahre sind. Ein weiteres Problem in der Zuchtpopulation ist, wie schon oben erwähnt, die niedrige Geburtenrate und die hohe Kindersterblichkeit. Während sich in der "Gründergeneration" von 21 Weibchen 16 (76 %) fortpflanzten und hierbei 106 Kinder geboren wurden, von denen 80 (75 %) überlebten, waren es in der F₁-Generation nur noch 20 (66 %) von 30 Weibchen, die sich fortpflanzten und hierbei 66 Kinder gebaren, von denen nur 34 (51 %) überlebten. Das bedeutet, dass sich die Zahl der überlebenden Kinder pro reproduzierendem Weibchen von 5,0 in der Gründergeneration auf 1,7 in der F₁-Generation verringert hat. Bezogen auf alle Weibchen der Population kommt man hier auf 3,8 überlebende Kinder pro Weibchen in der Gründergeneration und auf 1,1 überlebende Kinder pro Weibchen in der F₁-Generation. Dies zeigt einen Abfall der Produktivität um 71 % (von der Gründergeneration zur F₁-Generation) (KAUMANN et al. 2001).

Gründe für die hohe Kindersterblichkeit sind nicht bekannt. Für den Rückgang der Produktivität wird vermutet, dass ein Mangel an sozialen Stimulationen, wie sie die Bartaffen normalerweise in freier Wildbahn täglich haben, eine Ursache hierfür sein könnten. Schließlich lassen Verhaltensstörungen wie Salutierverhalten oder Haare ausrupfen auf Mängel in den Haltungsbedingungen schließen. So fehlen zum Beispiel Gruppenbegegnungen, die bei freilebenden Bartaffengruppen selbstverständlich sind. Außerdem weicht die Gruppenzusammensetzung in Bezug auf Alter und Geschlecht sowie das Beziehungsnetz bezüglich langzeitlicher sozialer Veränderungen in der EEP-Population

von der freilebenden Population ab. Bartaffengruppen in Menschenhand haben somit einen starren Charakter im Vergleich zu der sozialen Dynamik einer freilebenden Gruppe. Dies könnte die Aktivierung des Fortpflanzungssystems behindern. Nach CARLSTEAD und SHEPHERDSON (1994) beeinflusst in Primatengruppen ein optimales Stressniveau und ein gewisses Maß an allgemeiner Spannung die sozialen Interaktionen und dadurch indirekt den Fortpflanzungserfolg. KAUMANN et al. (1998) untersuchten den Einfluss experimenteller Gruppenbegegnungen als Mittel zur sozialen Stimulans bei in Menschenhand gehaltenen Bartaffen. Während der Gruppenbegegnungen kam es zu einem Anstieg der Häufigkeiten in den protokollierten Verhaltensweisen. Hierzu zählten Aggression, Drohen, Mimen, Präsentieren, Besteigen und soziopositives Verhalten (Schmatzen, Grimassieren). Der räumliche Zusammenhalt der Gruppen wurde enger. Die Autoren folgern aus ihren Untersuchungen, dass Gruppenbegegnungen bei Bartaffen in Menschenhand ein gutes Mittel zur sozialen Stimulans und zur Verbesserung der Haltungsbedingungen sein können. Dies erfordert aber unter Zoobedingungen einigen technischen Aufwand und geräumige Gehege. Die dargestellte Problematik, die sich in Bartaffenpopulationen in Menschenhand ergibt, zwingt jedoch gerade dazu, die Haltungsbedingungen entsprechend zu verändern. Dies erfordert eine gut koordinierte Zusammenarbeit zwischen allen am EEP teilnehmenden Institutionen.

2.2 Alveoläre Echinokokkose

2.2.1 Ätiologie

Die alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine zoonotische Infektionskrankheit, die durch das zweite Larvenstadium (Metazestode) des Fuchsbandwurmes *Echinococcus (E.) multilocularis* verursacht wird. Die Krankheit an sich tritt somit bei Zwischenwirten auf. Das Genus *E. multilocularis* gehört zur Familie der *Taeniidae* und zur Klasse der *Cestodea*, in der auch die Genera *E. granulosus*, *E. oligarthrus* und *E. vogeli* zu finden sind. Die einzelnen Erreger unterscheiden sich in ihren Zwischen- und Endwirten (THOMPSON u. MCMANUS 2001). Der adulte Fuchsbandwurm ist zwischen 1,2-4,5 mm lang. Der Körper gliedert sich in Skolex,

Halszone (Proliferationszone) und Hinterkörper. Der Hinterkörper besteht aus zwei bis sechs Proglottiden. Ein Darm ist nicht vorhanden, und die Nahrungsaufnahme des Parasiten erfolgt durch das Integument. Die Verankerung des Fuchsbandwurmes an der Darmschleimhaut des Endwirtes erfolgt mit Hilfe des Skolex, der bei *E. multilocularis* rund und mit vier Saugnäpfen und einem doppelten Hakenkranz ausgestattet ist. Die Skolexhaken sind ein geeignetes Merkmal für die diagnostische Unterscheidung der Bandwürmer. In der Halszone entstehen durch Zellproliferation und oberflächliche Einschnürung die Proglottiden. Die letzten Proglottiden enthalten den Uterus, der mit Eiern angefüllt ist. Bereits im Uterus des Parasiten entsteht eine mit sechs Häkchen versehene Larve, die Onkosphäre. Diese Proglottiden lösen sich vom Parasiten, gelangen mit dem Kot des Endwirtes nach außen und enthalten somit schon das erste Larvenstadium (MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; THOMPSON u. MCMANUS 2001).

Der Fuchsbandwurm zeigt einen Lebenszyklus mit Carnivoren als Endwirt und typischerweise Nagern als Zwischenwirt (Abb. 2). Die Eier, die mit dem Kot des Endwirtes nach außen gelangen, werden während der Nahrungsaufnahme vom Zwischenwirt aufgenommen. Gelegentlich können diese Eier aber auch von Menschen und anderen Fehlwirten aufgenommen werden. Fehlwirte haben jedoch im Entwicklungszyklus des Parasiten keine Bedeutung, da sie eine Sackgasse für ihn darstellen (siehe Kapitel 2.2.2) (THOMPSON u. MCMANUS 2001). Im Darm des Zwischenwirtes schlüpft die Onkosphäre, penetriert die Darmwand und gelangt so über die Blutbahn in verschiedene Organe, typischerweise aber in die Leber. Hier entwickelt sich nun aus der Onkosphäre das zweite Larvenstadium, auch Finne oder Metazestode genannt (ECKERT 1998; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; THOMPSON u. MCMANUS 2001). Dieses Finnenstadium besteht aus einer Anhäufung von Finnenbläschen, die sowohl makroskopisch erkennbar als auch mikroskopisch klein sein können. Sie sind aus einer äußeren Laminarschicht und einer inneren Keimschicht (germinative Schicht) aufgebaut (DUJARDIN 1993; ECKERT 1998; ROMMEL et al. 2000). Die Metazestoden haben ein vielkammeriges (multilokuläres) Aussehen. Entgegen der früheren Meinung handelt es sich nach MEHLHORN und PIEKARSKI (1998) um ein Netzwerk von Schläuchen, die das Organ durchziehen. Die Finnen von *E. multilocularis* haben, im Gegensatz zu denen von *E.*

granulosus, ein tumorartiges Wachstum. Sie wuchern durch sprossungsartige Vorgänge an den Enden der Schläuche infiltrativ in das umliegende Gewebe und können auch Metastasen in anderen Organen bilden. Die Schlauchenden haben oft nur einen Durchmesser von 5-10 µm und werden bei Operationen daher häufig übersehen. Innerhalb der Schläuche entwickeln sich aus den undifferenzierten Zellen der Keimschicht zunächst Brutkapseln und später Protoskolizes. Diese Protoskolizes sind die Kopfanlagen (Skolex) der adulten Parasiten und für den späteren Endwirt infektiös. Die Protoskolizes durchlaufen laut LEDUCQ und GABRION (1992) verschiedene Entwicklungsstadien, in denen sie ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen durchmachen. Durch den Verzehr eines infizierten Zwischenwirtes gelangt das Metazestodengewebe in den Magen-Darm-Trakt des Endwirtes. Hier entwickelt sich der adulte Fuchsbandwurm, der bevorzugt das Jejunum und das proximale Ileum besiedelt, bei starkem Befall aber auch den gesamten Dünndarm. Der Zyklus ist nun geschlossen (DUJARDIN 1993; ECKERT 1998; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; THOMPSON u. MCMANUS 2001).

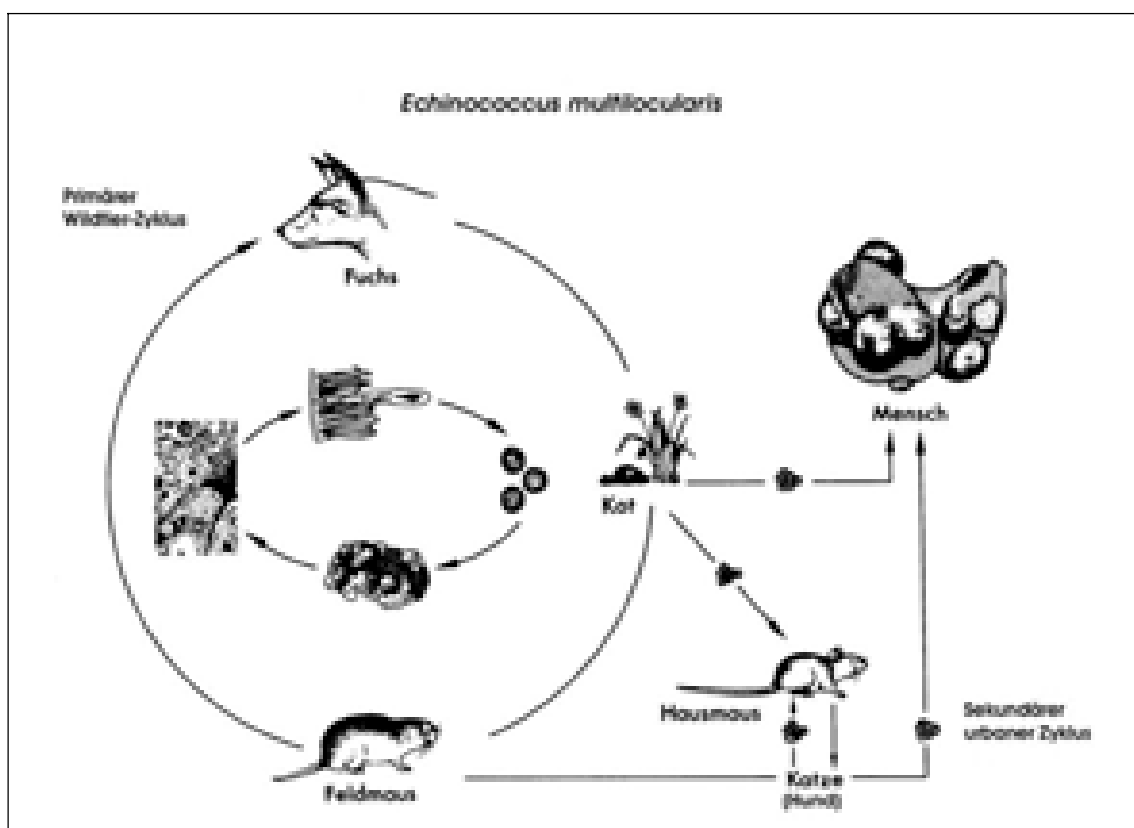


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *Echinococcus multilocularis* (nach BÄHR 1981)

2.2.2 Epidemiologie

Bei *E. multilocularis* unterscheidet man einen silvatischen und einen synanthropen Lebenszyklus (Abb. 3). Beim silvatischen Zyklus ist der Endwirt der für den Parasiten namensgebende Fuchs der Genera *Vulpes* und *Alopex*. Typische Zwischenwirte sind Angehörige aus insgesamt acht Familien. Als epidemiologisch bedeutsame Zwischenwirte gelten aber vor allem Vertreter aus den Familien *Cricetidae* (z. B. Feldmaus, Bisam, Hamster) und *Muridae* (Hausmaus) (ECKERT 1996; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; ECKERT et al. 2001c). Im sogenannten synanthropen Zyklus (Intermediärzyklus) sind dagegen Katzen (*Felis catus*) und Hunde (*Canis lupus familiaris*) als Endwirte beteiligt, wobei die Katze weniger empfänglich für *E. multilocularis* ist (KIMMIG u. SCHELLING 1991; AMMANN u. ECKERT 1996; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; DEPLAZES u. ECKERT 2001; ECKERT et al. 2001 c).

Der silvatische Zyklus scheint die hauptsächliche Ursache der Infektionen für Menschen und andere Fehlwirte in den meisten endemischen Regionen zu sein (ECKERT et al. 2001 c). So ist der Rotfuchs der vorherrschende Endwirt in West- und Zentraleuropa, andere Carnivoren sowie Hunde und Katzen sind weniger infiziert. Füchse müssen somit als die Hauptverteiler der Eier von *E. multilocularis* angesehen werden (ECKERT 1996; ECKERT u. DEPLAZES 1999; ECKERT et al. 2001 c).

Im synanthropen Zyklus haben Hunde als Endwirt meist viele Möglichkeiten, um in Kontakt mit infizierten Zwischenwirten zu kommen und stellen deshalb eine Infektionsquelle für den Menschen dar. In St. Lawrence Island waren z. B. 1951 12 % der Hunde in einem Dorf mit *E. multilocularis* infiziert. In einer Studie zwischen 1980 und 1982 waren hier 22-35 % der gefangenen Mäuse infiziert (SCHANTZ et al. 1995). In solchen Gegenden kommt es zu einer hohen Durchseuchung der Umwelt mit den Eiern von *E. multilocularis*. Die Eier sind sehr resistent gegenüber niedrigen Temperaturen (ECKERT et al. 2001 c) und können den gesamten Winter infektiös bleiben. Von einer starken Prävalenz von *E. multilocularis* in Hunden wurde auch in China und der Schweiz berichtet (CRAIG et al. 1992; GOTTSTEIN 2000).

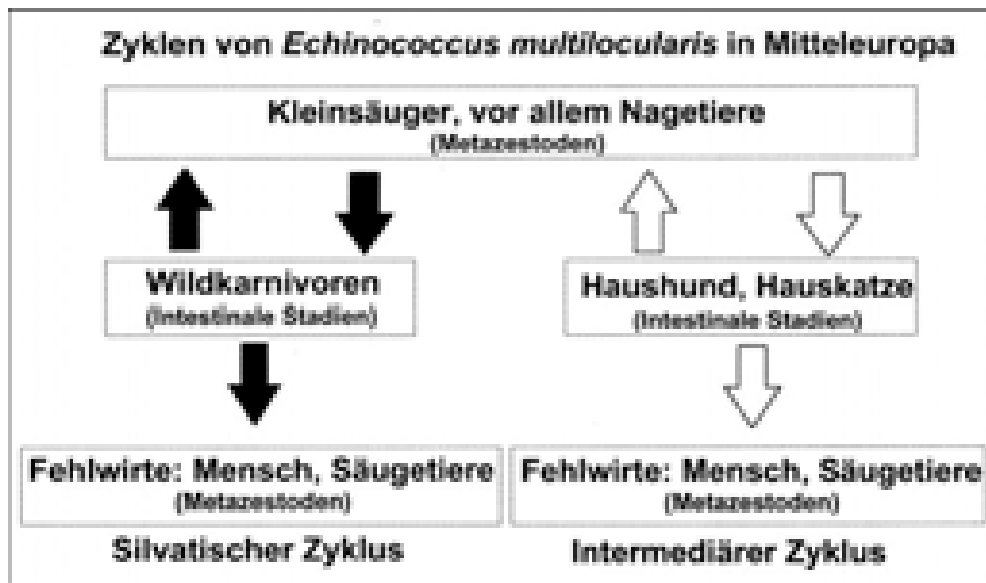


Abb. 3: Zyklen von *Echinococcus multilocularis* in Mitteleuropa. Dunkle Pfeile: Hauptwege der Übertragung (aus: Veterinärmedizinische Parasitologie, ROMMEL et al. 2000).

Geographische Verbreitung:

Die geographische Verbreitung von *E. multilocularis* ist abhängig vom Vorhandensein seiner natürlichen End- und Zwischenwirte. Besonders die nördliche Hemisphäre ist betroffen, mit endemischen Gebieten in Zentraleuropa, großen Teilen von Nord- und Zentrurasien und Teilen von Nordamerika (ECKERT et al. 2001 d).

Endwirte:

Der **Polarfuchs** (*Alopex lagopus*) bewohnt die eurasische und nordamerikanische Tundrazone. In vielen Gegenden zählen hauptsächlich Nager zu seinen Beutetieren (besonders die Sumpfmaus - *Microtus oeconomus*, und Lemminge - *Lemmus* spp., *Dicrostonyx* spp.). Polarfüchse sind bekannt für die langen Strecken, die sie über das Eis zurücklegen können; diese erreichen manchmal sogar Tausende von Kilometern. Die Füchse

betreten normalerweise keine Dörfer, doch könnten sie z. B. durch Abfall angelockt werden (ECKERT et al. 2001 c). Der **Rotfuchs** (*Vulpes vulpes*) hat eine weite geographische Verbreitung in der nördlichen Hemisphäre. Hierzu zählen auch Teile von Nordamerika, Eurasien und Nordafrika. Im Norden überschneiden sich die Verteilungsgebiete von Rot- und Polarfuchs und im Süden wurde der Rotfuchs auch nach Australien eingeführt (GRZIMEK 1987; ECKERT et al. 2001 c).

Rotfüchse haben ein breites Nahrungsspektrum (Kleinsäuger, Insekten, Würmer, Pflanzen), welches es ihnen ermöglicht, in einer großen Anzahl von Habitaten zu überleben und eine hohe Populationsdichte zu erreichen. Rotfüchse legen Entfernungen von 10-50 km innerhalb ihres Territoriums zurück (ECKERT et al. 2001 c). In bestimmten Regionen können auch noch andere Carnivoren in den Zyklus von *E. multilocularis* einbezogen sein. So zum Beispiel der **Steppenfuchs** (nach GRZIMEK 1987: *Alopex corsac*, nach ECKERT et al. 2001 c: *Vulpes corsac*), der **Kojote** (*Canis latrans*), der **Wolf** (*Canis lupus*), der **Marderhund** (*Nyctereutes procyonoides*) und die **Wildkatze** (*Felis silvestris*).

Auch **Hunde** (*Canis lupus familiaris*) und **Katzen** (*Felis catus*) können als Endwirte auftreten. Sie infizieren sich durch die Aufnahme von Nagern, welche die Metazestoden beherbergen. Die Bedeutung von Hunden und Katzen als Infektionsquellen, besonders in Bezug auf den Menschen, ist abhängig von der lokalen Endemiesituation. In hoch endemischen Gebieten (wie z. B. St. Lawrence Island, Alaska) sind Hunde die Hauptinfektionsquelle für Menschen (ECKERT et al. 2001 c). In endemischen Gebieten mit einem funktionierenden silvatischen Zyklus ist das Vorkommen von *E. multilocularis* in Hunden und Katzen normalerweise niedrig.

Zwischenwirte:

Die Rolle der Verteilung der Zwischenwirte in Bezug auf die Übertragungsdynamik von *E. multilocularis* ist noch nicht genau geklärt. Dies hat mit vielen variablen Faktoren wie den unterschiedlichen Habitaten und der Populationsdynamik, unterschiedlichem Verhalten sowie

unterschiedlicher saisonaler Verbreitung der Zwischenwirte zu tun. Außerdem können in endemischen Regionen mehrere Zwischenwirtspezies in Frage kommen, die wiederum auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber *E. multilocularis* besitzen. Weiterhin können Endwirte Vorlieben für bestimmte Zwischenwirte als Nahrungsquelle haben. Zu den bedeutungsvollsten Zwischenwirten in Westalaska zählt zum Beispiel die **Sumpfmaus** (*Microtus oeconomus*). Daneben werden zwar auch Infektionen bei der **Polarrötelmaus** (*Clethrionomys rutilus*) festgestellt, aber diese Art hat eine eher geringe Signifikanz für den Zyklus des Parasiten. In Nordalaska scheint der **braune Lemming** (nach GRZIMEK 1988b: *Lemmus trimucronatus*; nach SCHANTZ et al. 1995: *Lemmus sibiricus*) die größte Rolle in der Übertragung zu spielen. In Nordamerika sind es **Hirschmaus** (*Peromyscus maniculatus*) und **Wiesenmaus** (*Microtus pennsylvanicus*), die vorherrschen. Jedoch gibt es auch hier Infektionen bei anderen Nagern. In West- und Zentraleuropa wurde bei sieben Nagerspezies eine Infektion nachgewiesen, am wichtigsten sind jedoch die **Feldmaus** (*Microtus arvalis*), die **Schermaus** (*Arvicola terrestris*), die **Hausmaus** (*Mus musculus*) und die **Bisamratte** (*Ondrata zibethicus*). Die Schermaus scheint jedoch kein optimaler Zwischenwirt zu sein, da sich hier meist keine Protoskolizes ausbilden. (SCHANTZ et al. 1995; ECKERT 1996; SCHMITT et al. 1997; ECKERT et al. 2001 c).

Seit 1989 wurde *E. multilocularis* in immer mehr europäischen Ländern nachgewiesen. Die Verbreitung in **Europa** betraf 1999/2000 schon 12 Länder: Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Lichtenstein, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Polen, Schweiz, Slowakische Republik und die Tschechische Republik (ECKERT 1997; ECKERT u. DEPLAZES 1999; KOLAROVA 1999; ROMIG et al. 1999 a; ROMIG et al. 1999 b; ECKERT et al. 2001 d). Das Vorkommen von *E. multilocularis* in Rotfüchsen in den zentraleuropäischen Gebieten variiert nach ECKERT et al. (2001 d) von weniger als 1 % bis über 60 %. In Deutschland ist außer in Hamburg, Bremen, Berlin und Sachsen in allen Bundesländern von infizierten Füchsen berichtet worden (BALLEK et al. 1992; ENGE 1996; KIUPEL 1996; NEBEL 1996; ROMIG et al. 1999 a; ROMIG et al. 1999 b; ECKERT et al. 2001 d). Das Vorkommen von *E. multilocularis* in Rotfüchsen in Niedersachsen liegt bei bis zu 50 % (ECKERT 1997; ROMIG et al. 1999 b). In Baden-Württemberg wurde sogar eine Prävalenz von 75 % in 53 Füchsen festgestellt (ROMIG et al. 1999 a; ROMIG et al. 1999 c; ECKERT et al. 2001 d). Hunde

(*Canis familiaris*) und Katzen (*Felis catus*) sind weniger häufig infiziert als Füchse. In drei Studien wurden zwischen 1988 und 1998 278 Katzen aus dem stark endemischen Gebiet Baden-Württemberg untersucht. Hiervon waren nur drei Tiere (1,1 %) infiziert (ECKERT et al. 2001 d).

In **Nordamerika** sind besonders die Tundrazone von Alaska (USA), Kanada und weiter südlich die Nordzentralregion (Kanada: Alberta, Saskatchewan, Manitoba; USA: 13 benachbarte Bundesstaaten) betroffen. Die einzige endemische Region in **Japan**, von der berichtet wird, ist Hokkaido. Zwischen 1989 und 1996 wurden infizierte Rotfüchse in Ost-, West- und Zentralhokkaido gefunden. Es wird angenommen, dass *E. multilocularis* Japan durch die Einfuhr von Rotfüchsen nach Rebun Island erreicht hat. Berichtet wird auch von Fällen in der **Türkei**, im **Iran**, in **Russland** und **China** (SCHANTZ et al. 1995; ECKERT et al. 2001 d).

Im Grunde sind alle Säugetiere, einschließlich des Menschen, in denen sich Metazestoden nach der Infektion mit den Eiern von *E. multilocularis* entwickeln können, als Zwischenwirte zu betrachten. Aus epidemiologischer Sicht ist es jedoch angebracht, zwischen wirklichen Zwischenwirten, die eine wichtige Rolle im Verlauf des Lebenszyklus des Parasiten spielen, und Fehlwirten, die eine "Sackgasse" für den Parasiten darstellen, zu unterscheiden. Sackgasse ist deshalb der entsprechende Ausdruck, weil es zwar zum einen zur Ausbildung der Metazestode kommt, diese jedoch keine Protoskolyzes ausbildet (sterile Zysten), und zum anderen diese Fehlwirte (z. B. Mensch) normalerweise nicht zum Nahrungsspektrum eines Endwirtes gehören (THOMPSON u. MCMANUS 2001). Der Lebenszyklus des Parasiten ist somit unterbrochen. Zu den sogenannten Fehlwirten zählen zum Beispiel der Mensch (*Homo sapiens*) und nichtmenschliche Primaten (*Gorilla*, *Macaca* spp., *Lemur* spp.), Haus- und Wildschweine (*Sus scrofa domesticus*, *Sus scrofa*) aber auch Hunde (*Canis lupus familiaris*) und Nutrias (*Myocastor coypus*) (ECKERT et al. 2001 a). Hunde können sowohl Endwirt als auch Fehlwirt sein (ECKERT 1996; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ROMMEL et al. 2000; ECKERT et al. 2001 a; SCHUSTER et al. 2001; MÄTZ-RENSING et al. 2002). Sie können sogar gleichzeitig mit intestinalen Stadien im Darm (Endwirt) und Metazestoden in der Leber (Fehlwirt) befallen sein (ROMMEL et al. 2000; DEPLAZES u. ECKERT 2001).

2.2.3 Klinik und Pathogenese

Die Infektion mit dem Metazestoden-Stadium von *E. multilocularis* betrifft ein breites Spektrum an natürlichen Zwischenwirten und Fehlwirten. Letztere spielen jedoch keine Rolle in der Übertragung und damit im Lebenszyklus des Parasiten. Dies schließt Mensch und andere Säugetiere mit ein (siehe Kap. 2.2.2). Die Infektion von Zwischen- bzw. Fehlwirten mit *E. multilocularis* kann eine ernsthafte und tödliche Erkrankung, die alveoläre Echinokokkose (AE), verursachen. Diese Erkrankung hat sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine große Bedeutung. Neben Nagern und anderen Kleinsäugetern verschiedener Familien wird auch von Menschen, Affen und anderen Säugetieren berichtet, bei denen eine AE nachgewiesen wurde (BÄHR 1981; AYDIN et al. 1986; WORBES et al. 1989; GEISEL et al. 1990; PFISTER et al. 1993; RIETSCHEL u. KIMMIG 1994; BRACK et al. 1997; SCHMITT et al. 1997; SYDLER et al. 1998; BLANKENBURG et al. 2001; ECKERT et al. 2001 a; PAWLOWSKI et al. 2001; BLANKENBURG et al. 2002; REHMANN et al. 2003).

Die AE ist charakterisiert durch ein tumorartiges, infiltratives Wachstum der Metazestoden. Nach oraler Infektion gelangen die Eier von *E. multilocularis* in den Magen-Darm-Trakt des Zwischen- bzw. Fehlwirtes. Hier schlüpfen die Onkosphären und penetrieren die Darmwand. So gelangen sie über die Blutbahn in verschiedene Organe. In der Regel ist zunächst die Leber betroffen, aber auch Lunge, Lymphknoten und Gehirn können besiedelt werden. In den befallenen Organen bildet sich nun die Metazestode, eine Art "Schlauchsystem", welche das Organ durchzieht (AMMANN u. ECKERT 1996; KONDO et al. 1996; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ECKERT et al. 2001 b). Ausschließlich extrahepatisch vorkommende Metazestoden ohne Beteiligung der Leber sind sehr selten (AYDIN et al. 1986; ECKERT et al. 2001 b). Das Wachstum erfolgt an den soliden Enden der Schläuche, die im Durchmesser oft nur 5-10 µm erreichen. Die undifferenzierten Zellen der Keimschicht teilen sich ständig und verschmelzen mit dem Tegument. Dadurch kommt es zu einer ständigen Vergrößerung der Oberfläche und zu einem infiltrativen Wachstum. Werden diese undifferenzierten Zellen freigesetzt, kann es zur Ausbildung von Metastasen in anderen Organen oder Körperhöhlen kommen (MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998; ECKERT et al. 2001 b).

Die Symptome der AE sind abhängig vom Stadium der Erkrankung und von der Art des befallenen Organs. Im Anfangsstadium ist die alveoläre Echinokokkose in der Regel symptomlos. Mit fortschreitender Größe des Metazestodengewebes ergeben sich dann je nach befallenen Organ spezifische Symptome. Die Inkubationszeit und damit die Wachstumsgeschwindigkeit des larvalen Zestodengewebes lässt sich bei den meisten Fehl- und Zwischenwirten schlecht feststellen, da der Infektionszeitpunkt meist nicht bekannt ist. Jedoch scheint es, als sei die Inkubationszeit der durchschnittlichen Lebenserwartung des betroffenen Fehl- oder Zwischenwirtes angepasst. Beim Menschen nimmt man an, dass die Zeit zwischen Infektion und Auftreten erster Symptome ca. 10 Jahre dauert. Bei natürlichen Zwischenwirten ist die Wachstumsrate der Metazestoden viel größer und damit anscheinend an die vergleichsweise kurze Lebensdauer dieser Tiere angepasst (BÄHR 1981; AMMANN u. ECKERT 1995; ECKERT et al. 2001 a; PAWLOWSKI et al. 2001).

AE bei natürlichen Zwischenwirten:

Typisch für die Infektion von natürlichen Zwischenwirten ist, dass es hier hauptsächlich zur Ausbildung von fertilen Zysten kommt. Das heißt, es werden in der Regel Protoskolizes in den Zysten nachgewiesen. Damit ist der Lebenszyklus des Parasiten gesichert, da sich nach Aufnahme dieser Zysten durch den Endwirt die adulten Fuchsbandwürmer entwickeln können. Metazestoden wurden in einer großen Anzahl Nagerspezies und anderen Kleinsäugetern nachgewiesen. Hierzu zählen zum Beispiel Angehörige der Familien *Muridae* (echte Mäuse), *Cricetidae* (Wühler), *Arvicolidae* (Wühlmäuse; nach GRZIMEK 1988b gehören die Wühlmäuse jedoch als Unterfamilie - *Arvicolinae* zur Familie der Wühler), *Dipodidae* (Springmäuse), *Sciuridae* (Hörnchen), *Ochotonidae* (Pfeifhasen/Pikas), *Soricidae* (Spitzmäuse) und *Talpidae* (Maulwürfe) (SCHANTZ et al. 1995; ECKERT et al. 2001 a; THOMPSON u. MCMANUS 2001). Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer epidemiologischen Signifikanz aufgrund ihrer unterschiedlichen Verbreitung (siehe auch Kapitel 2.2.2.) und ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion. So wurden nicht bei allen diesen Zwischenwirten Protoskolizes nachgewiesen (SCHANTZ et al. 1995; ECKERT et al. 2001 c).

Bei den natürlichen Zwischenwirten scheint die Inkubationszeit der kürzeren Lebensdauer dieser Tierarten angepasst zu sein. Hier schreitet die Erkrankung viel schneller voran als zum Beispiel beim Menschen. Nach schon 2-3 Monaten post infectionem kann es zur Ausbildung von Protoskolizes kommen, und schon nach fünf Monaten kann der Tod eintreten. Zu den klinischen Symptomen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zählen vor allem eine Vergrößerung des Abdomens, eine Zunahme des totalen Körpergewichts und ein Verlust an totaler Körpermasse. Außerdem werden Schwäche, Apathie, Anorexie, Aszites und eine intensive zelluläre Infiltration mit Metazestoden-Material in Leber, Peritonealhöhle, anderen Organen der Bauchhöhle und selten auch der Lungen festgestellt. Darauf folgt meist der Tod. (ECKERT et al. 2001 a).

AE bei Fehlwirten:

Metazestodenzysten sind beim Fehlwirt hauptsächlich steril. Es werden oft keine oder nur sehr wenige Protoskolizes ausgebildet. Dies bedeutet für den Parasiten somit eine Sackgasse, weil der Entwicklungszyklus unterbrochen ist und es nicht zur Entwicklung des adulten Parasiten im Endwirt kommen kann. Dies macht jedoch keinen Unterschied für den Krankheitsverlauf im Fehlwirt, denn es kommt, wie beim natürlichen Zwischenwirt, zur Bildung von Finnenbläschen, die infiltrativ in das betroffene Organ einwachsen. Der Unterschied besteht nur im Fehlen der Protoskolizes in diesen Bläschen und hat somit nur für den Parasiten Konsequenzen (ECKERT et al. 2001 a).

Berichtet wurde von Metazestoden in verschiedenen Säugetierspezies. Eine AE wurde beim Haushund (*Canis lupus familiaris*) (GEISEL et al. 1990; HALLER et al. 1998; SCHUSTER et al. 2001; MÄTZ-RENSING et al. 2002), Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) (SYDLER et al. 1998), Wildschwein (*Sus scrofa*) (PFISTER et al. 1993), Pferd (*Equus caballus*) (MIYAUCHI et al. 1984), Nutria (*Myocastor coypus*) (WORBES et al. 1989), Mensch (*Homo sapiens*) (BÄHR 1981; AYDIN et al. 1986; PAMIR et al. 1991; THOMPSON u. LYMBERG 1995; AMMANN u. ECKERT 1996; ECKERT 1996; PAWLOWSKI et al. 2001) und verschiedenen nichtmenschlichen Primaten der Genera *Gorilla* (KONDO et al. 1996;

REHMANN et al. 2003), *Macaca* (RIETSCHER u. KIMMIG 1994; BRACK et al. 1997; BLANKENBURG et al. 2001, 2002), *Lemur* (KONDO et al. 1996) und *Pongo* (ECKERT et al. 2001 a) nachgewiesen.

Untersuchungen haben ergeben, dass die Entwicklung der Metazestoden in **Pferden**, **Haus-** und **Wildschweinen** anscheinend unterdrückt wird und es sogar zu einem Absterben der Finnen kommen kann (PFISTER u. FRANK 1988; PFISTER et al. 1993; SYDLER et al. 1998; DEPLAZES u. ECKERT 2001; ECKERT et al. 2001 a). Dagegen ist der Verlauf der Infektion bei anderen Spezies viel dynamischer.

Hund: Bei Hunden wird von starker Vergrößerung von Abdomen und Leber, Aszites, Hypergammaglobulinämie und anderen Symptomen berichtet (GEISEL et al. 1990; HALLER et al. 1998; SCHUSTER et al. 2001; MÄTZ-RENSING et al. 2002). Im Bericht von GEISEL et al. (1990) wurden die Tiere mit Verdacht auf Tumor oder Pyometra eingewiesen. Betroffen waren hier zum Beispiel Leber, Lunge und Omentum. Protoskolizes wurden nachgewiesen. SCHUSTER et al. (2001) berichten von Finnen in der Unterhaut eines Hundes. In der Schweiz wurde das erste Mal eine gleichzeitige Infektion von Leber (Metazestodenstadium) und Darm (adulter Fuchsbandwurm) bei Hunden festgestellt (DEPLAZES u. ECKERT 2001).

Mensch: Die AE beim Menschen ist charakterisiert durch einen meist chronischen Verlauf, der Wochen, Monate oder Jahre dauern kann. Die Inkubationszeit verläuft asymptomatisch und kann beim Menschen bis zu 15 Jahre dauern. Besonders gefährdet sind Personen, die direkt mit Endwirten zu tun haben oder mit von Kot verunreinigten Materialien dieser Endwirte arbeiten. Personen, die in der Landwirtschaft tätig sind, scheinen ein erhöhtes Infektionsrisiko zu haben (ECKERT et al. 2001 b). Hunde und Katzen, die sich durch Aufnahme infizierter Zwischenwirte infizieren, stellen aufgrund ihrer intensiven Beziehung zum Menschen eine wichtige Infektionsquelle für den Menschen dar (SCHANTZ et al. 1995; ECKERT et al. 2001 c). Nach oraler Infektion mit den Eiern von *E. multilocularis* entwickeln sich die Metazestoden fast ausschließlich in der Leber. Makroskopisch sind alveoläre Strukturen und viele unregelmäßige Zysten zu beobachten. Die betroffenen Stellen in der Leber variieren von einigen Millimetern Größe bis hin zu ausgedehnten Gebieten von

infiltriertem Lebergewebe (15-20 cm). Primär extrahepatische Lokalisationen der Metazestoden sind auch beim Menschen sehr rar, jedoch wird sekundäres Metazestodengewebe in anliegenden oder auch entfernteren Organen beobachtet. Dieses entsteht durch Metastasierung aufgrund der Streuung von Keimzellen via Blut- oder Lymphgefäßen. Metastasen können sich in Lunge, Gehirn, Knochen und anderen Organen entwickeln (BÄHR 1981; AYDIN et al. 1986; PAMIR et al. 1991; AMMANN u. ECKERT 1995; PAWLOWSKI et al. 2001). Brutkapseln und Protoskolizes werden nur selten gebildet, was ein Zeichen dafür sein könnte, dass Menschen keine optimalen Bedingungen für den Parasiten bieten (AMMANN u. ECKERT 1995; PAWLOWSKI et al. 2001).

Nach der asymptomatischen Inkubationsphase kommt es meist zu einem chronischen Verlauf. Die Mortalität ist in unbehandelten Fällen sehr hoch. Es wird angenommen, dass die Wachstumsrate der Metazestoden beim Menschen relativ niedrig ist, weil 95 % der Patienten mit AE über 20 Jahre alt sind. Bei Kindern ist die AE selten, jedoch existieren auch einige Berichte von AE bei 5 bis 10 Jahre alten Kindern. Hier muss die Inkubationszeit unter 5 oder 10 Jahren gelegen haben. Normalerweise wird aber eine Inkubationszeit von 10 bis 15 Jahren erwartet. Die meisten der Patienten mit AE liegen in einer Altersgruppe zwischen 50 und 70 Jahren, wobei der jüngste Patient 10 Jahre und der älteste 89 Jahre alt war. Das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten ist ungefähr gleich (AMMANN u. ECKERT 1995; PAWLOWSKI et al. 2001).

Das klinische Bild gleicht beim Menschen einer hypertrophen Leberzirrhose oder einem Leberzellkarzinom. Der größte Teil der Patienten bleibt zunächst fieber- und schmerzfrei. Die Patienten werden durch den immer stärker werdenden Ikterus klinisch auffällig, der weiterführende diagnostische Maßnahmen nötig werden lässt (BÄHR 1981). Zu den Symptomen der AE beim Menschen zählen der zunehmende Ikterus (in einem Drittel der Fälle) und/oder epigastrische Schmerzen (im zweiten Drittel der Fälle). Im letzten Drittel der Patienten zeigen sich Müdigkeit, Gewichtsverlust, Hepatomegalie und abnorme Ergebnisse in Routinelaboruntersuchungen (AMMANN u. ECKERT 1995; PAWLOWSKI et al. 2001). Aber auch eine eingeschränkte Zwerchfellbeweglichkeit und atemabhängige Schmerzen können auftreten, wenn die Zysten mit dem Zwerchfell verbunden sind. Weitere Symptome

können sein: eine Magenausgangsstenose (durch Zysten im linken Leberlappen), eine portale Hypertension mit Ösophagusvarizen, Caput medusae und Aszites durch Druck auf die Pfortader, sowie eine Ausbreitung der Veränderungen in das Abdomen mit anaphylaktischem Schock oder eine Perforation durch das Zwerchfell (BÄHR 1981). Bei Lokalisation der Zysten im Gehirn werden vor allem neurologische Symptome beobachtet, wie zum Beispiel starke Kopfschmerzen, Lähmungserscheinungen und epileptische Anfälle (AYDIN et al. 1986; PAMIR et al. 1991). Die Blutsenkung ist in den meisten Fällen erhöht. In fortgeschrittenen Fällen ist auch eine Lymphopenie festzustellen, aber eine Eosinophilie ist meist nicht vorhanden. Bei Patienten mit intrahepatischer Gallengangskompression oder -obstruktion wird Cholestase mit oder ohne Ikterus beobachtet. Hypergammaglobulinämie wird bei den meisten Patienten festgestellt und ist ein Zeichen für die Bildung spezifischer polyklonaler Antikörper (PAWLOWSKI et al. 2001).

Nichtmenschliche Primaten: Unter natürlichen Bedingungen ist eine AE bei Affen nicht zu erwarten, da das Vorkommen von *E. multilocularis* nicht mit den Verbreitungsgebieten von nichthumanen Primaten übereinstimmt (RIETSCHEL u. KIMMIG 1994). Jedoch liegen Berichte aus verschiedenen Zoos und anderen Affenhaltungen vor. Berichtet wird von einer AE bei Kattas (*Lemur catta*) (BAUMGARTNER 1990; KONDO et al. 1996), Javaneraffen (*M. fascicularis*) (RIETSCHEL u. KIMMIG 1994), Rhesusaffen (*M. mulatta*) (BRACK et al. 1997), Gorillas (*Gorilla gorilla*) (KONDO et al. 1996; REHMANN et al. 2003), Orang-Utans (*Pongo pygmaeus*) (ECKERT et al. 2001 a) und Bartaffen (*M. silenus*) (BLANKENBURG et al. 2001, 2002). Bei allen zeigte sich eine immer stärker werdende Vergrößerung des Abdomens, die im Anfangsstadium leicht mit einer Trächtigkeit zu verwechseln war (RIETSCHEL u. KIMMIG 1994; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997; REHMANN et al. 2003).

Im Fall des **Kattas** wurden neben der abdominalen Vergrößerung keine weiteren Symptome und Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens beobachtet. Zystische Veränderungen wurden hier in Leber und leber- und lungenassoziierten Lymphknoten festgestellt. Hier kam es eine Woche nach Feststellung der abdominalen Umfangsvergrößerung zu Tachypnoe und am darauffolgenden Tag zum Tod (KONDO et al. 1996). Bei einem betroffenen **Gorilla**

waren nicht nur die Leber und die Lymphknoten von zystischen Veränderungen betroffen, sondern auch Lunge und Gehirn. Entsprechend waren auch die Symptome: zerebrale Ausfallserscheinungen mit mehreren Schwächeanfällen und rechtsseitiger Hemiparese. Nach drei Monaten erholte sich das Tier wieder, aber einige Monate später wurden sogenannte Jackson Anfälle beobachtet (Epilepsie mit fokalen Anfällen). Der Gorilla wurde anorektisch und zeigte im weiteren Krankheitsverlauf auch eine Fazialisparese (KONDO et al. 1996). Auch REHMANN et al. (2003) berichten von zwei Gorillas mit AE. Die betroffenen Tiere wurden auffällig durch immer wiederkehrende Perioden mit Apathie, Anorexie, Schwäche und fortschreitender Vergrößerung des Abdomens. Bei einem **Orang-Utan** wurde von Abmagerung, geringem Appetit und Ikterus berichtet (ECKERT et al. 2001 a). Bei einem Fall eines **Rhesusaffen** wurde nach Feststellung der abdominalen Vergrößerung und nach Ausschluss einer Trächtigkeit eine Hepatomegalie und ein Aszites diagnostiziert. Das Allgemeinbefinden verschlechterte sich immer mehr, so dass das Tier euthanasiert wurde. Zystische Veränderungen wurden in Leber, Lunge, Magenwand und Mesenteriallymphknoten festgestellt (BRACK et al. 1997). Bei einem **Javaneraffen** kam es im Alter von 18 Monaten zum Tode. Bei der Obduktion wurde eine stark vergrößerte und tumorartig veränderte Leber festgestellt. Diese war mit Magen und Dünndarm verwachsen (RIETSCHEL u. KIMMIG 1994). Protoskolizes ließen sich in allen Fällen nur vereinzelt finden.

2.2.4 Pathologie

Die makroskopischen Befunde der an AE erkrankten Lebewesen sind einander sehr ähnlich. Die Leber ist das am häufigsten betroffene Organ. Zu den Hauptbefunden zählt vor allem eine Hepatomegalie. Meist sind neben der Leber auch andere Organe betroffen, wie zum Beispiel die Unterhaut beim Hund (SCHUSTER. et al. 2001), das Gehirn bei Mensch und Gorilla (AYDIN et al. 1986; PAMIR et al. 1991; KONDO et al. 1996) und häufig auch die Lunge (GEISEL et al. 1990; AMMANN u. ECKERT 1995; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997; ECKERT et al. 2001 b). Die Leberlymphknoten sind meist vergrößert und zystisch durchsetzt. Dies trifft auch oft auf die Mesenteriallymphknoten und Lungenlymphknoten zu (GEISEL et al. 1990; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997). Fälle, in denen von

ausschließlich extrahepatischen Läsionen berichtet wird, sind extrem selten (AYDIN et al. 1986; SCHUSTER et al. 2001). Primäres Manifestationsorgan scheint die Leber zu sein. Von hier aus kommt es zur "Verstreuung" der Keimzellen über Blut- und Lymphgefäße und damit zur Metastasierung (AMMANN u. ECKERT 1995; ECKERT et al. 2001 a; PAWLOWSKI et al. 2001). Die Leber ist meist vergrößert und mehr oder weniger mit zystischem Gewebe durchsetzt. RIETSCHEL und KIMMIG (1994) berichten von einer stark vergrößerten und tumorartig veränderten Leber bei einem Javaneraffen, die mit Magen und Dünndarm verwachsen war. KONDO et al. (1996) fanden bei einem Gorilla einen großen blasenartigen und nekrotischen Hohlraum mit gelblich weißer Flüssigkeit, der sich auf der viszeralen Oberfläche des rechten Leberlappens befand. Auch das Lungenparenchym war hier mit miliaren weißen Knötchen durchsetzt, und das Gehirn zeigte neben einer ödematösen Veränderung auch eine Zyste von 3 cm Durchmesser in der linken Frontalregion. REHMANN et al. (2003) berichten von zwei Gorillas. Bei einem Tier waren alle abdominalen Organe überzogen mit einer dicken grau-weißen Flüssigkeit. Zwischen diesen Organen wurden fibrinöse Verklebungen beobachtet. Bei dem anderen Gorilla war hauptsächlich die Leber betroffen. KONDO et al. (1996) berichten auch von einem Katta, bei dem die alveolären zystischen Massen sogar mehr als die Hälfte der Brust- und Bauchhöhle ausfüllten. Bei einem Rhesusaffen wurde eine generalisierte subakute Peritonitis festgestellt. Auch hier wurde eine Vergrößerung der Leber mit einer teilweise schon vollständigen fibrösen Transformation des Lebergewebes diagnostiziert. Die Zysten waren hier entweder leer oder mit einer farblosen gelatineartigen Flüssigkeit gefüllt, und auch das Lungengewebe war von miliaren knotigen Strukturen durchzogen (BRACK et al. 1997).

Bei einem Hund wurden neben einer geschwollenen und mit Zysten durchsetzten Leber sowie einer mit Zysten durchsetzten Lunge auch eine fibroblastische Peritonitis im kranialen Bereich der Bauchhöhle und am Zwerchfell festgestellt. Ein anderer Hund zeigte ein fußballgroßes Gebilde im großen Netz (GEISEL et al. 1990), und HALLER et al. (1998) berichten von einer festen, 13-15 cm im Durchmesser großen Masse, ausgehend vom rechten und linken Leberlappen eines Hundes. Oftmals zeigen die zystischen Veränderungen in den zentralen Bereichen nekrotische Veränderungen und Verkalkungen (GEISEL et al. 1990; AMMANN u. ECKERT 1995; AMMANN u. ECKERT 1996; ECKERT et al. 2001 b).

MÄTZ-RENSING et al. (2002) beschreiben eine 2400 g schwere, von der Leber ausgehende, blumenkohlartige Umfangsvermehrung, welche zentral eine großflächige Nekrose mit Hohlraumbildung aufwies. Dieser Hohlraum war mit einer trüben, körnigen Flüssigkeit gefüllt.

Histologisch liegen in vielen Fällen gekammerte Strukturen, umrandet von Entzündungsreaktionen, vor. Die Zysten sind oft eingelagert in nekrotisches mineralisiertes Gewebe und bestehen aus einer äußeren Laminarschicht und einer inneren germinativen Schicht (Keimschicht). Im Inneren sind teilweise Kalkkörperchen und Protoskolizes zu finden (GEISEL et al. 1990; AMMANN u. ECKERT 1996; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997; REHMANN et al. 2003). Die Entzündungszellreaktion ist charakterisiert durch Fremdkörperriesenzellen. KONDO et al. (1996) berichten von zystischen Veränderungen in der Leber und den assoziierten Lymphknoten. Hierbei beobachteten sie, dass das perizystische Gewebe innen aus Epitheloidzellen mit Fremdkörperriesenzellen und außen aus dichtem fibrösem Gewebe bestand. Außerdem stellten sie eine schwere Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen im interzystischen Gewebe fest. Im Gehirn beobachteten sie Astrozytosen und eine granulomatöse Reaktion, die nicht so stark ausfiel wie in der Leber. Die zystischen Veränderungen in der Unterhaut eines Hundes wiesen sowohl Protoskolizes als auch lymphoide Zellaggregate auf (SCHUSTER et al. 2001). PAMIR et al. (1991) berichten von fokal oder diffus nekrotischen Zysten im Hirngewebe von mehreren humanen Patienten, die von hyalinem fibrotischen Gewebe oder Entzündungszellreaktionen mit Fremdkörperriesenzellen umrandet sind. Protoskolizes beobachteten sie hier nicht. Das Vorkommen von Protoskolizes in Fehlwirten ist unregelmäßiger als bei natürlichen Zwischenwirten, jedoch sind sie auch hier vereinzelt zu finden.

2.2.5 Therapie

Die Therapie der AE ist schwierig, da Symptome meist erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auftreten, und es deshalb oft erst spät zu einer Diagnose kommt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Krankheit häufig schon sehr weit fortgeschritten. Eine spezifische klinische

Erfahrung ist Voraussetzung für eine optimale Therapie, deshalb sollten sich an AE erkrankte Menschen direkt an die nationalen/regionalen AE Referenzzentren wenden. Auch bei infizierten Tieren ist die Kontaktierung des für Echinokokken spezifischen Referenzzentrums/Konsiliarlaboratoriums anzuraten. In Deutschland ist das Konsiliarlaboratorium für Echinokokken des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg erster Ansprechpartner. Für eine erfolgreiche Therapie ist eine frühe Diagnose der AE von großer Bedeutung, da die parasitären Veränderungen mit einem malignen Tumor vergleichbar sind (PAWLOWSKI et al. 2001).

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Therapie. Bei menschlichen Patienten gilt in operablen Fällen eine radikale chirurgische Resektion der parasitären Veränderung als erste Wahl. Nach der chirurgischen Entfernung ist eine Chemotherapie für eine begrenzte Zeit angezeigt (PAWLOWSKI et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit ist in inoperablen Fällen eine Langzeit-Chemotherapie. Dies gilt auch für Fälle mit einer unvollständigen chirurgischen Resektion oder aber nach Lebertransplantationen (PAWLOWSKI et al. 2001).

Bei an AE erkrankten Tieren bestehen die gleichen Therapiemöglichkeiten, jedoch ist oft der finanzielle Aspekt ein limitierender Faktor. Grundsätzlich aber sind Chirurgie und Chemotherapie in den meisten Fällen genauso anwendbar wie beim Menschen, vorausgesetzt die Erkrankung ist noch nicht so weit fortgeschritten.

Für die Chemotherapie der AE werden vorzugsweise die zwei Benzimidazole Albendazol (Eskazole[®], SmithKline Beecham Animal Health, Großbritannien) und Mebendazol (Vermox forte[®], Janssen-Cilag, Belgien) benutzt. Dabei wird aber in der Regel nur eine Parasitostase und keine Heilung erreicht (ECKERT 1996; ECKERT et al. 2001 a; PAWLOWSKI et al. 2001). Beim Menschen führt diese jedoch in > 80 % der Fälle zu einer klinischen Besserung und einer signifikanten Lebensverlängerung (bei 70 behandelten Patienten 10-Jahresüberlebensrate 89 %, statt 6-25 % bei unbehandelten Patienten) (ECKERT 1996). Eine Übersicht über Möglichkeiten einer Chemotherapie gibt Tabelle 1. Nach HEYD et al. (2000) sollte mit der medikamentösen Therapie bei humanen Patienten 4 Wochen vor dem chirurgischen Eingriff begonnen werden, um eine intraoperative parasitäre Aussaat zu

vermeiden. Bei einer Lebertransplantation beträgt die Dosierung von Mebendazol 4-4,5 g pro Tag. Die Therapie mit Mebendazol soll nach HEYD et al. (2000) bei einer kompletten chirurgischen Resektion solange weitergeführt werden, bis eine serologische Normalisierung eingetreten ist. Bei unvollständiger Resektion muss eine jahrelange Therapie angestrebt werden. Gleichzeitig müssen regelmäßige radiologische und serologische Kontrollen durchgeführt werden. Nach KERN et al. (1994) sollte bereits 10 Wochen vor der geplanten Operation mit einer medikamentösen Vorbehandlung begonnen werden. Albendazol sollte in regelmäßigen Zyklen von 28 Tagen in einer Dosierung von 10-15 mg/kg Körpergewicht zu fettreichen Mahlzeiten, verteilt auf eine morgendliche und eine abendliche Dosis, verabreicht werden. Danach sollte eine 14tägige Pause gemacht werden. Diese Therapie sollte über Jahre fortgesetzt werden (KERN et al. 1994; REUTER et al. 1998). Mebendazol wird nach KERN et al. (1994) und REUTER et al. (1998) in einer Dosierung von 40-50 mg/kg Körpergewicht zu fettreichen Mahlzeiten, verteilt auf drei tägliche Dosen, verabreicht. Dies wird kontinuierlich durchgeführt. Die regelmäßige Bestimmung des Medikamentenspiegels ist bei Mebendazol hilfreich.

Für die serologischen Untersuchungen zur Diagnose und Überwachung wurde der Em2^{plus} ELISA entwickelt und kommerzialisiert. Dieser Test basiert auf einer Kombination von Em2- und II/3-10 Antigenen. Er scheint ein diagnostischer Test mit einer hohen Sensitivität (97 %) zu sein und erlaubt auch eine Unterscheidung zwischen AE und CE (zystische Echinokokkose verursacht durch *E. granulosus*) (GOTTSTEIN et al. 1993).

Auch bei Tieren zeigten die Anthelmintika der Benzimidazolgruppe die besten Ergebnisse. Es gibt jedoch keine Routinebehandlung, da die Applikation von Benzimidazolen in effektiven Dosierungen bei Tieren oft zu teuer ist. Über die Therapie von Tieren mit Benzimidazolen existieren nicht viele Berichte. HALLER et al. (1998) beschreibt eine Chemotherapie mit Albendazol (Valbazen[®], SmithKline Beecham Animal Health, Großbritannien) nach radikaler chirurgischer Resektion der parasitären Veränderungen bei einem Hund. 10 mg/kg Körpergewicht wurden täglich mit dem Futter verabreicht. Diese Behandlung wurde in wechselnden Zyklen von 4 Wochen gefolgt von 2 Wochen ohne Medikation durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Hund mit Praziquantel (Droncit[®], Bayer AG, Leverkusen,

Deutschland) (10 mg/kg Körpergewicht) behandelt, um eine eventuell gleichzeitige Infektion mit den intestinalen Stadien von *E. multilocularis* auszuschließen. Diese Behandlung wurde einmal nach zwei Wochen wiederholt. Gleichzeitig wurde ein intensives Überwachungsprogramm durchgeführt. Alle drei Monate wurde ein großes Blutbild erstellt, die chemischen Blutwerte bestimmt, eine Serumelektrophorese sowie eine Ultraschalluntersuchung der Leber und serologische Tests auf *E. multilocularis* durchgeführt. Für Letzteres wurden vor und nach der chirurgischen Behandlung ELISA - Tests mit für *E. multilocularis* hoch spezifischen Antigenen (EmG11, Em2^{plus} und II/3-10) durchgeführt. Der Antikörperspiegel im Serum des Hundes war 46 Tage nach dem chirurgischen Eingriff in allen drei serologischen Tests weniger stark positiv. Nach 109 Tagen zeigte nur noch der II/3-10 ELISA schwach spezifische Reaktionen, welche sich aber am 221. und 326. Tag nach der Resektion zu einem negativen Wert veränderten. Der Hund wurde während einer Periode von 21 Monaten mit 15 chemotherapeutischen Zyklen behandelt. Nach fast zwei Jahren zeigte er keine Anzeichen für ein Wiederauftreten der Erkrankung.

Auch DEPLAZES und ECKERT (2001) berichten von der Therapie der AE bei Hunden mit Albendazol für fünf Monate bis zwei Jahre. Ausgedehnte Studien mit Benzimidazolen wurden auch bei Nagern durchgeführt, die mit Metazestoden von *E. multilocularis* infiziert waren. Es wurden Langzeitbehandlungen mit Albendazol (60 Tage), Fenbendazol (60-200 Tage), Flubendazol (60-200 Tage) und Mebendazol (60-300 Tage) bei einer Dosierung von 30-50 mg/kg Körpergewicht durchgeführt. Es kam zu einer Reduktion des Metazestodengewichtes von bis zu 99 % im Vergleich zu unbehandelten Fällen. Trotz allem blieben die Metazestoden aber in den meisten Fällen lebensfähig, ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei *E. granulosus* mit derselben Dosierung in einer kürzeren Zeit erreicht wurden. Hier kam es zur Zerstörung oder sogar zur Abtötung von *E. granulosus* (ECKERT et al. 2001 a). Auch Praziquantel wurde auf seinen Effekt auf AE bei Nagern getestet. Hier konnte keine signifikante Hemmung der Metazestodenproliferation bei *E. multilocularis* festgestellt werden (30-50 mg/kg Körpergewicht für bis zu 60 Tage). Nur eine ausgeprägt hohe Dosierung von 500 mg/kg Körpergewicht für 180 Tage hemmte die Proliferation des Parasiten bei Nagern um 84 %, was immer noch unter der Wirkung von Mebendazol und Albendazol liegt. Deshalb scheint es keinen experimentellen Beweis dafür zu geben, dass Praziquantel in realistischen

Dosierungen einen erfolgreichen chemotherapeutischen Effekt auf die AE hat (AMMANN u. ECKERT 1995; ECKERT et al. 2001 a).

Tabelle 1: Übersicht über Therapiemöglichkeiten

		Beginn der Therapie	Therapie in Zyklen ja/nein	Zyklen dauer	Pause	Dosierung mg/kg KG	Dauer der Therapie
Mensch	Mebendazol	10 Wo vor OP*	nein			50	über Jahre
	Albendazol	10 Wo vor OP*	ja	28 Tage	14 Tage	10	über Jahre
Hund	Albendazol	postoperativ	ja	4 Wo	2 Wo	10	über Jahre
	Praziquantel (bei adulten Darmparasiten)	zweimalig, gleichzeitig mit Albendazol	ja	einmalig	2 Wo	10 (Wdh. nach 2 Wo)	zweimal innerhalb von 2 Wo

*) nach HEYD et al. (2000) 4 Wochen

2.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC)

Als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet man einen Chromosomenabschnitt, auf dem u. a. Antigen präsentierende Proteine kodiert werden, die eine wichtige Rolle im Immunsystem der Vertebraten spielen. Diese Proteine sind wichtig bei der Unterscheidung des Körpers zwischen "Selbst" und "Fremd" und bei der Entwicklung der humoralen und zellvermittelten Immunantwort. Die Gene des MHC kodieren u. a. für Proteine, die Antigene präsentieren. Beim Menschen befindet sich der MHC auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 und wird als *HLA* bezeichnet (JANEWAY u. TRAVERS 1997; BONTROP et al. 1999). Beim Rhesusaffen (*M. mulatta*), bei dem der MHC mit *Mamu* bezeichnet wird, werden die Chromosomen 2 (GARVER et al. 1980) und 5 (HIRAI et al. 1991) diskutiert. Der MHC besteht insgesamt aus ca. 200 Genen und erstreckt sich beim Menschen auf ca. 4×10^6 Basenpaare (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Von einigen Krankheiten ist bekannt, dass sie mit bestimmten Allelen des MHC assoziiert sind, z. B. Autoimmunerkrankungen und Allergien. Es wurden auch Assoziationen mit der Suszeptibilität, bzw. Resistenz gegen einige bakterielle und virale Erkrankungen festgestellt.

Hierzu gehören z. B. auch HIV - Infektionen (HILL 1998).

2.3.1 Struktur und Funktion der MHC-Moleküle

Der humane MHC-Genkomplex ist in drei Regionen (I - III) untergliedert. Diese kodieren für unterschiedliche Klassen von MHC-Molekülen.

Die Moleküle der Region III sind in Struktur und Funktion sehr unterschiedlich und nicht mit den MHC-Klasse-I- und II-Molekülen verwandt. Zu ihnen gehören z. B. lösliche Serumproteine, Komponenten des Komplementsystems und Tumor-Nekrose-Faktoren, die hier nicht weiter besprochen werden sollen. Die Antigen präsentierenden Moleküle der Regionen I und II sind membrangebundene Heterodimere mit extrazellulär gelegenen Domänen, welche auf die Bindung von Peptiden spezialisiert sind.

MHC-Klasse-I-Moleküle:

Die Antigen präsentierenden MHC-Klasse-I-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die sich auf fast allen kernhaltigen Zellen befinden. Sie präsentieren Peptide auf der Zelloberfläche, die von Proteinen aus dem Zytosol stammen. Diese Proteine stammen von Viren oder Bakterien, die sich im Zytosol der Zelle vermehren (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die zytosolischen Proteine werden von einem multikatalytischen Proteasekomplex (Proteasom) im Zytosol abgebaut. Anschließend werden die Peptide in das Endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier binden sie an die MHC-Klasse-I-Moleküle und werden dann auf der Zelloberfläche präsentiert. Das präsentierte Peptid wird, wenn es körperfremd ist, von CD8-T-Zellen erkannt. Die Erkennung führt nun zur Aktivierung und Differenzierung der CD8-T-Zellen in zytotoxische T-Zellen. Diese eliminieren die infizierten Antigen präsentierenden Zellen und verhindern so die Verbreitung einer Infektion (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Die MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer α - oder schweren Kette und einer kleineren Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (Abb. 4). Die α -Kette ist im MHC-Genkomplex kodiert, während das β_2 -Mikroglobulin nicht im MHC-Genkomplex kodiert ist. Das Molekül besteht aus vier Domänen, drei davon bildet die α -Kette (α_1 - α_3) und eine das β_2 -Mikroglobulin. Nur die α -Kette durchdringt die Zellmembran. Die Domänen α_1 und α_2 bilden ein Paar und schaffen so einen Spalt an der Oberfläche des Moleküls. Dieser Spalt ist die Peptidbindungsregion (PBR) (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die Struktur der PBR wurde durch die Untersuchung der Kristallstruktur der MHC-Moleküle aufgeklärt (BJORKMAN et al. 1987 a; BJORKMAN et al. 1987 b; SAPER et al. 1991; BROWN et al. 1993; STERN et al. 1994; GARBOCZI et al. 1996). Die PBR gleicht einer Art Grube, deren Boden durch β -Faltblatt-Strukturen gebildet wird. Die Ränder werden von zwei α -Helices gebildet. Im Bereich der Grube befinden sich verschiedene Seitenreste, die in die Grube hineinragen und sich auch auf der Oberfläche der α -Helices befinden. Die Peptidbindung in der Grube erfolgt über Aminosäurenreste, die in Taschen der PBR des MHC-Moleküls hineinragen. Die MHC-Klasse-I-Moleküle können in dieser PBR Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden (RÖTZSCHKE et al. 1990; JARDETSKY et al. 1991; MADDEN et al. 1991; FREMONT et al. 1992). Ein Teil der Aminosäuren des gebundenen Peptids ragt aus der Bindungsgrube heraus und kann durch diese exponierte Lage in direkten Kontakt mit dem T-Zellrezeptor treten.

MHC-Klasse-II-Moleküle:

Die Antigen präsentierenden MHC-Klasse-II-Moleküle werden durch die MHC-Klasse-II-Region kodiert. Diese Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die sich hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems befinden (z. B. Makrophagen, B- und T-Lymphozyten). Diese Zellen präsentieren den CD4-T-Zellen mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle Antigenpeptide. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren Peptide, die aus extrazellulären Krankheitserregern und Proteinen stammen, sowie Peptide von Erregern, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren, wie z. B. Leishmania-Arten und Mycobakterien (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Durch Endozytose werden die Proteine der extrazellulären

Pathogene in das vesikuläre System der Zelle aufgenommen. Während sich die Vesikel (Endosomen) in Richtung auf das Zellinnere bewegen, werden sie zunehmend saurer. Durch diesen steigend sauren pH-Wert werden die Proteasen der Vesikel aktiviert und spalten die Proteine zu Peptidfragmenten. Später gelangen neu synthetisierte MHC-Klasse-II-Moleküle in solche angesäuerten Vesikel, binden die Peptidfragmente der Pathogene und transportieren sie an die Zelloberfläche. Haben die CD4-T-Zellen das fremde Peptid auf Makrophagen oder B-Zellen erkannt, werden sie aktiviert, schütten Zytokine aus und aktivieren die humorale und zellvermittelte Immunantwort. Die aktivierten Makrophagen töten die intravesikulären Erreger in ihrem Inneren. Die aktivierten B-Zellen beginnen mit der Produktion von löslichen Antikörpern (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Die MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus zwei Peptidketten (α - und β -Kette) (Abb. 4). Beide Ketten durchdringen, im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Molekülen, die Membran. Beide Ketten werden von Genen der MHC-II-Region kodiert. α - und β -Kette bestehen aus zwei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Region. Die extrazellulären Domänen α_1 und β_1 bilden die PBR, die im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Molekülen an den Enden weiter geöffnet ist (BROWN et al. 1993; STERN et al. 1994; JANEWAY u. TRAVERS 1997). Dadurch können hier längere Antigene von 13-24 Aminosäuren gebunden werden, weil die Enden über die PBR hinausragen (RUDENSKY et al. 1991; HUNT et al. 1992; BROWN et al. 1993). Diese Enden werden nicht gebunden und spielen bei der Antigenerkennung keine Rolle. Die PBR hat sonst einen ähnlichen Aufbau wie die PBR der MHC-Klasse-I-Moleküle. Der Boden besteht aus α -Faltblattsträngen und die Ränder werden von zwei β -Helices gebildet. Die Bindung erfolgt über Peptidseitengruppen, die in Taschen der PBR hineinragen.

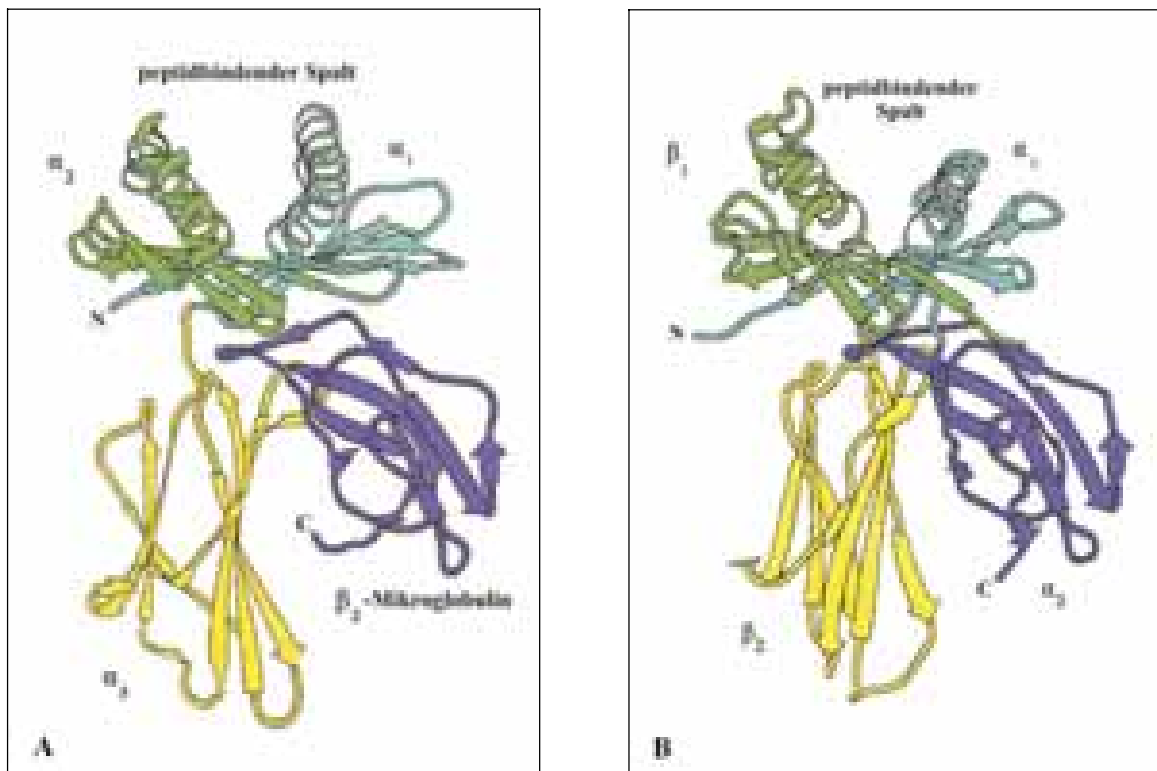


Abb. 4: Struktur der MHC-Klasse-I-Moleküle (A) und der MHC-Klasse-II-Moleküle (B), (nach JANEWAY u. TRAVERS 1997)

2.3.2 Die Gene der MHC-Moleküle

Werden die Antigene den T-Zellen präsentiert, folgen verschiedene Mechanismen, die für den Erreger meist fatale Folgen haben (siehe Kap. 2.3.1). Deshalb wirkt hier ein starker selektiver Druck, der die Pathogene begünstigt, die ihre Gene so mutieren können, dass sie der Präsentation durch das MHC-Molekül entgehen (z. B. HIV, Malaria). Da vom Immunsystem die unterschiedlichsten Pathogene erkannt werden, müssen die MHC-Moleküle die Fähigkeit haben, viele verschiedene Peptidantigene zu binden. Diese Fähigkeit wird durch zwei verschiedenen Mechanismen erreicht: der MHC ist sowohl polygen als auch polymorph. Polygen bedeutet, dass es mehrere MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Gene gibt, die MHC-Moleküle mit verschiedenen Peptidbindungsspezifitäten kodieren. Polymorph bedeutet, dass

es für fast jedes Gen eine Anzahl verschiedener Varianten (Allele) gibt. Die MHC-Gene werden außerdem codominant exprimiert, d. h. die Produkte beider Allele werden in derselben Zelle exprimiert und präsentieren beide den T-Zellen Antigene. Durch diese aufgeführten Mechanismen kommt es zu einer hohen Variabilität der MHC-Moleküle innerhalb einer Spezies (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Besonders die Bereiche, die an der Bindung des Antigens beteiligt sind, zeigen eine hohe Variabilität, so z. B. die α_1 - und β_2 -Domänen der MHC-Klasse-I-Moleküle.

Zum Aufbau des MHC bei Bartaffen (*M. silenus*) ist nichts bekannt. Dagegen ist der Rhesusaffe (*M. mulatta*) der Vertreter der Altweltaffen, dessen MHC schon relativ gut untersucht wurde (SLIERENDREGT et al. 1994; WATKINS 1994; WATKINS 1995; BOYSON et al. 1996 a, b; SAUERMAN 1998; BONTROP et al. 1999; KHAZAND et al. 1999; DZURIS et al. 2000; SAUERMAN et al. 2000). Abbildung 5 gibt einen Überblick über die genetische Organisation des MHC beim Menschen und beim Rhesusaffen.

Der MHC Klasse I:

Der Mensch besitzt drei α -Ketten-Gene für die klassischen MHC-Klasse-I-Proteine. Diese werden *HLA-A*, *-B* und *-C* genannt. Außerdem gibt es noch die nicht-klassischen Gene. Dies sind meist Gene, die Proteine mit hoch spezialisierten Aufgaben kodieren, aber auch Pseudogene. *HLA-E* und *-G* sind z. B. an der Erkennung von natürlichen Killerzellen beteiligt (CALLAGHAN u. BELL 1998). Der Mensch hat pro Haplotyp jeweils ein *A*-, *B*- und *C*-Gen. Der MHC Klasse I besitzt einen hohen Grad an Polymorphismus. Beim Menschen wurden bis jetzt 274 *A*-Allele, 519 *B*-Allele und 133 *C*-Allele gefunden (IMGT/HLA Sequence Database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>).

Die MHC-Klasse-I-Region ist beim Rhesusaffen (*M. mulatta*) komplizierter aufgebaut als beim Menschen. Im Gegensatz zum Menschen wurde bei dieser Spezies eine multiple Anzahl von *A*- und *B*-Genen sowie andere Gene, die nicht beim Menschen gefunden wurden, nachgewiesen. Ein *HLA-C* Homolog wurde weder bei Rhesusaffen (BOYSON et al. 1996 a,

b) noch bei Gibbons oder Orang-Utans (CHEN et al. 1992) gefunden. Dagegen ist dieser Locus aber bei Gorillas und Schimpansen nachgewiesen worden. Dies zeigt die engere Verwandtschaft dieser Spezies zum Menschen.

Der MHC Klasse II:

Die klassischen MHC-Klasse-II-Moleküle sind Transmembran-Heterodimere, die aus einer ζ - und einer η -Kette bestehen (siehe Kap. 2.3.1) und von den *A*- bzw. *B*-Genen kodiert werden. Die MHC-Klasse-II-Region des Menschen umfasst mindestens 700 000 Basenpaare. Sie unterteilt sich in *HLA-DR*, *-DQ* und *-DP*-Regionen. Jede Region weist mehrere *A*- oder *B*-Loci auf, die aber nicht alle exprimiert werden.

In der MHC-Klasse-II-Region wurden beim Menschen bisher 53 *DQB1*- und 24 *DQAI*-Allele veröffentlicht. Beim Rhesusaffen wurden dagegen 40 *DQB1*- und 20 *DQAI*-Allele identifiziert. Bei den *DP*-Genen wurden beim Menschen 20 *DPA1*- und 103 *DPB1*-Allele, beim Rhesusaffen ein monomorphes *DPA1*-Gen und 16 *DPB1*-Allele gefunden. Bei den *DR*-Genen wurde sowohl beim Menschen als auch beim Rhesusaffen ein monomorphes *DRA*-Gen nachgewiesen (SLIERENDREGT et al. 1994).

Dagegen zeichnet die *DRB*-Gene ein hoher Grad an Polymorphismus aus. Beim Menschen gibt es 5 Haplotypen der *DRB*-Gene mit hohem Polymorphismus. Es wurden bisher schon 404 Sequenzen nachgewiesen, die mit *HLA-DRB1* bis *-DRB9* benannt wurden. Das auffallendste Merkmal der *DRB*-Region beim Rhesusaffen ist die hohe Zahl der Haplotypen. Beim Rhesusaffen wurden bislang 31 Haplotypen nachgewiesen. Innerhalb einer bestimmten Konfiguration ist der Polymorphismus auf der Allelebene jedoch begrenzt (KHAZAND et al. 1999; DOXIADIS et al. 2003). Beim Rhesusaffen sind bisher 126 *DRB*-Sequenzen publiziert. Diese sich ständig erhöhende Zahl an Allelen zeigt die besondere Stellung der *DR*-Gene für das Immunsystem. Viele Allele der Rhesusaffen gehören zu bereits bekannten Linien oder Loci, die es auch beim Menschen oder Menschenaffen gibt (BONTROP et al. 1999).

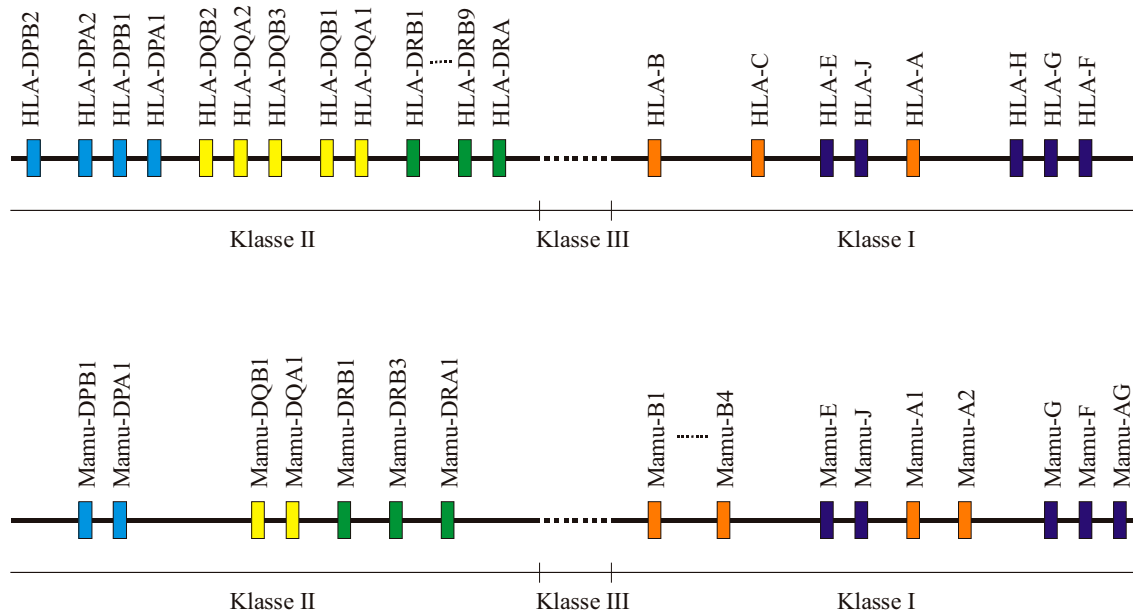


Abb. 5: Genetische Organisation des MHC des Menschen und des Rhesusaffen
(die Anordnung beim Rhesusaffen ist noch hypothetisch)

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere und Material

3.1.1 Tiere

Die Bartaffen (*M. silenus*), die in diese Studie einbezogen wurden, gehören zur Kolonie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen (DPZ) und werden hier in einer Kombination aus Innen- und Außengehege in einer Gruppe gehalten. In Tabelle 2 sind die am DPZ gehaltenen Bartaffen aufgeführt. Das Tier mit der Nummer 9485 ist im Zeitraum dieser Studie verstorben. Die Tiere mit den Nummern 5229 und 7194 wurden im Verlauf dieser Studie in eine andere Einrichtung verbracht. Einige Tiere wurden im DPZ Göttingen geboren, andere wurden im Laufe ihres Lebens nach Göttingen verbracht. Genauere Angaben über alle Tiere dieser Studie sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Bartaffen werden mit einer ausgewogenen und abwechslungsreichen Diät ernährt. Die Diät besteht aus pelletiertem Primatenalleinfutter, Körnermischungen, Zwieback, Obst, Gemüse, Quarkbrei, einmal pro Woche Feigen, Datteln, Rosinen, Mehlwürmern, Hüttenkäse, gekochtem Huhn, gekochtem Ei, gekochten Nudeln und gekochtem Reis sowie zweimal pro Woche gekochten Haferflocken. Einmal im Jahr werden alle Tiere im DPZ einer gründlichen klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Hierbei werden auch Blut- und Spermaproben genommen sowie Impfungen und TB-Tests durchgeführt. Seit 1999 gehört auch die Ultraschalluntersuchung, speziell der Leber, mit zu den Routineuntersuchungen in der Gruppe.

Nahezu alle Tiere der DPZ-Bartaffenkolonie wurden in die genetischen, serologischen und ultrasonographischen Untersuchungen dieser Studie mit einbezogen. Die Tiere 11175 und 11439 wurden erst während dieser Studie geboren und standen somit noch nicht für die genetischen Untersuchungen zur Verfügung. Das Tier mit der Nummer 9485 verstarb während dieser Studie. Deshalb standen für die serologischen Untersuchungen dieses Tieres nur asservierte Serumproben zur Verfügung. Die Tiere 7194 und 5229 wurden während dieser Studie in eine andere Institution verbracht; deshalb wurden auch hier für die serologischen

Untersuchungen asservierte Proben verwendet. Weiterhin wurde von nahezu allen Tieren aus Tabelle 2 ein Differentialblutbild angefertigt.

Tabelle 2: Bartaffenkolonie des DPZ

Name	m/w	Tier-Nr.	Geburtstag Geburtsort	Transfer	nach	Bemerkungen	US 1	US 2	DBB	S	GU	PU	RU
Marina	w	1252	16.05.1987 Wuppertal	18.05.1987	Göttingen		x	x	x	x	x		
Krishna	m	5229	09.12.1986 Magdeburg	05.09.1988 1989 1989 14.06.1989	Budapest J. Hop Szegedi Göttingen	während Studie an Zoo Köln abgegeben	x			x	x		
Pelle	m	7194	23.07.1994 Göttingen			während Studie an Zoo Köln abgegeben	x			x	x		
Michel	m	8295	30.07.1996 Göttingen				x	x	x	x	x		
Jette	w	8113	28.03.1996 Göttingen				x	x	x	x	x		
Nadak	m	9837	30.01.1986 Stuttgart	07.02.1992 07.07.1999	Erfurt Göttingen		x	x	x	x	x		
Ronja	w	6433	10.01.1993 Göttingen				x	x	x	x	x		
Mahi	w	9485	17.06.1998 Leipzig	28.10.1998	Göttingen	während Studie an Folgen einer Bissverletzung verstorben	x			x	x		
Trixi	w	9838	18.12.1974 Erfurt	07.07.1999	Göttingen		x	x	x	x	x		
Stina	w	11175	29.08.2001 Göttingen			während Studie geboren		x	x	x			
Skrolan	m	11439	03.02.2002 Göttingen			während Studie geboren		x	x	x			
Hanna	w	5006	06.09.1988 Wuppertal	06.09.1988	Göttingen	an Echinokokkose erkrankt, Todesdatum: 19.04.1999				x		x	
Ida	w	5092	26.07.1988 Berlin	13.01.1989	Göttingen	an Echinokokkose erkrankt, Todesdatum: 12.08.1999				x		x	x
Heinrich	m	6434	11.01.1993 Göttingen	10.06.1997	Rostock	an Echinokokkose erkrankt, Todesdatum: 08.11.1999					x	x	

US-Ultraschalluntersuchung; DBB-Differentialblutbild; S-Serologie; GU-genetische Untersuchung;

PU-Pathomorphologische Untersuchung; RU-Röntgenologische Untersuchung

Bei den an Echinokokkose erkrankten Tieren (Tab. 2) wurden folgende Methoden angewendet: Umfangreiche pathomorphologische Untersuchungen wurden an allen drei Bartaffen durchgeführt. Tier 6434 war im Gegensatz zu den Tieren 5006 und 5092 das einzige Tier, das zum Zeitpunkt der ersten Anzeichen einer Erkrankung nicht mehr am DPZ war. In die genetischen Analysen konnte nur das Tier mit der Nummer 6434 einbezogen werden, da von den anderen beiden kein für diese Untersuchung erforderliches Probenmaterial zur Verfügung stand. Die Tiere 5006 und 5092 konnten serologisch getestet werden.

3.1.2 Probenmaterial

Die Tiere wurden im Rahmen der jährlichen klinischen Routineuntersuchungen mit Hilfe eines Blasrohres (Dan inject Blasrohr, Modell Blow 125) sediert. Hierfür wurde Ketamin in einer Dosierung von 8-10 mg/kg KGW genutzt, welches mit Hilfe des Blasrohres intramuskulär verabreicht wurde. Zusätzlich zu den diagnostischen Blutproben im Rahmen der Jahresuntersuchung wurde Blut zur hämatologischen, serologischen und genetischen Analyse gewonnen.

Das Material für die pathomorphologischen Untersuchungen wurde während der diagnostischen Sektionen entnommen. Es wurden Proben aus Gehirn, Niere, Milz, Leber, Lunge, Herz, Magen, Oesophagus, Dünndarm, Dickdarm, Tonsillen, Lymphknoten, Speicheldrüse, Nebenniere, Muskulatur, Pankreas, Blase und Ovar bzw. Hoden entnommen und in 10%igem Formalin (siehe Kap. 9.1) fixiert. Die zugeschnittenen Gewebestücke wurden danach routinemäßig in Paraffin eingebettet (siehe Kap. 3.2.3.1). Außerdem wurden Proben von Leber, Niere, Milz und Lunge sowie von Echinokokkengewebe bei -80° C eingefroren.

3.1.3 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind einschließlich ihrer Zusammensetzungen im Anhang aufgeführt (siehe Kap. 9.1).

3.1.4 Primer

Die verwendeten Primer sind in der im Anhang aufgeführten Tabelle einzusehen (siehe Kap. 9.2).

3.2 Methoden

3.2.1 Bildgebende Verfahren

Im Rahmen der jährlichen Allgemeinuntersuchung wurden alle zur Kolonie gehörenden Bartaffen (Tab. 2) unter Sedation (siehe Kap. 3.1.2) ultrasonographisch untersucht. Hierbei wurde der Untersuchung der Leber besondere Beachtung geschenkt. Zum Einsatz kam das Ultraschallgerät OCULUS CS 9100 (Fa. Physia) mit einem 5 MHz Schallkopf. Im Laufe dieser Studie wurden bei den Tieren der Kolonie, bis auf wenige Ausnahmen, zwei Ultraschalluntersuchungen durchgeführt (Tab. 2). Das Tier mit der Nummer 5092 wurde zur Diagnostik auch röntgenologisch untersucht. Die Röntgenuntersuchung wurde am Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen mit dem Röntgengerät ERGOPHOS 4 (Fa. Siemens) durchgeführt (Tab. 2).

3.2.2 Blutuntersuchung

Zur Blutuntersuchung wurde, nach Einsetzen der oben beschriebenen Narkose, Blut aus der *Vena femoralis* in der Schenkelbeuge entnommen.

3.2.2.1 Hämatologische Untersuchungen

Nahezu alle Tiere aus Tabelle 2 (außer die Tiere 9485, 7194 und 5229) wurden untersucht. Als Antikoagulant diente Kalzium-Ethylendiamintetraacetat (Ca-EDTA). Die Proben wurden am selben Tag aufgearbeitet. Für jede Probe wurde ein Differentialblutbild mittels einer Neubauer-Zählkammer erstellt.

3.2.2.2 Serologische Untersuchungen

Soweit möglich wurden alle Tiere serologisch untersucht (Tab. 2). Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Echinokokken des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Zur Anwendung kam ein ELISA, mit dem ein spezieller Echinokokken-Test für Altweltaffen etabliert wurde (TAPPE et al. 2003 a, b). Dazu wurden Seren von drei Altweltaffenspezies (*M. silenus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*) überprüft, die klinische Symptome einer AE aufwiesen. Seren von gesunden Makaken wurden als Negativkontrollen genutzt. Zum Vergleich wurden Seren von bestätigten humanen Fällen einer AE und von gesunden Freiwilligen verwendet. Später wurden alle anderen Tiere der DPZ Kolonien (*M. silenus*, *M. fascicularis*, *M. mulatta*, *Papio hamadryas*) überprüft.

Der ELISA beruht auf dem Prinzip von HELBIG et al. (1993) und JENSEN et al. (2001). Dieser sog. "Gesamtlarven-ELISA" (crude antigen ELISA) ist zur Zeit eine der sichersten Methoden. Der Test hat eine hohe Sensitivität (ca. 95 %), jedoch eine geringe Spezifität (d. h.

er reagiert in etwa gleicher Weise sowohl bei *E. granulosus*-Infektionen, wie auch bei *E. multilocularis*-Infektionen). Auch Kreuzreaktionen mit *Taenia solium*-Infektionen sind nicht auszuschließen, jedoch verbunden mit bildgebenden Verfahren ist eine sichere Differentialdiagnose möglich (Brehm 2003, pers. Mitteilung).

Zunächst wurde eine Antigen-Lösung von homogenisiertem Metazestodenmaterial vorbereitet, das aus mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*) stammte. 30 µl der fertigen Antigen-Lösung wurde auf Mikrotiterplatten über Nacht inkubiert. Die Platten wurden ausgeschlagen, mit Magermilch für 30 min abgesättigt und dreimal mit PBS gewaschen. Das zu untersuchende Serum wurde 1:300 in 2 % Magermilch verdünnt. Davon wurden 30 µl in das Mikrotiterwell pipettiert und für 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Visualisierung von Serumantikörpern, die an die Antigene gebunden waren, erfolgte über Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Peroxidase-Antihuman-Immunglobulin; 60 min Inkubation bei RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS kam ABTS (30 µl) als chromogenes Substrat zum Einsatz. Die resultierende Farbreaktion wurde als Extinktion nach 30 min bei 414 nm im Microtitre-Reader (Dynatec) gemessen. Einen Überblick über den durchgeführten ELISA gibt Abbildung 6.

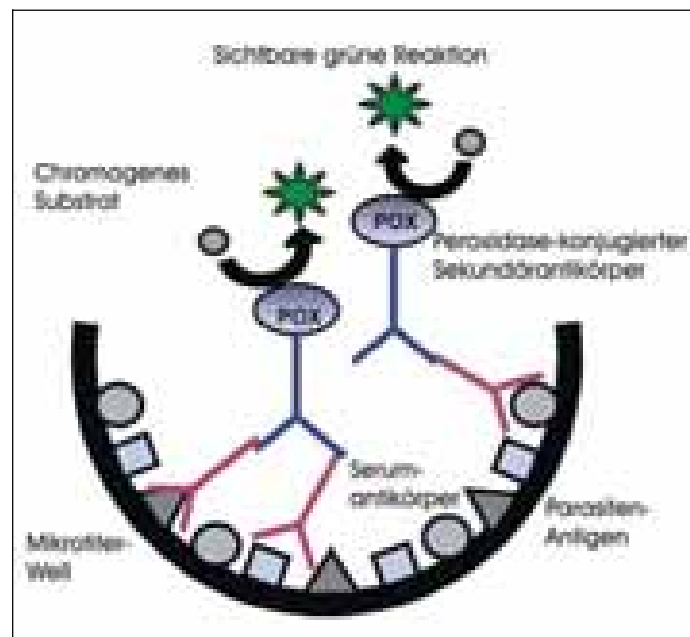


Abb. 6: ELISA zum Nachweis von Anti-*Echinococcus*-Antikörpern im Serum (modifiziert nach TAPPE et al. 2003 a)

3.2.3 Pathomorphologische Untersuchungen

3.2.3.1 Paraffineinbettung

Die Organproben der obduzierten Tiere wurden direkt nach der Entnahme in 10%igem neutral gepufferten Formalin für 24 Stunden fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden sie zugeschnitten und in Einbettkassetten gelegt. Die Paraffineinbettung wurde in einem Einbettautomaten (Hypercenter XP, Fa. Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Im Einbettautomaten wurden die Proben zunächst für 2 Stunden mit entmineralisiertem Wasser bei RT gewässert. Anschließend durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe (50%iges, 70%iges, 80%iges, 96%iges, 96%iges, 100%iges, 100%iges Ethanol für jeweils 45 min bei 35° C) zur Entwässerung. Die Proben kamen dann zweimal für 1,5 bzw. 1 Stunde bei RT und unter Vakuum in das Intermedium Chloroform. Zum Schluß wurden sie zweimal für jeweils 1,5 Stunden bei 60° C unter Vakuum in Paraffin überführt.

3.2.3.2 Anfertigung von Gewebeschnittpräparaten

Die Gewebeschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (Mikrotom HM 400R, Fa. Microm, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Die ca. 3 µm dicken Schnitte wurden mit Hilfe eines in einem Eisbad angefeuchteten Durchschlagpapierstreifens vom Paraffinblock abgenommen und in ein 40° C warmes Wasserbad überführt. Die Schnitte wurden dann auf einen normalen unbehandelten Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 37° C im Wärmeschrank getrocknet und bei RT aufbewahrt.

3.2.3.3 Färbungen für die histopathologische Untersuchung

Die Färbungen erfolgten im Färbeautomat (Varistain Gemini, Fa. Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland) nach dem im Anhang angegebenen Protokoll. Es wurden Hämalaun-

Eosin-Färbungen (H.-E.) durchgeführt, um eine Übersicht zur Morphologie des Gewebestückes zu erhalten. Außerdem wurden weitere Spezialfärbungen durchgeführt. Hierzu gehören die Giemsa-Färbung, die Trichrom-Färbung nach Goldner zur Darstellung von Bindegewebsstrukturen, die Kongorot-Färbung zum Nachweis von Amyloid sowie eine PAS-Reaktion zur Darstellung von neutralen Mukopolysacchariden.

3.2.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Um einen Eindruck von der Echinokokken-Antigenbelastung im Lebergewebe zu bekommen, wurden immunhistochemische Auswertungen an Paraffinschnitten vorgenommen. Zur Anwendung kam die SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Complex). Diese wurde in zwei verschiedenen Techniken durchgeführt. Die manuelle Methode erfolgte unter Anwendung von Peroxidase und DAB (Diaminobenzidin) als chromogenes Substrat. Die andere Technik wurde maschinell unter Verwendung von alkalischer Phosphatase und Fast Red (chromogenes Substrat) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein rabbit Anti-*E. multilocularis* Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 200 bei der manuellen Methode und 1 : 300 bei der maschinellen Methode verwendet. Dieser wurde uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Gottstein, Institut für Parasitologie der Universität Bern, Schweiz, zur Verfügung gestellt. Der Sekundärantikörper wurde jeweils nach Angaben des Herstellers (manuell: DAKO Duett-Kit, Maus/Kaninchen, Hamburg; maschinell: VENTANA Enhanced Biotinylierter Sekundärantikörper) eingesetzt. Die Protokolle der beiden Techniken sind im Anhang (Kap. 9.4) angegeben.

3.2.3.5 Elektronenmikroskopische Präparation

Für die Darstellung von Metazestodengewebe im Elektronenmikroskop wurde das Material nach 24-stündiger Fixation in 2,5%iger gepufferter Glutaraldehydlösung in Epon eingebettet. Die Einbettung in einem Epon-Gemisch nach LUFT (1961, siehe Anhang) erfolgte im Lynx-

Einbettautomaten (Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) nach dem im Anhang angegebenen Protokoll. Die Proben wurden in Einbettungsformen aus Silikongummi eingebettet. Danach schloss sich eine 24-stündige Polymerisation des Epoxidharzes bei 60° C an. Die auspolymerisierten Epon-Blöckchen wurden mit einer Fräse (Reichert, Ultracut S, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) zugetrimmt. Dann wurden von diesen zugetrimmten Blöcken am Ultramikrotom (Reichert, Ultracut S, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) unter Verwendung von Histodiamantmessern (Fa. Diatome, Bienne, Schweiz) 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, nach RICHARDSON et al. (1960, siehe Anhang) gefärbt und nach dem Trocknen mit Eukitt eingedeckt. Die Semidünnschnitte wurden zur Vororientierung lichtmikroskopisch ausgewertet. Nach weiterem Zutrimmen der Blöcke per Hand wurden, unter Verwendung eines Diamantmessers (Fa. Diatome, Bienne, Schweiz), 50-80 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt und auf Lochblenden (single slot 1 x 2, Fa. Plano, Marburg, Deutschland) aufgezogen. Diese wurden dann mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert.

3.2.3.6 Auswertung und Dokumentation

Für die lichtmikroskopische Auswertung und photographische Dokumentation der Gewebepräparate wurde das Mikroskop Axiophot (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) sowie das Computerprogramm analySIS auto (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) und das Filmmaterial Ektachrome 160T Professional (Fa. Kodak, England) sowie AGFAPAN APX 25 (Fa. Agfa-Gevaert AG, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Für die elektronenmikroskopische Analyse wurde das ZEISS-Elektronenmikroskop (EM 10 C, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) genutzt. Zur Photodokumentation wurde Planfilmmaterial und Photopapier (Fa. Agfa, Leverkusen, Deutschland) verwendet.

3.2.4 Genetische Untersuchungen

3.2.4.1 DNA-Isolierung

Isolierung von DNA aus eingefrorenem Vollblut:

Um DNA zu isolieren, wurde bei -20°C eingefrorenes Vollblut (Ausgangsmenge 4,5 ml) zunächst unter leichtem Schwenken aufgetaut. Danach wurde das Blut mit der 9fachen Menge an Lysispuffer versetzt und für 15 min auf Eis unter mehrmaligem Schwenken im -4°C Raum inkubiert. Anschließend wurde es 16 min bei 3200 rpm und 8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zügig abgegossen und das Pellet wurde je nach Größe in einem 3 ml-, 5 ml- oder 10 ml- Verdauansatz resuspendiert. Hierfür wurde das Pellet zunächst in H_2O + STE-Puffer gelöst. Danach wurde unter Schwenken SDS (10 %) und Proteinase K (20 mg/ml) dazugegeben. Die entsprechenden Mengen können aus Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Verdauansatz für unterschiedliche Endvolumina

	3 ml Endvolumen	5 ml Endvolumen	10 ml Endvolumen
$\text{H}_2\text{O}+\text{STE}$	2,05 ml	4,675 ml	9,350 ml
SDS (10 %)	150 μl	250 μl	500 μl
Proteinase K/TE	25 μl	50 μl	100 μl

Die Proben wurden über Nacht bei 56°C in einem Wasserbad und unter mäßigem Schwenken inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zunächst für 15 min auf Eis im Kühlraum gehalten und anschließend mit einem Drittel des Ansatzvolumens mit 6 M NaCl-Lösung versetzt. Nach weiteren 15 min auf Eis im Kühlraum wurden die Proben bei 4000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 96%igem Ethanol (-20°C) auf, je nach Verdauvolumen, 15 ml, 25 ml oder 50 ml aufgefüllt. Die präzipitierte DNA wurde mit einer Pasteurpipette herausgeangelt und dann dreimal mit 80%igem und danach einmal mit 96%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die DNA 30 min bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen getrocknet und dann in TE-Puffer gelöst.

Isolierung von DNA aus gefrorenem Gewebe:

Um DNA auch von den schon verstorbenen Tieren zu gewinnen, wurde auf eingefrorenes Milzgewebe zurückgegriffen. Mit einem sterilen Skalpell wurde ein etwa 20 mg schweres Gewebestück abgetrennt. Dieses Stück wurde dann in 885 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und 50 μl 20 x STE-Puffer gegeben und mit einem Pistill (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) homogenisiert. Danach wurden 50 μl einer 10%igen SDS-Lösung und 30 μl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 56° C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 330 μl 6M NaCl-Lösung zugegeben und der Ansatz bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde nun je einmal mit Isopropanol und 80%igem Ethanol gewaschen. Nach jedem dieser Waschgänge wurde die Probe bei 8000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde dann 30 min bei RT und unter sterilen Bedingungen getrocknet und dann in TE-Puffer aufgenommen.

3.2.4.2 Bestimmung der optischen Dichte

Um die Konzentration der DNA in Lösung zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) gemessen. Dies wurde in einem Photometer (GeneQuant II, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 260 nm durchgeführt. Eine Extinktion von $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Weitgehend reine DNA-Lösungen haben ein $\text{OD}_{260/280}$ -Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 (SAMBROOK et al. 1989).

3.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR ist eine Methode um definierte DNA-Abschnitte in großer Menge zu amplifizieren. Die gesuchten DNA-Abschnitte müssen hierbei zwischen bekannten DNA-Sequenzen liegen. Für die Amplifikation benutzt man Oligonukleotidprimer, die zu den bekannten DNA-Sequenzen komplementär sind. Weiterhin benötigt man Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)

sowie ein geeignetes Puffer-/ DNA-Polymerase-System. Durch eine Temperaturerhöhung auf über 90° C wird die DNA denaturiert. An den DNA-Einzelsträngen lagern sich die Primer an die komplementären Templatesequenzen an (Annealing). Hierfür wird eine für den Primer spezifische Temperatur gewählt, die in der Regel 5-10° C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegt (siehe Kap. 9.2). Die DNA-Polymerase verlängert nun die Primer entlang der Einzelstränge (Elongation). So entstehen wieder DNA-Doppelstränge. In einer weiteren Syntheserunde (Zyklus) werden diese Doppelstränge wieder aufgetrennt, und durch Anlagerung von Primern beginnt die erneute Synthese von DNA. Theoretisch entsteht bei jedem Synthesesyklus die doppelte Menge DNA.

Alle PCR-Ansätze sind unter streng sterilen Bedingungen hergestellt worden, da die PCR eine hohe Sensitivität besitzt und sehr anfällig für Kontaminationen ist. So wurde die DNA-Isolierung, das Ansetzen der Proben und der PCR-Reaktion sowie die Amplifikation räumlich getrennt durchgeführt. Alle Arbeiten wurden an Sterilarbeitsplätzen durchgeführt, und es wurden grundsätzlich nur sterile Lösungen und Einwegartikel benutzt.

Amplifizierung von MHC-Klasse-II-DRB-Sequenzen:

Um für die Charakterisierung der *DRB*-Sequenzen ausreichend Material zu erhalten, mussten diese durch Amplifizierung vervielfacht werden. Für die PCR-Reaktionsansätze wurden jeweils Volumina von 100 µl angesetzt. Verwendet wurden 50-120 ng DNA, jeweils 50 pmol Primer (5'MDRB und 3'MDRBR+GC) (siehe Kap. 9.2), 200 µM dNTPs, 1x PCR-Puffer, 1x Q-Solution und 5 U Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Ansätze wurden anschließend mit Paraffinöl überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte in 31 Zyklen in UNO II PCR-Thermocyclern (Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland). Die DNA wurde zuerst bei 94° C für 3 min denaturiert. Darauf folgten 31 Zyklen mit 94° C für 30 Sekunden (Denaturierung), 60° C für 30 Sekunden (Annealing) und 72° C für 36 Sekunden (Elongation). Zum Schluß folgte noch ein weiterer Elongationsschritt bei 72° C für 2 min. Die Proben wurden in einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.4.4) analysiert und konnten nun für die DGGE genutzt werden (siehe Kap. 3.2.4.5).

Sequenzierungs-PCR:

Um Proben für die Sequenzierung herzustellen, wurden PCR-Reaktionsansätze mit einem Volumen von jeweils 50 µl angesetzt. Hierbei wurden 5 µl des bei der DGGE gewonnenen Eluats (siehe 3.2.4.5), je 12,5 pmol Primer (5'MDR-M13 und 3'MDR-rev.) (siehe Kap. 9.2), 200 µM dNTPs, 1x PCR-Puffer und 1 U Taq Polymerase (Biometra Dynazyme, Göttingen, Deutschland) verwendet. Die Ansätze wurden mit Paraffinöl überschichtet. Die initiale Denaturierung erfolgte für 3 min bei 94° C. Die DNA-Amplifizierung erfolgte über 30 Zyklen bei 94° C für 20 Sekunden (Denaturierung), 60° C für 30 Sekunden (Primeranlagerung) und 72° C für 36 Sekunden (Elongation), gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt bei 72° C für 2 min. Anschließend wurde jede Probe in einer Agarosegelelektrophorese analysiert und gereinigt (siehe Kap. 3.2.4.6). Zur Sequenzierung wurden jeweils 250 ng PCR-Produkt mit 10 pmol M13-forw. bzw. -rev.-Primer (siehe Kap. 9.2) versetzt und an die Fa. Seqlab (Göttingen, Deutschland) verschickt.

PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP):

Zum Nachweis einzelner *DRB*-Sequenzen wurden allelspezifische Primer konstruiert. Als Positivkontrolle wurde jeweils DNA von einem Tier verwendet, bei dem das entsprechende Allel durch DNA-Sequenzierung bereits nachgewiesen war. Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von jeweils 25 µl und enthielten 50-120 ng DNA, 200 µM dNTPs, 1x PCR-Puffer, 2 pmol 3'Aktin, 2 pmol 5'Aktin, 2,5 U taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) und je 20 pmol Primer (*DRB*-sequenzspezifisch). Die Primer sind im Anhang (siehe Kap. 9.2) aufgeführt. Die Ansätze wurden mit Paraffinöl überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte wieder in einem UNO II PCR-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 94° C für 3 min und 37 Zyklen mit 94° C für 30 Sekunden, 58°-60° C (siehe Kap. 9.2) für 30 Sekunden und 72° C für 36 Sekunden, gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt für 2 min bei 72° C. Danach wurden die DNA-Sequenzen in einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Um die amplifizierten DNA-Fragmente zu trennen und zu identifizieren, wurden die PCR-Produkte auf horizontale Agarosegele aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Die Agarosegele enthielten 1 % Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) in TBE-Puffer und zur Anfärbung der DNA wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (0,1 % pro 100 ml Gelvolumen) hinzugegeben. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/5 ihres Volumens Probenpuffer versetzt. Als Längenstandard wurde 1 µg 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Gaitersburg, USA) in Probenpuffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 130 V in einer Horizontalelektrophoresekammer (Renner, Dannstadt, Deutschland). Als Laufpuffer wurde 1x TBE benutzt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe (Saur, Reutlingen, Deutschland) bei 254 nm sichtbar gemacht. Mit einem Bildverarbeitungssystem (EagleEye, Stratagene, La Jolla, USA) wurden die Ergebnisse dokumentiert.

3.2.4.5 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die in der PCR amplifizierten *DRB*-Sequenzen (2. Exon) wurden in einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) aufgetrennt, um eine Unterscheidung von individuellen Allelen zu gewährleisten. Die DGGE ist eine elektrophoretische Methode, um Polymorphismen innerhalb genomischer DNA nachzuweisen. Jedes Allel eines bestimmten Locus ist ungefähr gleich lang und durch eine Längenauftrennung nicht zu unterscheiden. Bei der DGGE dagegen werden die Allele aufgrund von Unterschieden in ihren Sequenzen getrennt. Durch die Sequenzunterschiede haben die DNA-Fragmente unterschiedliche Schmelztemperaturen (MÜLHARDT 2000). Während des Gellaufs in einem denaturierenden Gradienten wird die doppelsträngige DNA partiell aufgeschmolzen. Die teilgeschmolzenen DNA-Fragmente zeigen dann bei der Elektrophorese eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im Gel. Die DNA wird dadurch in Fragmente gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz aufgetrennt. Eine verbesserte Auftrennung wird dadurch

erreicht, dass man einen Bereich mit einer deutlich höheren Schmelztemperatur künstlich anfügt, da dieser Bereich beide DNA-Stränge zusammenhält, während andere Bereiche gerade schmelzen. Dies wurde mit einer sogenannten GC-Klammer erreicht, einer G- und C-reichen Region, die an einen der beiden PCR-Primer am 5'-Ende angefügt ist.

Die DGGE wurde in dieser Studie nach einem von KNAPP et al. (1997) und KHAZAND et al. (1999) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Polyacrylamidgel mit einem linearen Gradienten an denaturierenden Reagenzien (Formamid und Harnstoff). Zusätzlich wird das Gel bei einer konstant erhöhten Temperatur gefahren, was die Denaturierung erleichtert. Für die DGGE wurde das DC-Code System (Biorad, München, Deutschland) verwendet.

Es wurden Gele mit 9 % Acrylamidanteil (37,5:1 Acrylamid:Bis-Acrylamid) und einem Gradienten von 40-55 % denaturierender Reagenzien (100 % denaturierende Reagenzien: 7 M Harnstoff und 40 % Formamid) verwendet. Das Volumen der Probe pro Geltasche war je nach Ausgangsmaterial verschieden. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurden sie mit DGGE-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Gellauf erfolgte über 9 h bei 130 V und 60° C mit 1x TAE als Laufpuffer. Die getrennten DNA-Fragmente wurden mit der SYBRTM-Green-Färbung sichtbar gemacht. Der Farbstoff SYBRTM-Green wurde anstelle von Ethidiumbromid verwendet, da er eine höhere Empfindlichkeit besitzt. Das Gel wurde zur Färbung in einer 1:10000 SYBRTM-Green-/1x TAE-Puffer-Lösung für 30 min inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden mit einer UV-Lampe (Saur, Reutlingen, Deutschland) bei 312 nm sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden mit dem Bildverarbeitungssystem (EagleEye, Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert, und anschließend wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in 50 µl H₂O über Nacht bei RT eluiert.

3.2.4.6 Reinigung von PCR-Produkten

Nach der Sequenzierungs-PCR (siehe Kap. 3.2.4.3) wurden die DNA-Fragmente gereinigt. Hierfür wurden Microcon-Zentrifugen-Filtereinheiten der Firma Millipore (Bedford, USA)

verwendet. Die Reinigung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit und die Menge der gewonnenen DNA wurde mit einer weiteren Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.4.7 Sequenzierung, Auswertung und Registrierung der DNA-Sequenzen

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden dann mit in der GenBank veröffentlichten Sequenzen mittels Blastsearch verglichen (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Sequenzen wurden mit den Programmen Dnasis (Hitachi Software, Olivet Cedex, Frankreich), Bioedit (Tom Hall, Dep. of Microbiol. North Carolina State University; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) und Treepuzzle 5.0 (www.tree-puzzle.de) untereinander verglichen und ausgewertet.

Alle Allele wurden im MHC Primate Register registriert. Weiterhin wurden alle Allele in die Genbank aufgenommen (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die "Accession"-Nummern sind in Tabelle 7 aufgelistet.

4 Ergebnisse

Die drei an Echinokokkose erkrankten Bartaffen der DPZ-Kolonie zeigten im klinischen Bild keine besonderen Auffälligkeiten. Das einzige (auffällige) Merkmal war in allen drei Fällen eine Umfangsvermehrung des Abdomens, die bei Tier 5006 mit einer Trächtigkeit verwechselt wurde. Dieses Tier zeigte bis auf eine Inkontinenz keine weiteren auffälligen Symptome und wurde zur Durchführung eines Kaiserschnittes sediert. Hierbei kam es zur Diagnose der AE. Die AE wurde bei Tier 5092 als Zufallsbefund während einer ultrasonographischen Untersuchung diagnostiziert. Bei Tier 6434 wurde die AE ebenfalls zufällig durch Palpation während der Kastration und anschließend ultrasonographisch festgestellt. Das Tier wurde daraufhin genauer beobachtet und zeigte trotz der faustgroßen Umfangsvermehrung im Bauchbereich keine weiteren Symptome. Drei Monate später waren die Zysten stark gewachsen, das Tier stark abgemagert und es befanden sich Wasseransammlungen in Hoden und Beinen. Die Tiere wurden aufgrund einer infausten Prognose euthanasiert und ausführlichen pathomorphologischen Untersuchungen unterzogen. Im Folgenden erfolgt eine Darstellung der verschiedenen diagnostischen Verfahren, die im Rahmen der Untersuchungen in der Kolonie durchgeführt wurden.

4.1 Bildgebende Verfahren

4.1.1 Röntgen

Nur bei einem Tier (5092) war eine Röntgenuntersuchung zum Zeitpunkt der Erkrankung möglich. Dabei stellte sich die abdominale, kindskopfgroße Umfangsvermehrung als auffälliges, optisch dichtes Gewebe dar. Dieser erstaunliche Befund wies auf kalzifizierende Strukturen im Bereich der Leber hin. Obwohl punktuell unterschiedliche Aufhellungen zu erkennen waren, zeigten sich keine zystischen Formationen (Abb. 7).



Abb. 7: Laterolaterale Röntgenaufnahme von Tier 5092

4.1.2 Ultraschall

Alle Tiere der Bartaffenkolonie des DPZ wurden einmal oder mehrmals ultrasonographisch untersucht (Tab. 2). Mit besonderer Aufmerksamkeit wurde nach zystenartigen Strukturen gesucht. Trotz intensiver Suche ließen sich derartige pathologische Veränderungen in keinem Fall beobachten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass von den untersuchten Tieren keines klinisch an einer AE erkrankt war. Auch bei Tier 1252, das serologisch Antikörper gegen *E. multilocularis* aufwies (Kap. 4.2.2), zeigten sich keine Abweichungen von der Norm.

4.2 Blutuntersuchung

Nahezu alle Tiere der Bartaffen-Kolonie wurden im Zuge der jährlichen Gesamtuntersuchung auch einer Blutuntersuchung unterzogen. Hierbei wurde ein Differentialblutbild angefertigt sowie eine serologische Untersuchung durchgeführt.

4.2.1 Hämatologische Untersuchungen

Im Differentialblutbild (Tab. 4) zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen den Blutparametern und einer Echinokokkeninfektion. Da nur bei einem serologisch positiven Tier (Kap. 4.2.2) ein Differentialblutbild angefertigt wurde und in diesem keine besonderen Veränderungen der Blutparameter festgestellt werden konnten, konnte somit keine Aussage über typische hämatologische Merkmale bei AE-positiven Bartaffen gemacht werden. Bei den AE-negativen Tieren entsprachen die Differentialblutbilder der Norm. Die segmentkernigen Granulozyten waren bei einigen Tieren (1252, 8113) leicht erhöht. Bei dem serologisch positiven Tier mit der Nummer 1252 lagen die Werte für eosinophile Granulozyten im Normalbereich.

Tabelle 4: Differentialblutbild der Bartaffenkolonie des DPZ

Name	Tier-Nr.	Eryt. (10 ⁶ /µl)	Leukoz./ µl	Stab. (%)	Seg. (%)	Eosin. (%)	Mono. (%)	Lymph. (%)	HK (%)	Hb (g/dl)	MCH (pg)	MCV (µm ³)
Marina	1252	4,9	6050		84	1		15	40	13,3	27,1	81,6
Ronja	6433	5,2	6150		60	2		38	38	10,7	20,5	73
Jette	8113	5,375	11200	2	88			10	42	10,6	19,7	78,2
Michel	8295	5,25	9250	1	79		2	18	40	11,9	22,7	76,2
Trixi	9838	7,47	9800	2	73		3	22	36	10,9	14,6	48,2
Nadak	9837	6,15	6550		77			23	42	12,5	20,3	68,3
Stina	11175	6,95	9400		51	1		48	40	12,5	20	57,9
Skrolan	11439	6,5	7700		49			51	40	11,1	17,1	61,5

4.2.2 Serologische Untersuchungen

Bei den serologischen Untersuchungen traten folgende Veränderungen auf: Die nachweislich an AE erkrankten und verstorbenen Tiere mit den Nummern 5006 und 5092 (Tab. 2) zeigten bei der serologischen Untersuchung ein positives Ergebnis und konnten somit als Positivkontrolle verwendet werden. Von den anderen lebenden Bartaffen der DPZ-Kolonie (Tab. 2) konnten nur bei Tier Nr. 1252 Antikörper gegen *E. multilocularis* nachgewiesen werden. Alle anderen zeigten ein negatives Ergebnis (siehe Tab. 5). Von dem dritten an einer

AE erkrankten und verstorbenen Tier (Heinrich, 6434) war keine Blutuntersuchung einschließlich Serologie möglich.

Tabelle 5: Ergebnisse der serologischen Untersuchung

Name	Tier-Nr.	positiv	negativ	Bemerkungen
Marina	1252	x		am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Ronja	6433		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Jette	8113		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Michel	8295		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Nadak	9837		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Trixi	9838		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Stina	11175		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Skrolan	11439		x	am 28.02.2004 ohne klin. Hinweise auf AE
Pelle	7194		x	während der Studie abgegeben
Krishna	5229		x	während der Studie abgegeben
Mahi	9485		x	verstorben an Bissverletzung, keine AE
Ida	5092	x		an Echinokokkose erkrankt und verstorben
Hanna	5006	x		an Echinokokkose erkrankt und verstorben
Heinrich	6434			an Echinokokkose erkrankt und verstorben

4.3 Pathologie

4.3.1 Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchungen

Die Tiere mit den Nummern 5006, 5092 und 6434 (Tab. 2) wurden euthanasiert und danach einer ausführlichen pathomorphologischen Untersuchung unterzogen.

Bei Tier **5006** wurde eine 23 x 19 x 17 cm große speckig-graue, gelbliche, zystische Masse in der Bauchhöhle gefunden. Diese war mit dem rechten Leberlappen verbunden. Der linke Leberlappen stellte sich als eine 8 x 9 x 5 cm große, speckige, multizystische Struktur dar. Die restlichen Teile der Leber zeigten sich durchzogen mit multiplen, linsenkopfgroßen, z. T. konfluierenden Echinokokkenzysten. Die Ileocaecal-, Pankreas-, Aorten- und Nierenlymphknoten waren hochgradig vergrößert und speckig. Das gesamte Netz war

durchsetzt mit linsen- bis erbsenkopfgroßen, gelblich-speckigen tumorähnlichen Gebilden. Die zystischen Gebilde enthielten z. T. honigartiges, gelierendes Material, an anderen Stellen aber auch wasserklare Flüssigkeit.

Das Tier **5092** zeigte bei der Sektion im Bereich der Bauchhöhle ein von der Leber ausgehendes, rundes Zystengebilde mit einem Gewicht von 1900 g (Abb.8/A). Diese Zystenbildung betraf hauptsächlich den linken Leberlappen. Das Leberparenchym zeigte sich hochgradig druckatrophisch und die Gallenblase war gestaut. Die Zystenwand bestand aus ausgeprägten Bindegewebeanteilen. Miliare Knötchen- und Blasenbildungen gingen von der Zystenwand aus. Der Zysteninhalt war flüssig und mit Hydatidensand durchsetzt. Die benachbarten Lymphknoten (*Ln. hepaticus*, *Ln. pancreaticus*) waren hyperplastisch. In der Bauchhöhle wurde eine geringgradige seröse Peritonitis diagnostiziert. Die Echinokokkose hatte in diesem Fall zu einer fast vollständigen Atrophie des linken Leberlappens geführt.

Tier **6434** zeigte eine hochgradige Ödematisierung der Unterhaut. Die Haut im Bereich des Abdomens war in der Umgebung der von außen deutlich sichtbaren Umfangsvermehrung der Bauchhöhle fibrotisch und mit der Bauchdecke verwachsen. Nach Eröffnung der Brusthöhle zeigte sich ein milchig-wässriger Pleuraerguss sowie Verwachsungen und Verklebungen zwischen *Sternum*, *Pleura pulmonalis* und einer ca. 6 cm im Durchmesser messenden Umfangsvermehrung. Diese ging vom Mediastinum aus, hatte eine gekammerte Struktur und komprimierte den rechten Hauptlappen der Lunge. Auf der Schnittfläche stellte sie sich kleinzystisch dar. Die Lunge zeigte ein mittelgradiges alveoläres Ödem, ein mittelgradiges alveoläres Emphysem sowie eine Druckatelektase des rechten Hauptlappens. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde eine ausgeprägte seröse Peritonitis festgestellt. Außerdem wurden multiple Zystenbildungen besonders im Bereich der gesamten Leber diagnostiziert. Diese bestanden aus multiplen, viel- und kleinblasigen, infiltrativ in das Lebergewebe einwachsenden Zystenstrukturen unterschiedlicher Größe. Diese Zystenstrukturen bildeten eine Art Schlauchsystem im Leberparenchym (Abb. 8/B). Vom Leberhilus ging eine gut abgegrenzte, 20 cm im Durchmesser messende Echinokokkenzyste aus, die ein Gewicht von 1100 g hatte und von einer dicken Zystenwand umgeben war. Von dieser Zystenwand gingen miliare Knötchen und Blasen aus. Der Inhalt der Zysten war flüssig und mit Hydatidensand

durchsetzt. Es wurde eine eigene Gefäßversorgung nachgewiesen. Das Leberparenchym war druckatrophisch und die Leber war auf der ganzen Fläche unlösbar mit dem Zwerchfell verwachsen. Die benachbarten Lymphknoten sowie alle anderen Lymphknoten im Bauchbereich waren hyperplastisch und ödematisiert. Ein weiteres Echinokokkengranulom wurde im Bereich des großen Netzes nachgewiesen. Dieses war mit Ileum- und Caecumanteilen verwachsen und verklebt. Auch in diesem Fall konnte eine Echinokokkose mit systemischer Ausbreitung festgestellt werden. Die Echinokokkose hatte die gesamte Leber diffus durchwachsen und zur vollständigen Atrophie des linken Leberlappens und großer Teile des Hauptlappens geführt. Über Abklatschmetastasen im Bereich des Zwerchfells auf der Lungenseite hatte sich die Echinokokkose auch in die Brusthöhle ausgedehnt.

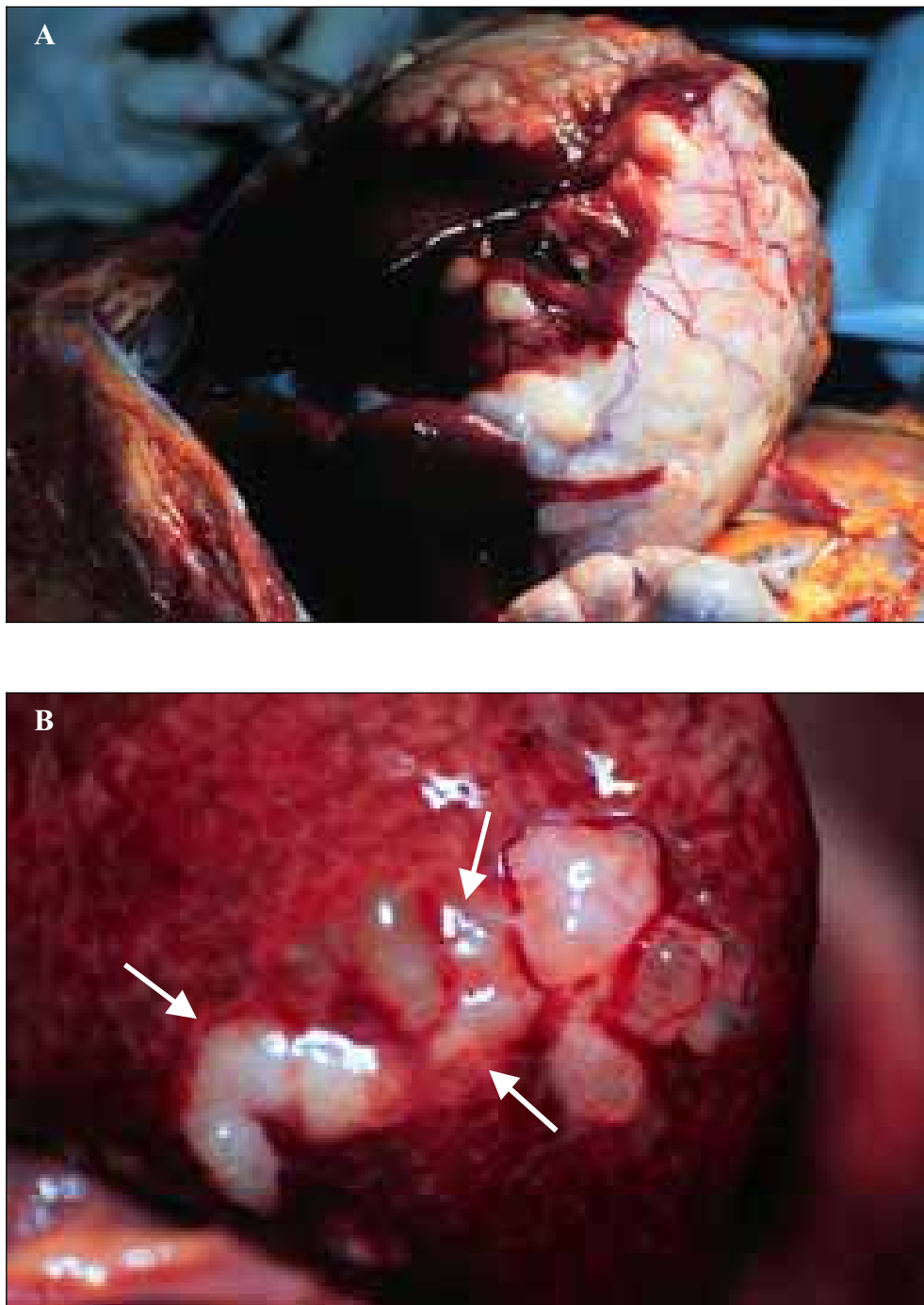


Abb. 8:

A: Hochgradiger Umbau der Leber im Rahmen einer Echinokokkose (Tier Nr. 5092).
B: Bei stärkerer Vergrößerung zeigen die Zysten die für *E. multilocularis* typische Schlauchstruktur (Pfeile); (Tier Nr. 6434).

Die pathologischen Befunde deuteten auf eine alveoläre Echinokokkose in allen drei Fällen hin. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Zoologie der Universität Hohenheim wurde zur Diagnosesicherung eine *Echinococcus multilocularis*-spezifische nested PCR durchgeführt (DINKEL 1998). Diese bestätigte die Diagnose der alveolären Echinokokkose bei allen drei Tieren. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis dieser PCR.

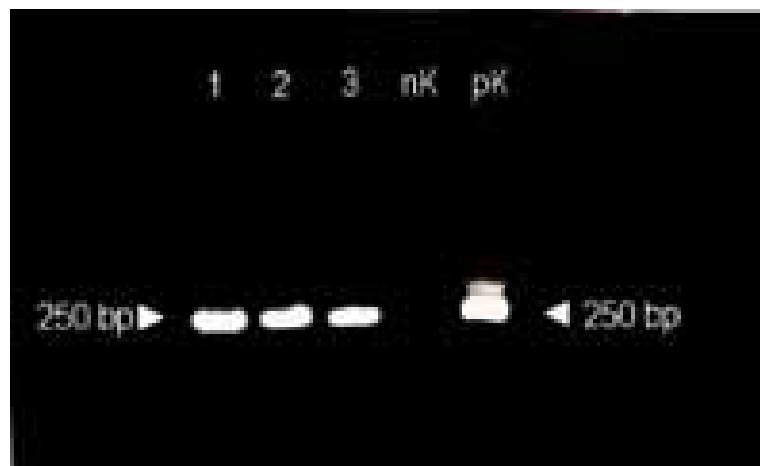


Abb. 9: Spur 1: Tier 5006; Spur 2: Tier 5092; Spur 3: Tier 6434;
nK: negative Kontrolle; pK: positive Kontrolle

4.3.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Bei allen drei Tieren wurde ein breites Organspektrum histologisch ausgewertet. Dabei fanden sich vergleichbare Veränderungen bei allen drei Tieren. Unterschiede zeigten sich im Grad der Ausdehnung der Veränderungen und der Organmanifestation (Tabelle 6).

Typisches Metazestodengewebe fand sich bei Tier **5006** in Leber und Mesenteriallymphknoten. Es bestand besonders im Bereich der **Leber** aus unterschiedlich großen Zystenstrukturen, die von einer lamellaren Zystenwand umsäumt wurden. Kleine Zystenanteile erschienen leer, größere Zystenstrukturen wiesen dagegen im Inneren Zelldetritus, großflächige Nekrosenbezirke und Verkalkungen auf. Ausschließlich in der

Leber wurden lebensfähige Protoskolizes nachgewiesen, die teilweise von Brutkapseln umgeben waren. Alle anderen Zysten waren steril. Im Randbereich der Zysten konnten eine hochgradige Fibrose und Granulationsgewebekonstruktion vom Fremdkörpertyp mit Beteiligung von multinukleären Riesenzellen nachgewiesen werden (Abb. 10/A u. B, 11/B). Große Teile der Leber wiesen eine totale Fibrose auf. Im Bereich der Zysten ließen sich teilweise starke Verkalkungen sowie Kalkkörperchen beobachten (Abb. 11/B). Die Zystenstrukturen im Bereich der **Mesenteriallymphknoten** wiesen eine hochgradige gemischtzellige Entzündungszellreaktion mit starker Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen auf. Die Hauptbefunde bei diesem Tier sprechen für eine alveoläre Echinokokkose im Bereich der Leber und der angrenzenden Lymphknoten.

Tier **5092** wies in der Leber und in den regionären Lymphknoten (*Ln. hepaticus*, *Ln. pancreaticus*) typisches Metazestodengewebe auf. Das **Leberparenchym** war im Bereich der Zystenstrukturen großflächig zerstört (Abb. 11/A). Weiterhin wurden multifokal ein hochgradiges periportales gemischtzelliges Entzündungszellinfiltrat sowie diffuse Einzelzellnekrosen beobachtet (Abb. 12/B). In der Zystenperipherie konnte infiltratives Wachstum in das angrenzende Leberparenchym dargestellt werden. Das an die Zysten angrenzende Gewebe zeigte eine Granulationsgewebereaktion, charakterisiert durch die Ausbildung einer Fibrose und begleitet von einer gemischtzelligen Entzündungszellreaktion mit Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen. Fibröse hyaline Membranen grenzten die Zystenräume ab. Die Mehrzahl der Zysten war leer oder kollabiert, in anderen wurden zahlreiche Protoskolizes nachgewiesen. Bei den **Leberlymphknoten** wurden eine ausgeprägte folliculäre und parakortikale Hyperplasie sowie fokal sterile Echinokokkenzysten im Markbereich diagnostiziert. Im Randgebiet dieser Zystenstrukturen konnten ebenfalls die Ausbildung einer hochgradigen Fibrose mit Entzündungszellreaktionen unter Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen sowie mehrere Verkalkungszonen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein abgegrenzt wachsendes, solitäres Metazestodengewebe festgestellt, welches im Inneren einen multizystisch gekammerten, stark septierten Aufbau zeigte. Großflächige Nekroseareale und Verkalkungszonen wurden in nahezu allen zystisch veränderten Bereichen nachgewiesen (Abb. 11/A). Die histologischen Befunde bei Tier 5092 entsprechen dem Bild einer alveolären Echinokokkose im Bereich der Leber und der regionären Lymphknoten.

Metazestodengewebe fand sich bei Tier **6434** im Bereich von Leber und Mesenterium, aber auch im Bereich von Mediastinum, Herz und Lunge. Große Teile der **Leber** wiesen hochgradige Hämorrhagien und Nekrosen auf. In diesen Bereichen war das Lebergewebe so stark transformiert, dass nur noch vereinzelt Leberzellen zu erkennen waren. In anderen Bereichen der Leber ließen sich multifokal periportale gemischtzellige Entzündungszellinfiltrate nachweisen. Beobachtet wurden weiterhin diffuse Einzelzellnekrosen. Die Leberzellen in der Nähe des Metazestodengewebes waren komprimiert und grenzten an das die Parasitenstruktur umgebende Bindegewebe (Abb. 12/A). In diesen Bereichen kam es auch zur Ausbildung eines chronischen Granulationsgewebes mit Entzündungszellinfiltrationen unter Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen. Zusätzlich lagen Sprossungen der germinativen Schicht vor (Abb. 13/A). Auch im Bereich des **Perikards** ließ sich fokal Granulationsgewebe darstellen. Hier konnten auch vereinzelt Echinokokkenzystenanteile nachgewiesen werden. Weiterhin wurden multiple, abgegrenzt wachsende, solitäre Metazestodenstrukturen im Bereich von Leber, Mesenteriallymphknoten und Lunge beobachtet. Diese zeigten im Inneren eine multizystisch gekammerte und stark septierte Struktur (Abb. 13/A u. B). Großflächige Nekroseareale und Verkalkungszonen sowie fibröse hyaline Membranen, die die Zystenräume abgrenzten, wurden nachgewiesen und stellten sich durch eine PAS-Reaktion besonders gut dar (Abb. 13/A u. B). Die Mehrzahl der Zysten war leer oder kollabiert, in einzelnen wurden zahlreiche Protoskolizes und Brutkapseln nachgewiesen (Abb. 12/A, 13/A u. B, 14/A-D, 15/B). Weiterhin wurden in vielen Zysten Kalkkörperchen beobachtet (Abb. 12/A). In der **Lunge** wurde neben einem ausgeprägten alveolären Ödem auch ein alveoläres Randemphysem sowie diffuse Hyperämien und fokale Blutungen festgestellt. Fokale perivaskuläre lymphohistiozytäre Zellinfiltrate waren ebenfalls im Lungenparenchym darstellbar. Die **Mesenteriallymphknoten** zeigten im Follikelzentrum multifokal einzelne mehrkernige Riesenzellen sowie diffuse Hyperämien. Die histologischen Befunde ergaben im Fall von Tier 6434 eine hochgradige AE. Leber, Mesenterium und Lunge waren hier am massivsten betroffen.

Durch die PAS-Reaktion ließen sich die Laminarschichten der Zystenwände besonders gut darstellen (Abb. 13/A u. B), was auf den hohen Gehalt an neutralen Mukopolysacchariden in diesem Bereich zurückzuführen ist. Unter Kongorotfärbung wurden in den Zystenwänden

vereinzelt rotgefärbte Strukturen erkennbar, die im Polarisationsmikroskop eine leichte Doppelbrechung aufwiesen. Die überwiegenden Teile der Präparate waren jedoch negativ und ließen somit keine Schlussfolgerungen auf verstärkte Amyloidablagerungen im Zystenbereich zu.

Tabelle 6: Organverteilung der pathologischen Veränderungen

Lokalisation	Tier Nr. 5006	Tier Nr. 5092	Tier Nr. 6434
Leber	x	x	x
Mesenterium	x	x	x
Mediastinum			x
Lunge			x
Herz			x
<i>Lnn. hepatici</i>	x	x	x
<i>Lnn. mesenteriales</i>	x	x	x
<i>Lnn. pancreatici</i>		x	
<i>Lnn. pulmonales</i>			x

4.3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Mit Hilfe der Immunhistochemie ließ sich die parasitäre Antigenbelastung einer alveolären Echinokokkose spezifisch nachweisen (Abb. 15/A u. B). Positive Reaktionen ließen sich besonders im Bereich der germinativen Schicht und der Protoskolizes beobachten. In der manuell durchgeführten Methode, unter Verwendung von Peroxidase und DAB, stellten sich die positiven Bereiche braun dar. In der automatisch durchgeführten Technik, mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase und Fast Red, waren die positiven Bereiche rot angefärbt (Abb. 15/A u. B). Mit Hilfe der Immunhistochemie ließen sich frühe Infiltrationen parasitärer Strukturen in das umliegende Gewebe lichtmikroskopisch eindeutig nachweisen (Abb. 15/A), so dass diese Technik besonders geeignet ist, in sehr frühen Stadien eine Infektion mit Echinokokken zu detektieren.

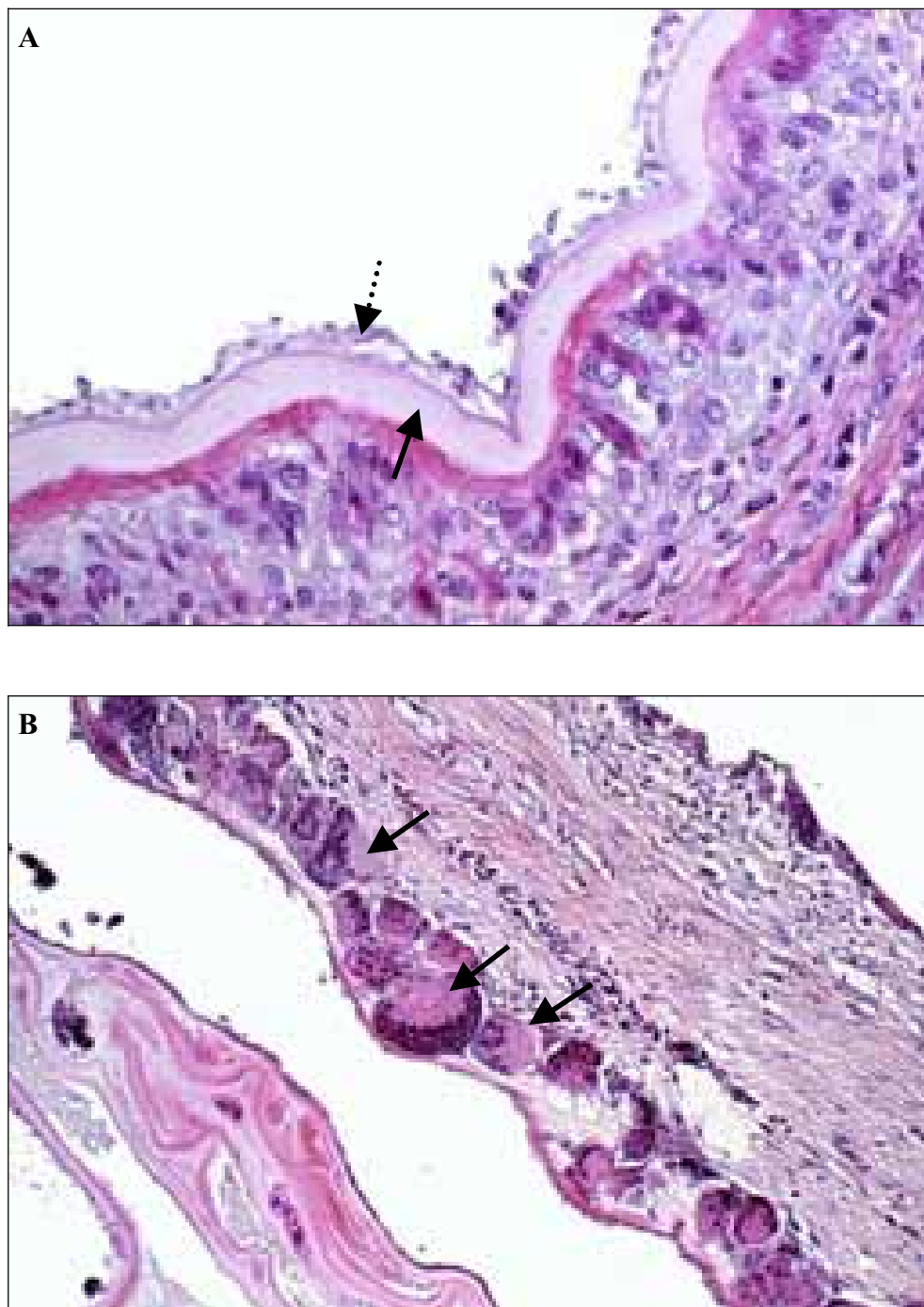


Abb. 10:

A: Lichtmikroskopisch werden die Zysten von einer germinativen (unterbrochener Pfeil) und einer Laminarschicht (durchgehender Pfeil) ausgekleidet (Tier Nr. 5006, H.-E. Färbung, Vergr. 376x).

B: Weiterhin finden sich in der Umgebung der Zysten verschiedene Entzündungszellen einschließlich Fremdkörperriesenzellen (Pfeile); (Tier Nr. 5006, H.-E. Färbung, Vergr. 188x).



Abb. 11:

A: Verkalkende Protoskolizes (Pfeile) innerhalb von Zystenstrukturen der Leber (Tier Nr. 5092, H.-E. Färbung, Vergr. 94x).

B: Fremdkörperriesenzellen (kleine Pfeile) und Verkalkungen (große Pfeile) im Bereich einer Zyste; das angrenzende Gewebe zeigt eine starke Fibrose (Tier Nr. 5006, H.-E. Färbung, Vergr. 94x).

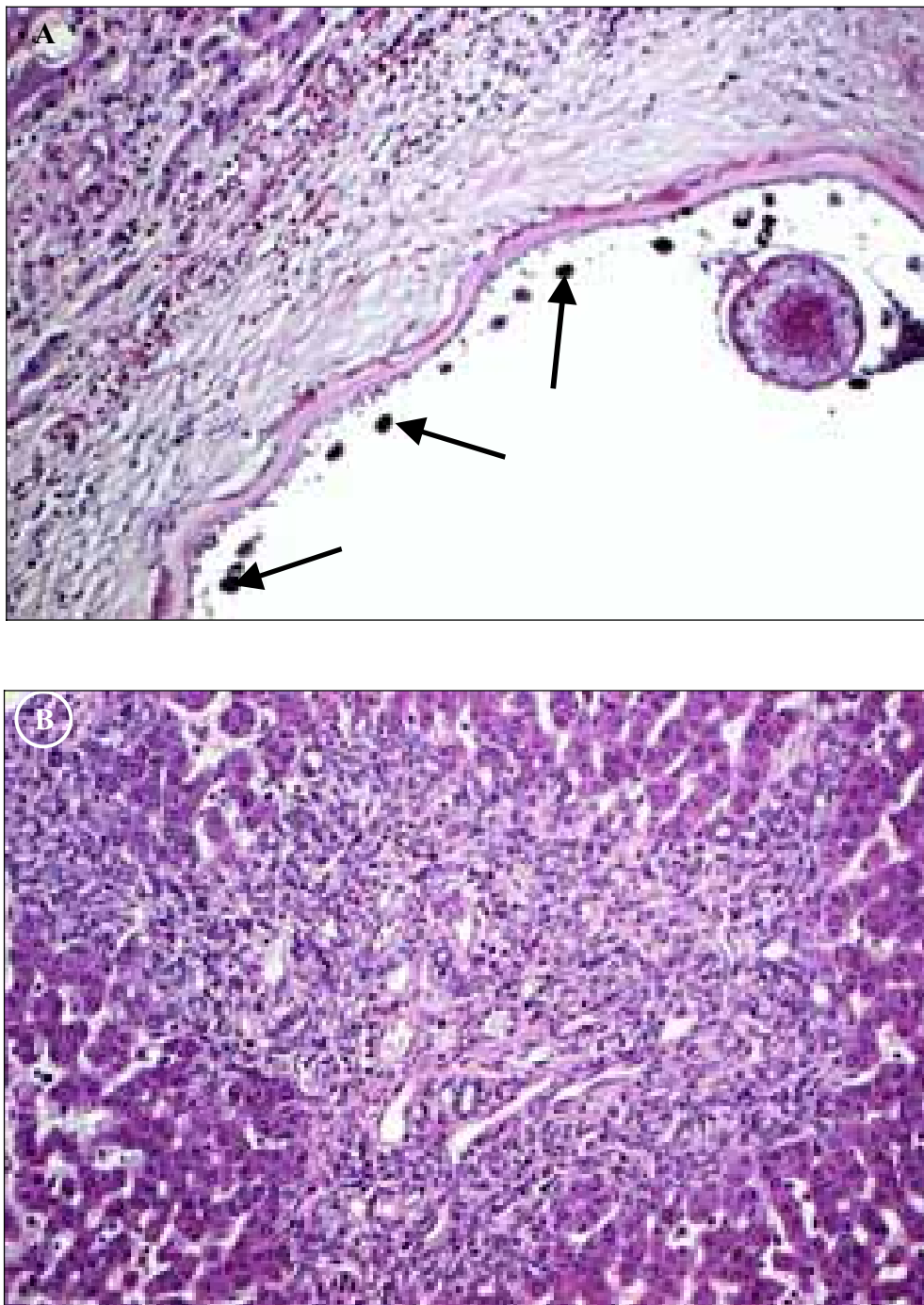


Abb. 12:

A: Zyste mit Protoskolex, Kalkkörperchen (Pfeile) und untergehendem Lebergewebe (Tier Nr. 6434, H.-E. Färbung, Vergr. 188x).

B: Im angrenzenden Lebergewebe zeigen sich verschiedene Veränderungen. Dazu gehören auch periportale gemischtzellige Entzündungszellinfiltrationen (Tier Nr. 5092, H.-E. Färbung, Vergr. 188x).

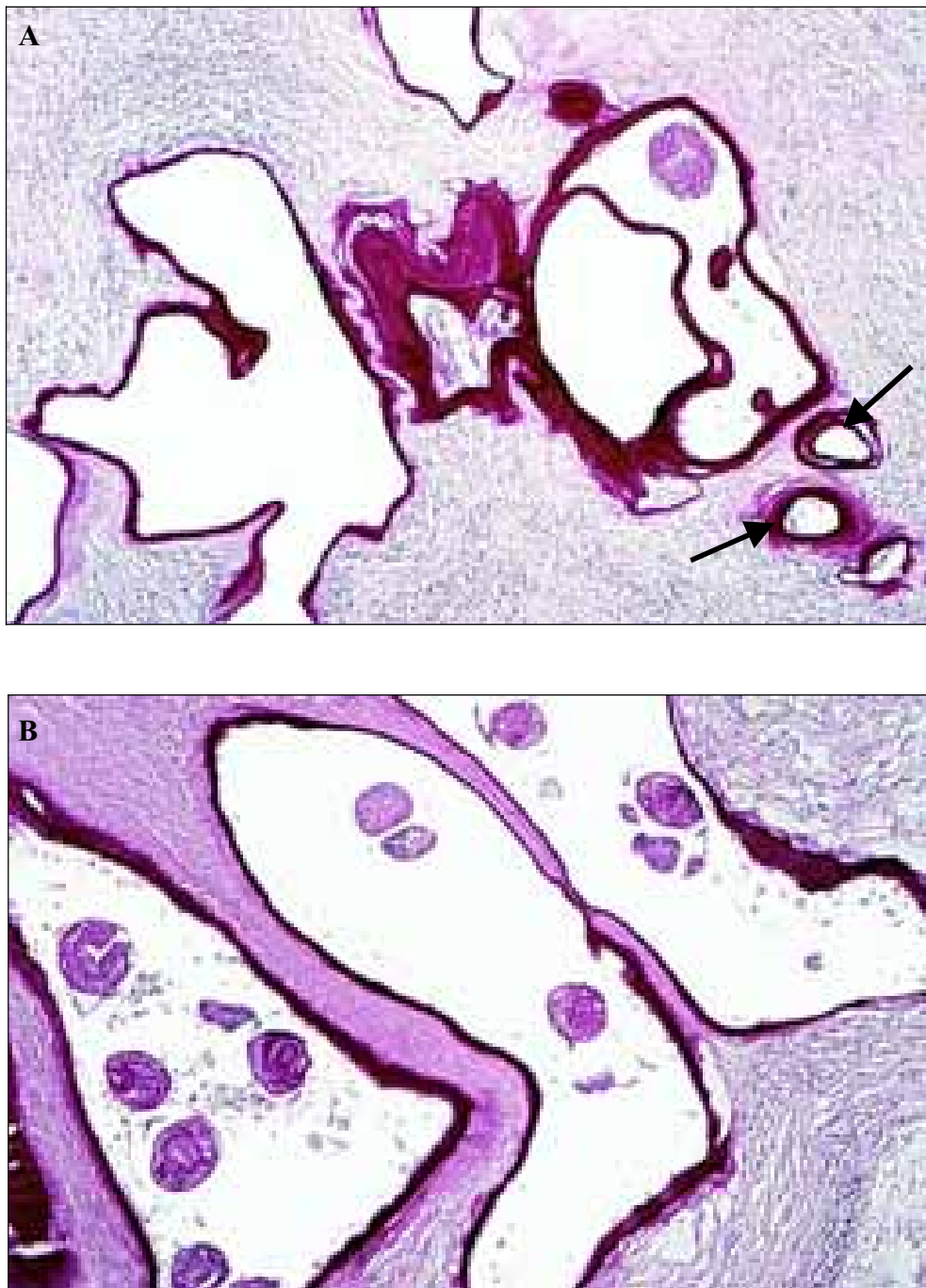


Abb. 13:

PAS-positive Reaktion der Laminarschicht. In den stark gekammerten Strukturen des Zystengewebes sind Protoskolizes zu erkennen (fertile Zysten). Die Pfeile in Abbildung A zeigen neue Sprossungen in das angrenzende Gewebe (Tier Nr. 6434, PAS-Reaktion, Vergr. 94x).

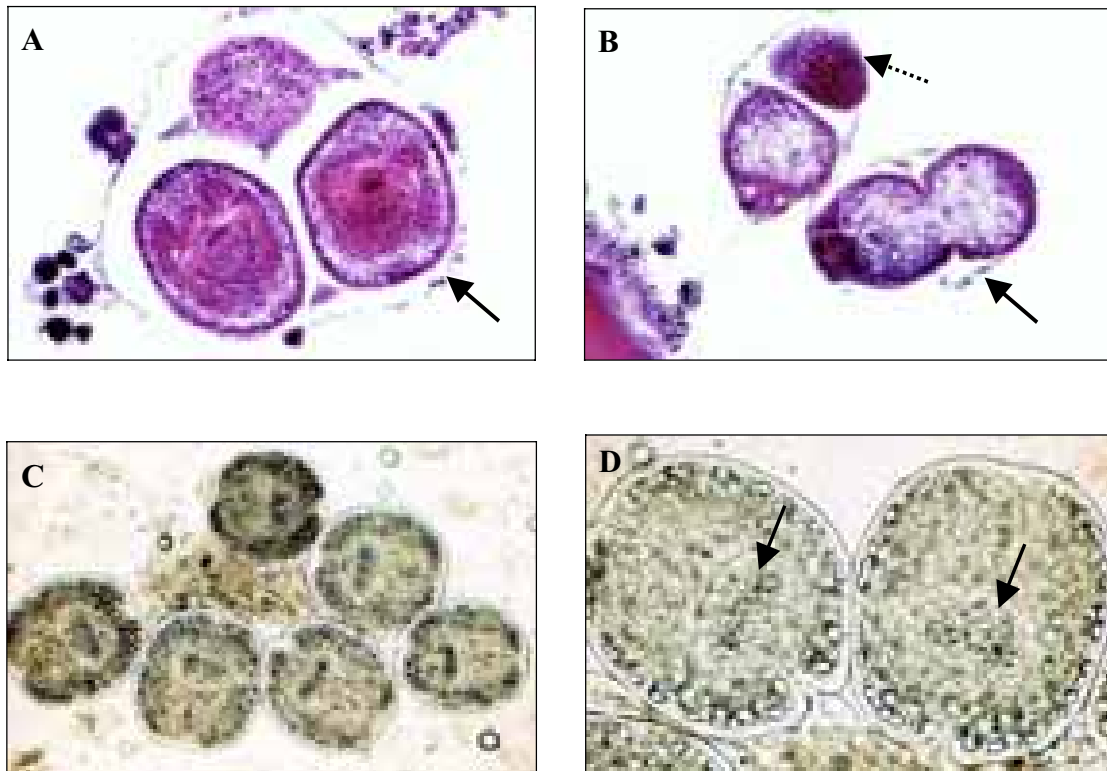


Abb. 14:

A: Protoskolizes in einer Brutkapsel (Pfeil); (Tier Nr. 6434, H.-E. Färbung, Vergr. 376x).

B: Protoskolizes in unterschiedlichen Entwicklungsstadien: ein Protoskolex stülpt sich gerade aus (Pfeil), eine Anhäufung von Zellen deutet darauf hin, dass sich hier ein neuer Protoskolex bildet (unterbrochener Pfeil); (Tier Nr. 6434, H.-E. Färbung, Vergr. 376x).

C: Protoskolizes im Nativpräparat (Tier Nr. 6434, Vergr. 376x).

D: Bei stärkerer Vergrößerung sind die Häkchen des Hakenkranzes zu erkennen (Pfeile); (Tier Nr. 6434, Vergr. 938x).

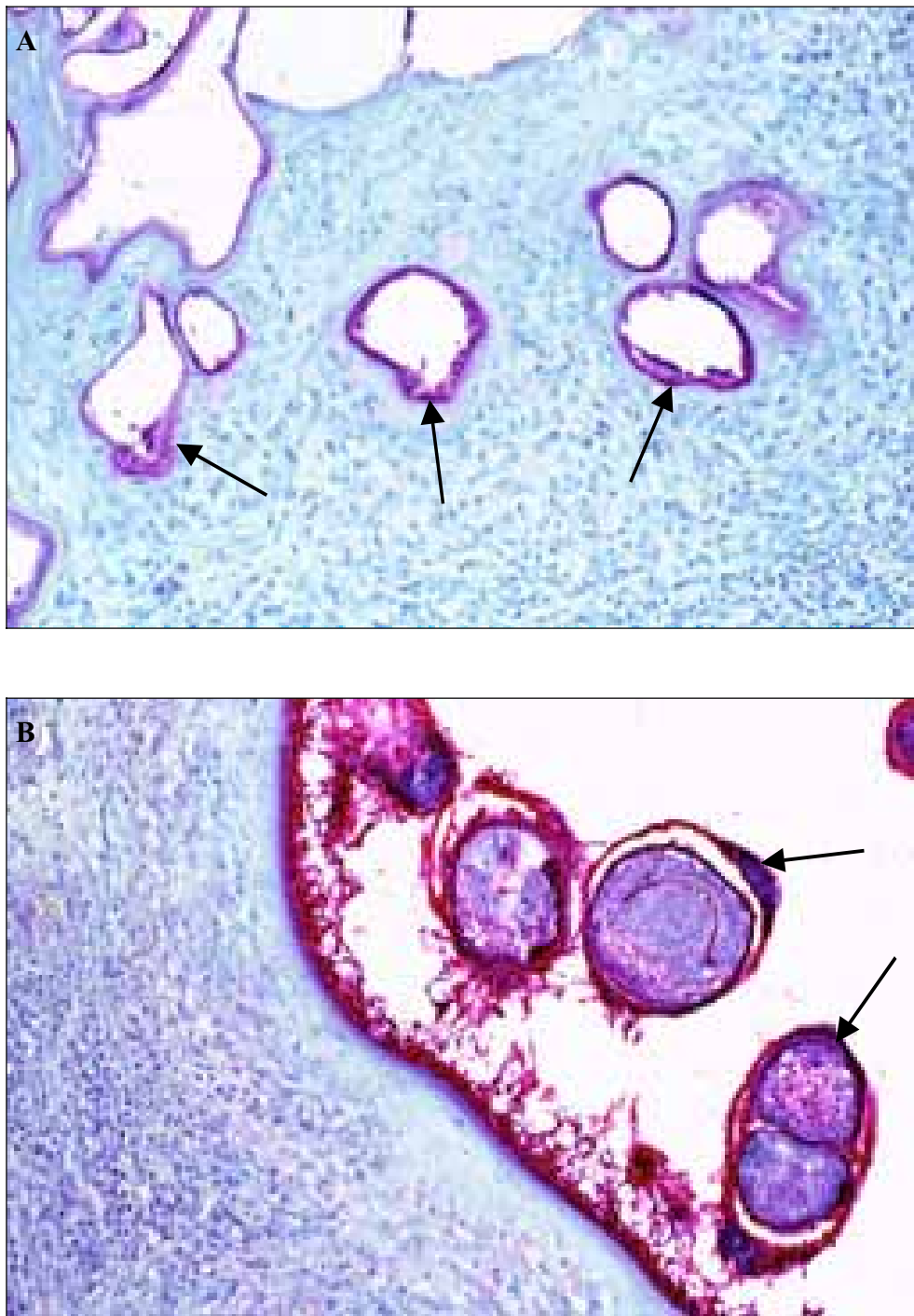


Abb. 15:

A: Immunhistochemische Darstellung von Echinokokken-Antigen im Zystengewebe der Leber. Bei den positiven (roten) Bereichen handelt es sich um die germinative Schicht der Zysten (Pfeile); (Tier Nr. 6434, SABC Methode, Hämalan, Vergr. 188x).
B: Weiterhin stellen sich die Protoskolizes positiv dar (Pfeile); (Tier Nr. 6434, SABC Methode, Hämalan, Vergr. 188x).

4.3.4 Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung in dieser Studie wurde den Protoskolizes sowie der germinativen Schicht besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Abbildung 16 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten. Die elektronenmikroskopisch untersuchten Bereiche wurden hier markiert.

Die Abbildungen 17 bis 22 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten durch eine Zyste von Tier 6434. In Abbildung 17 ist die Wand einer Zyste dargestellt. Sie lässt eine äußere Laminarschicht und eine innere germinative Schicht erkennen. Die Laminarschicht stellt sich als eine dicke Schicht dar, die die Zyste umrandet, und besteht aus einer amorphen Substanz, die während des Zystenwachstums zunehmend homogener wird.

Die germinative Schicht (Keimschicht) umfasst das Tegument und die undifferenzierten Zellen. Sie ragt mit zahlreichen Mikrovilli in die Laminarschicht hinein (Abb. 17). Weiterhin besteht die germinative Schicht aus Ansammlungen verschiedenster Zellen. Hierzu gehören sowohl undifferenzierte Zellen, aber auch Glykogenspeicherzellen, retikuläre Zellen und Muskelzellen. Glykogenspeicherzellen der germinativen Schicht sind durch diffus im Zytoplasma verteilte Glykogengranula charakterisiert, während retikuläre Zellen lange retikuläre Ausläufer zeigen (Abb.17, 18). Die Muskelzellen der germinativen Schicht besitzen lange Fortsätze mit Myofibrillen und Glykogenpartikeln (Abb. 17). Die undifferenzierten Zellen sind charakterisiert durch einen elektronenhellen Kern und einen elektronendichten Nukleolus. Sie können kleine Mitochondrien und Polysomen enthalten und zeigen oft aktive Mitosen. Einige undifferenzierte Zellen bleiben brückenartig mit dem Tegument verbunden, andere formen durch wiederholte Teilungen Zellaggregate oder transformieren sich zu Muskelzellen. Die Zellaggregate dienen der Bildung der Brutkapseln. Später entwickeln sich durch Anhäufung von undifferenzierten Zellen an einigen Stellen der Brutkapsel die Protoskolizes.

Die Tegumentstruktur der Protoskolizes ist in den Abbildungen 19 bis 21 dargestellt. Auffällig sind die unterschiedlichen Formen der Mikrotrichen an ein und demselben Protoskolex. Während im vorderen Bereich stachelartige Mikrotrichen zu erkennen sind (Abb. 19, 20, 21/A, C u. D), ist der hintere Bereich des Protoskolex mit eher stumpfen Mikrotrichen besetzt (Abb. 21/B). Die stachelartigen Mikrotrichen befinden sich im Bereich des späteren Rostellum und der Saugnäpfe und sind unterteilt in einen apikalen elektronendichten Teil und einen basalen Teil. Apikaler und basaler Teil werden durch eine schmale elektronenhelle Zone voneinander separiert. Diese Zone ist durch ein oder zwei elektronendichte Transversallinien zwei- oder dreigeteilt (Abb. 21/C u. D). Die stumpfen Mikrotrichen am hinteren Teil des Protoskolex haben einen elektronendichten Kranzbereich (Abb. 21/B). Das distale Zytoplasma grenzt an die Basis der Mikrotrichen an und besitzt zahlreiche Vesikel (Abb. 19). Im Inneren der Zellen finden sich neben anderen Zellorganellen teilweise Mitochondrien. Glykogen liegt in Granulaform vor. Angrenzend an die Plasmamembran des distalen Zytoplasmas befindet sich eine Basalmembran (Abb. 19). Das fibröse Interstitium liegt im Zwischenraum zwischen den Zellen des Protoskolex und der Basalmembran und besteht aus losen retikulären Filamenten. Unterhalb dieser fibrösen Zone sind langgezogene Bündel von myofibrillären Fortsätzen der Muskelzellen erkennbar (Abb. 20). Muskelzellen sind auch besonders im Bereich der späteren Saugnäpfe (Vorderende des Protoskolex) darstellbar (Abb. 19, 20).

Der Hakenkranz der Protoskolizes besteht aus amorphem Material und longitudinalen Fasern und ist umgeben von einer dünnen elektronendichten Schicht. Im Inneren der einzelnen Häkchen liegt die Markhöhle, die mit feingranulärem Material gefüllt ist und von Hakenkranzanteilen unregelmäßig durchzogen wird (Abb. 22).

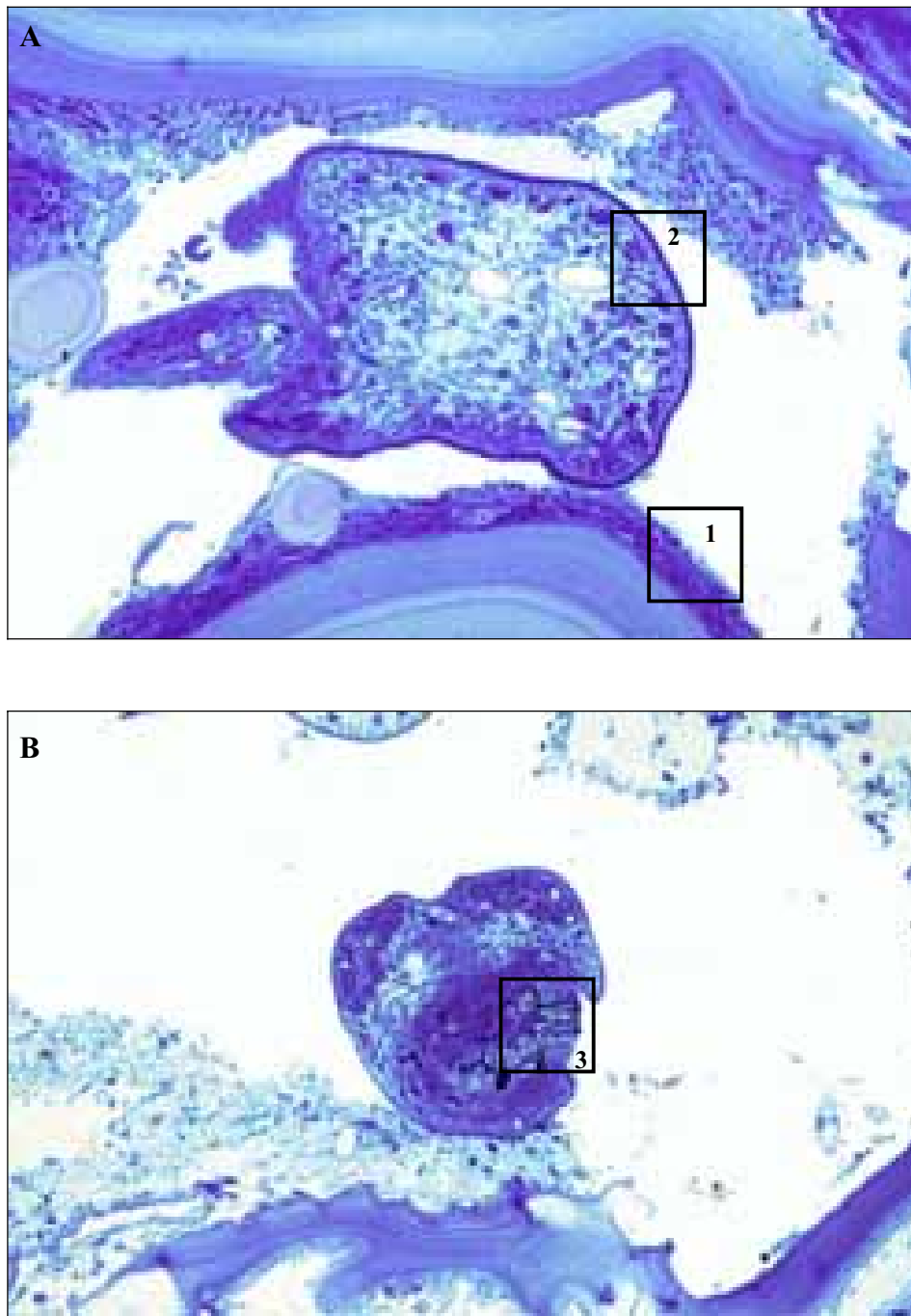


Abb. 16:

Lichtmikroskopische Darstellung der Lokalisationen, die für ultrastrukturelle Untersuchungen ausgewählt wurden: Elektronenmikroskopische Darstellungen (siehe Abb. 17 bis 22) erfolgten von germinativer Schicht (1), vom Tegument des Protoskolex (2) und vom Hakenkranz (3); (Semidünnschnitte, Tier Nr. 6434, Methylenblaufärbung, Vergr. A: 376x, B: 188x).

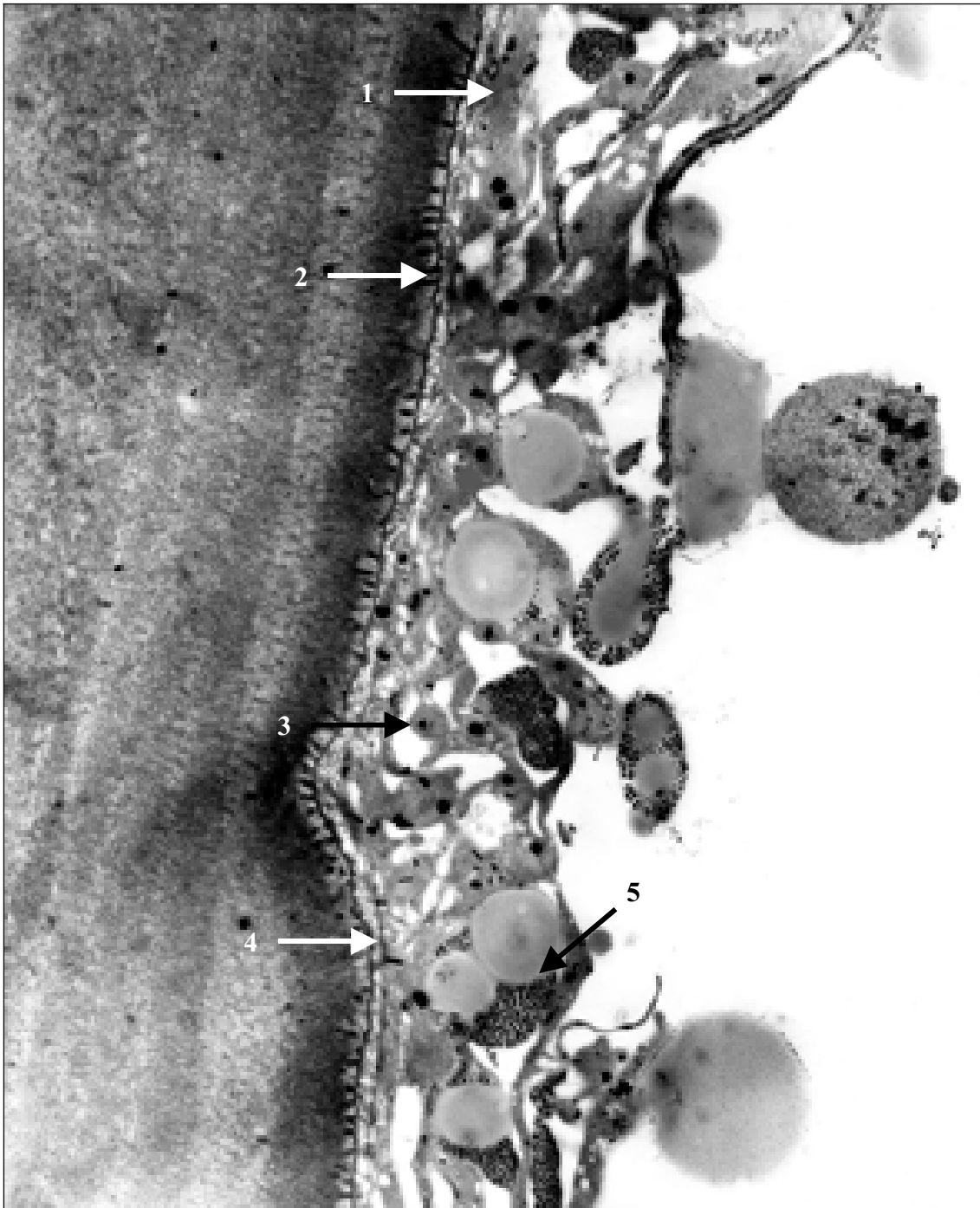


Abb. 17:

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zystenwand mit myofibrillären Ausläufern einer Muskelzelle (1), in die Laminarschicht hineinragende Mikrovilli der germinativen Schicht (2), retikulären Zellen (3), distalem Zytoplasma (4) und glykogenspeichernden Zellen (5); (TEM, Tier Nr. 6434, Vergr. 9450x).

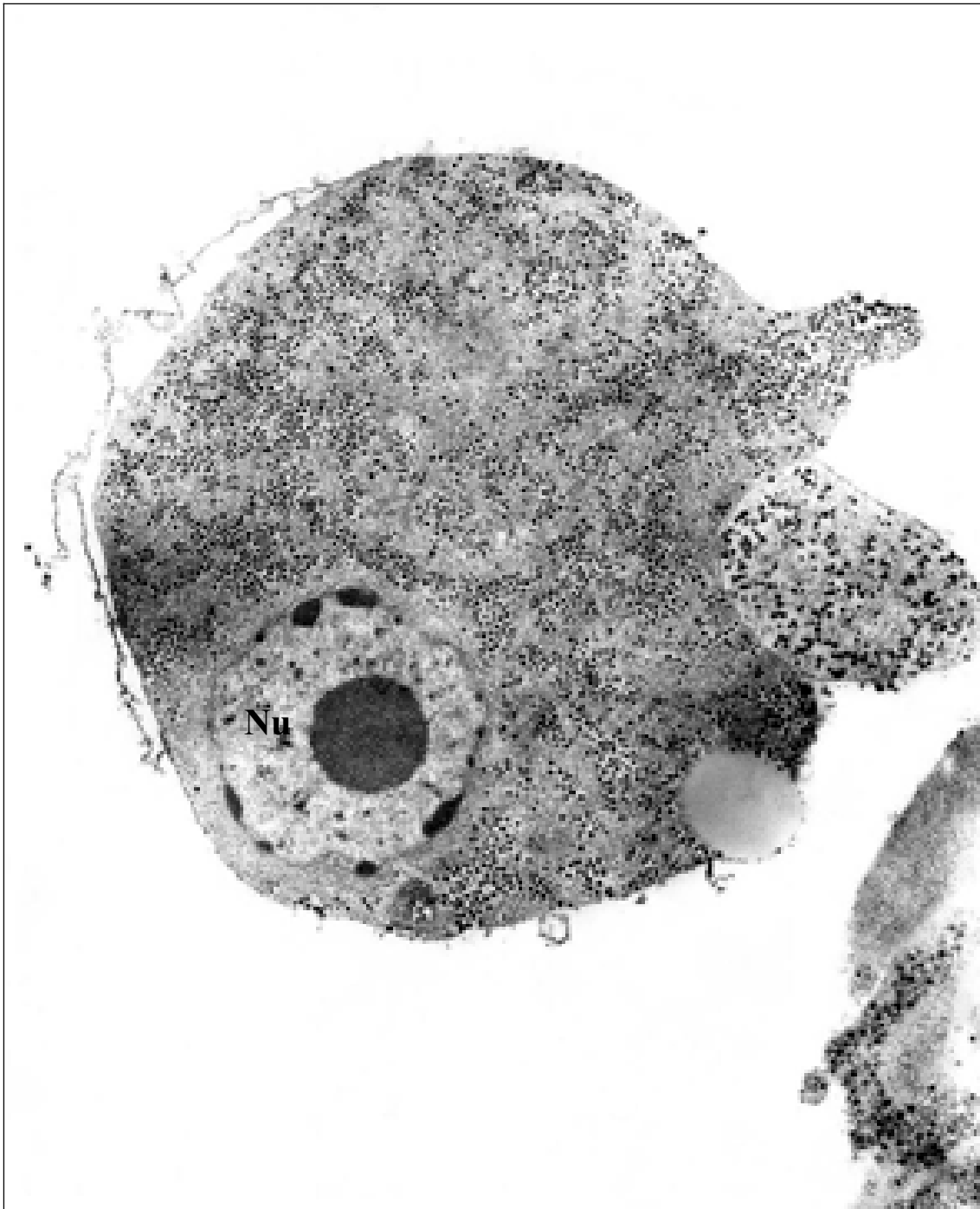


Abb. 18:

Glykogenspeicherzelle der germinativen Schicht, die durch elektronendichte Glykogengranula im Zytoplasma charakterisiert ist (Nu = Nukleus); (TEM, Tier Nr. 6434, Vergr. 18900x).

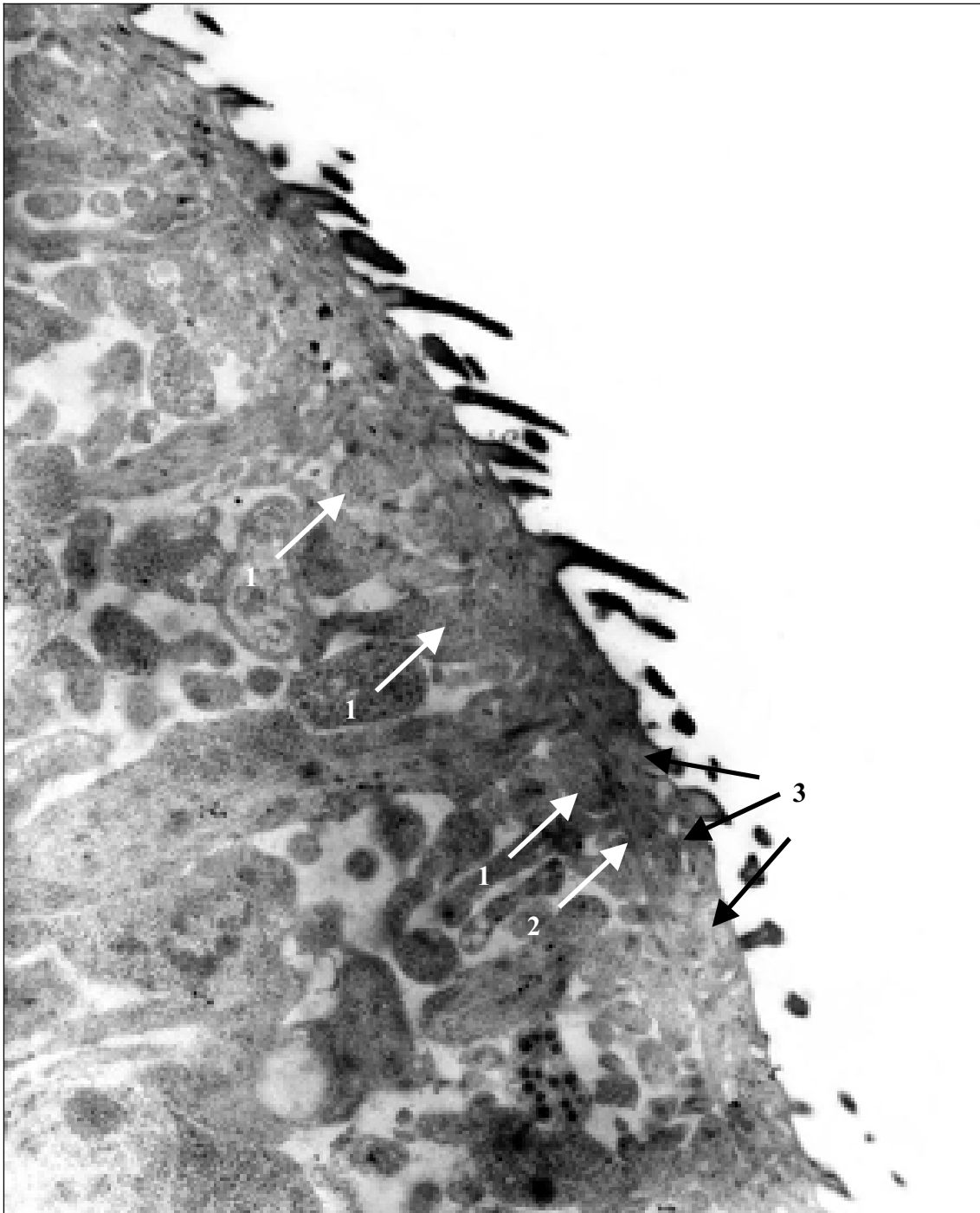


Abb. 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Teguments eines Protoskolex im Bereich von Rostellum und Saugnäpfen mit Muskelzellausläufern (1), Basalmembran (2) und Anteilen des distalen Zytoplasmas (3); (TEM, Tier Nr. 6434, Vergr. 18900x).

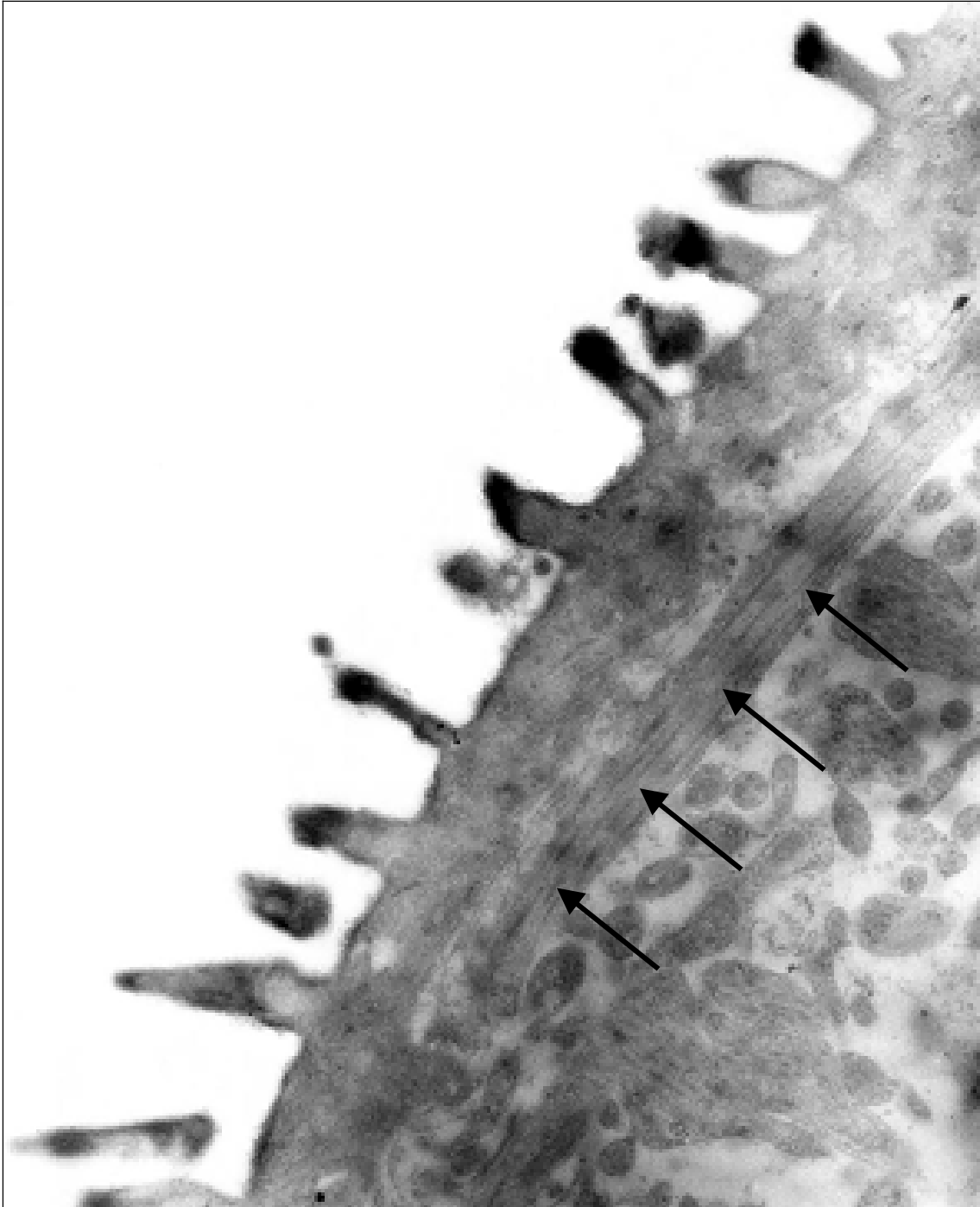


Abb. 20:

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Protoskolecteguments mit Bündeln von myofibrillären Fortsätzen der Muskelzellen (Pfeile); (TEM, Tier Nr. 6434, Vergr. 30000x).

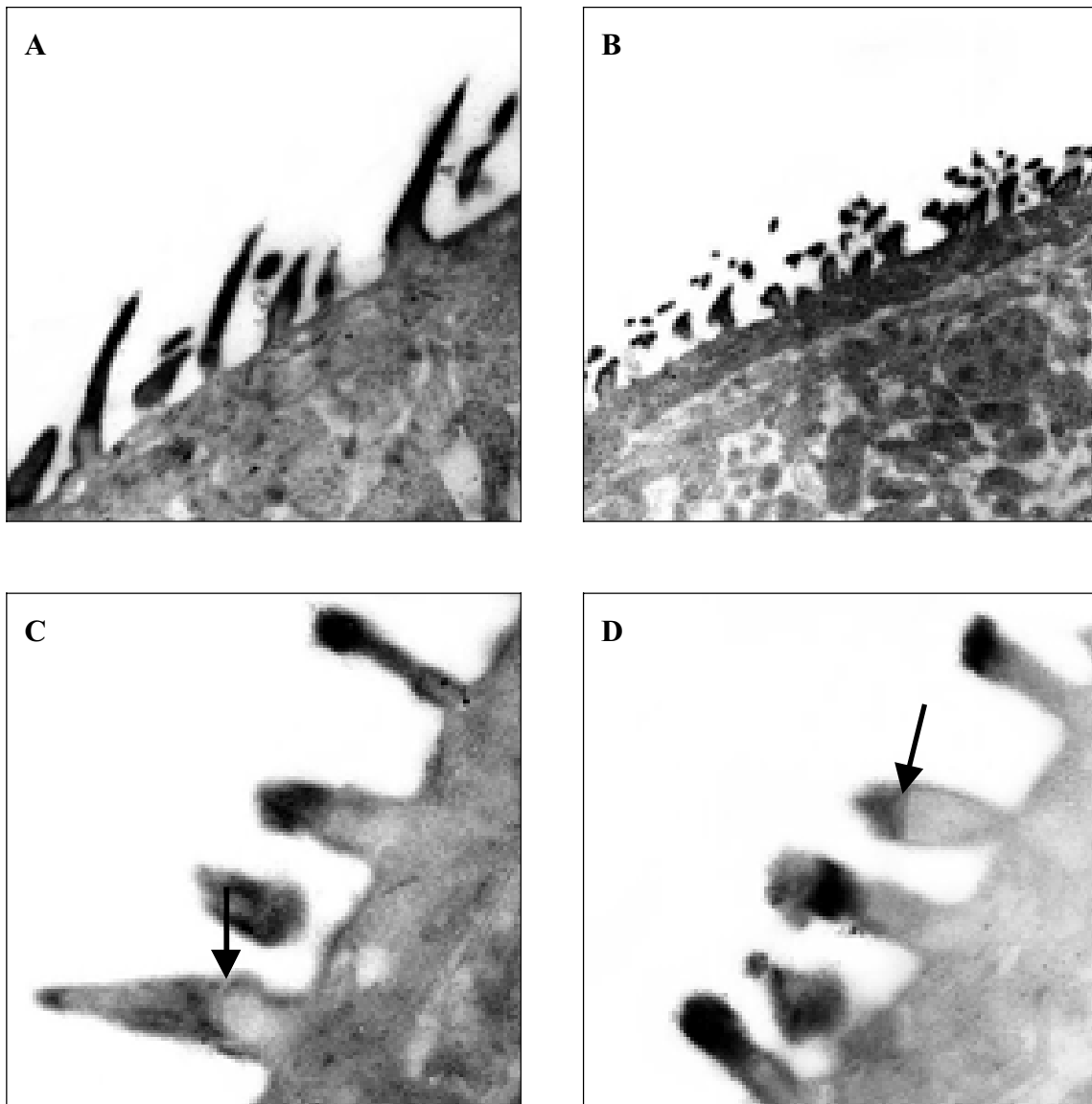


Abb. 21:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Mikrotrichenformen der Protoskolizes (TEM, Tier Nr. 6434).

A: Stachelartige Mikrotrichen im Bereich von Rostellum und Saugnäpfen des Protoskolex (Vergr. 18900x).

B: Stumpfe Mikrotrichen im hinteren Bereich des Protoskolex (Vergr. 9450x).

C + D: Stachelartige Mikrotrichen; basaler und apikaler Teil der Mikrotrichen werden durch eine elektronenhelle Zone voneinander separiert (Pfeile); (Vergr. 30000x).



Abb. 22:

Elektronenmikroskopische Aufnahme von einzelnen Häkchen des Hakenkranzes eines Protoskolex, die in ihrem Inneren eine Markhöhle (Pfeile) aufweisen (TEM, Tier Nr. 6434, Vergr. 12000x).

4.4 Genetische Untersuchungen

Außer vom Rhesusaffen (*M. mulatta*), für den mehr als 100 MHC-*DRB*-Sequenzen veröffentlicht wurden, ist nur wenig über die *DRB*-Loci von anderen Altweltaffenspezies bekannt (siehe IPD Nonhuman Primate MHC database: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/nhp>) (ROBINSON et al. 2003). Der Grund für die Untersuchung der MHC-Region von Bartaffen liegt darin, einen Genombereich näher zu charakterisieren, der für den Verlauf von Infektionskrankheiten eine große Rolle spielt. Weiterhin können immungenetische Untersuchungen der Bartaffen eine wichtige Basis für ein effektiveres Zuchtprogramm der in Menschenhand befindlichen Zuchtpopulationen bilden.

4.4.1 Identifizierung von *Masi* MHC-Klasse-II-Allelen

Während dieser Studie wurden 9 verschiedene *DRB*-Sequenzen bei zehn untersuchten Bartaffen des DPZ nachgewiesen (Tab. 7). Die Abbildung 23 stellt das Ergebnis einer DGGE dar. Eine Auftrennung der eingesetzten PCR-Produkte ist an den Banden in den entsprechenden Spuren zu erkennen. Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurden die Banden ausgeschnitten und eluiert. Ein Teil des Eluats wurde reamplifiziert und sequenziert. Bei nicht eindeutigen DNA-Sequenzen wurde ein Teil der Probe für eine weitere DGGE-PCR eingesetzt und erneut auf ein DGGE-Gel aufgetragen, um doch noch eine Auftrennung der Allele zu erreichen.

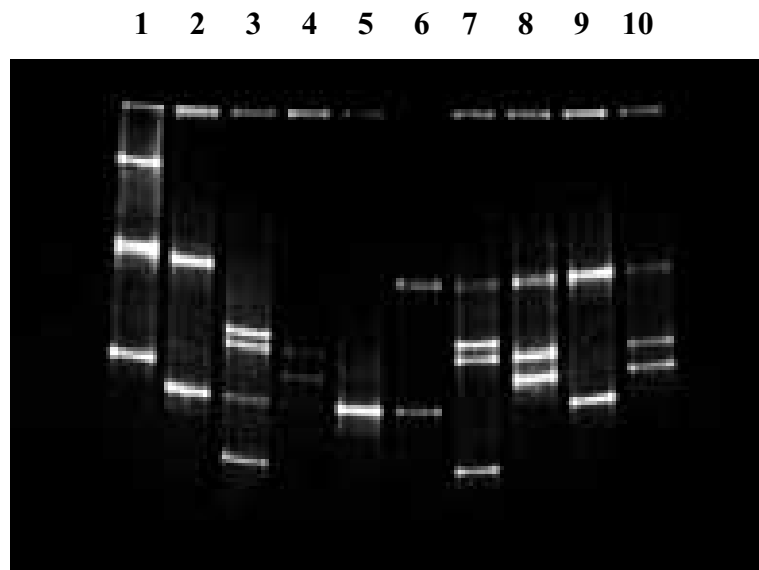


Abb. 23: Parallele *Masi-DRB*-DGGE

(Spur 1: Tier 9838; Spur 2: Tier 8295; Spur 3: Tier 9837; Spur 4: Tier 8113;
Spur 5: Tier 5229; Spur 6: Tier 7194; Spur 7: Tier 9485; Spur 8: Tier 6434;
Spur 9: Tier 6433; Spur 10: Tier 1252)

Die Sequenzen eindeutiger Proben wurden mit Hilfe des Blast-Programmes (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit Sequenzen in der Genbank verglichen. Neue Allele wurden in beiden Richtungen sequenziert, um die Sequenzen zu bestätigen.

Zur Kontrolle wurden zusätzliche PCRs mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) durchgeführt (Kap. 3.2.4.3). Bei Tier 9838 (Abb. 23, Spur 1) wurden 3 Banden nachgewiesen, die sich z.T. nicht eindeutig sequenzieren ließen. In der PCR-SSP wurden dann jedoch 5 Allele eindeutig nachgewiesen (Tab. 7). Die in der PCR-SSP verwendeten Primersequenzen sind in Abbildung 24 farblich gekennzeichnet. Die Anzahl der insgesamt gefundenen *DRB*-Allele pro Tier variiert zwischen 1 und 5 (Tab. 7).

Die Sequenzen wurden im MHC Primate Register registriert. *Masi-DRB*-Sequenzen, die den humanen Äquivalenten ähnlich sind, haben auch die entsprechenden Bezeichnungen (*Masi-DRB1*0301*, *Masi-DRB1*0401* und *Masi-DRB4*0101*). Allellinien, die beim Menschen nicht vorkommen, wurden entsprechend der gängigen, in der Literatur dokumentierten Praxis mit

einem *W* gekennzeichnet (KLEIN et al. 1990; BONTROP et al. 1999). Dies trifft auf die restlichen sechs Allele der untersuchten Tiere zu.

Tabelle 7: *Masi-DRB* Allele von zehn Bartaffen

Allel	GenBank accession numbers	Tiernummern									
		5229	1252	7194	8295	8113	6433	9837	9485	9838	6434
<i>Masi-DRB1*0301</i>	AY172137									x	
<i>Masi-DRB1*0401</i>	AY172138		x	x	x		x		x	x	x
<i>Masi-DRB4*0101</i>	AY172139	x		x	x	x	x	x			
<i>Masi-DRB*W101</i>	AY172140									x	
<i>Masi-DRB*W201</i>	AY172141									x	
<i>Masi-DRB*W301</i>	AY172142							x	x		
<i>Masi-DRB*W3501</i>	AY172143							x	x		
<i>Masi-DRB*W401</i>	AY172144		x			x				x	x
<i>Masi-DRB*W402</i>	AY172145		x			x		x	x		x

In Abbildung 24 sind die 9 gefundenen *DRB*-Sequenzen aufgelistet. Die meisten dieser Sequenzen gehören zu unterschiedlichen Allellinien. Dies zeigt trotz der geringen absoluten Zahl der gefundenen Allele doch eine beachtliche Diversität. Auffällig ist, dass das an AE erkrankte Tier (6434) dieselben Sequenzen aufweist wie das Tier (1252) bei dem Antikörper gegen *E. multilocularis* nachgewiesen wurden (Tab. 7).

Die Allele der Bartaffen gehören zu Linien, die auch in anderen Primatenspezies vorkommen (siehe IPD Nonhuman Primate MHC database: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/nhp>). Von den 9 *DRB* Allelen, die in dieser Studie gefunden wurden, gehören 8 zu verschiedenen Allellinien. Außer *Masi-DRB*W3501* gehören die anderen acht zu Allellinien, die auch bei Rhesusaffen vorkommen. Abbildung 25 zeigt einen phylogenetischen Baum von MHC-*DRB*-Allelen bei Makaken einschließlich der *DRB*-Allele der Bartaffen. Hierfür wurde die neighbour-joining-Methode angewendet. Es ist erkennbar, dass die DNA-Sequenzen einer Allellinie ähnlicher sind als alle Sequenzen innerhalb einer Art. Die Allellinien müssen daher schon vor der Entstehung der Makakenarten vorhanden gewesen sein.

Zumindest kann aufgrund der genetischen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass ein hoher Grad an Diversität bezüglich der Zahl der *DRB*-Allellinien vorliegt. Ein Zusammenhang mit einer AE konnte in der vorliegenden Untersuchung noch nicht gefunden werden.

4.4.2 Stammbaumdarstellungen der Bartaffenkolonie

Um Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer AE und bestimmten genetischen Eigenschaften bei Bartaffen untersuchen zu können, wurden von den Tieren der Bartaffenkolonie des Deutschen Primatenzentrums Stammbäume angefertigt. Diese Stammbäume sind im Anhang (Kap. 9.6) aufgeführt. Die an AE erkrankten Tiere (5006, 5092, 6434) sowie das serologisch positive Tier (1252) haben gemeinsame Vorfahren. Diese Vorfahren sind die Tiere mit den Zuchtbuchnummern 884 und 591, die in den Stammbäumen farblich gekennzeichnet sind. Weiterhin gehören die Tiere 884 und 591 auch zu den Vorfahren von 6 weiteren Tieren der Bartaffenkolonie: Ronja (6433), Pelle (7194), Michel (8295), Jette (8113), Stina (11175) und Skrolan (11439) sind daher mit den an AE verstorbenen Tieren verwandt. Durch den Vergleich der verwandschaftlichen Verhältnisse der Bartaffen, die an AE erkrankt bzw. serologisch positiv sind, können somit zumindest Vermutungen gemacht werden, was eine eventuelle Empfänglichkeit für eine AE betrifft.

		10	20	30	40	50			
<i>Masi-DRB1*0301</i>	1	TTGGAGTACT	CTACA	TCTGA	GTGTC	ACTTC	TTCAACGGGA	CGGAGCGGGT	50
<i>Masi-DRB1*0401</i>	1C.GG	T..A.CAT	50
<i>Masi-DRB4*0101</i>	1C.GG	..AGT	50
<i>Masi-DRB*W101</i>	1	..A.....	G..AG	T.....C..TT	50
<i>Masi-DRB*W201</i>	1TC.GG	T..AG	A.....TT	50
<i>Masi-DRB*W301</i>	1C.GG	..A.CGTT	50
<i>Masi-DRB*W3501</i>	1C.GG	..AGG	50
<i>Masi-DRB*W401</i>	1	..C	..C.G	T..AGCT	50
<i>Masi-DRB*W402</i>	1C..G	T..AGT	50
		60	70	80	90	100			
<i>Masi-DRB1*0301</i>	51	GCGGTACCTG	GACAGATACT	TCTATAACCA	GGAGGAGAAC	CTGCGCTTCG		100	
<i>Masi-DRB1*0401</i>	51TT	G.....	100	
<i>Masi-DRB4*0101</i>	51	AT.....C	AC	GC.....	100	
<i>Masi-DRB*W101</i>	51	..T.A	..ATAT	G.....A	100	
<i>Masi-DRB*W201</i>	51TG	..GC	TTA	GC.....	100	
<i>Masi-DRB*W301</i>	51T	T	G.....	100	
<i>Masi-DRB*W3501</i>	51T	T	G.....	100	
<i>Masi-DRB*W401</i>	51GC	100	
<i>Masi-DRB*W402</i>	51T	..GC	100	
		110	120	130	140	150			
<i>Masi-DRB1*0301</i>	101	ACAGCGACGT	GGGGGAGTAC	CGGGCGGTGT	CGGAGCTGGG	GCGGCCTGAC		150	
<i>Masi-DRB1*0401</i>	101A	G.AG	150	
<i>Masi-DRB4*0101</i>	101A	150	
<i>Masi-DRB*W101</i>	101	C.....A	150	
<i>Masi-DRB*W201</i>	101TA	150	
<i>Masi-DRB*W301</i>	101TA	G.AG	150	
<i>Masi-DRB*W3501</i>	101TA	150	
<i>Masi-DRB*W401</i>	101A	150	
<i>Masi-DRB*W402</i>	101A	150	
		160	170	180	190	200			
<i>Masi-DRB1*0301</i>	151	GCCGAGTACT	TCAACAGCCA	GAAGGACATC	CTGGAGCAGA	AGCGGGCC	CG	200	
<i>Masi-DRB1*0401</i>	151	..G.....	GG.....TG	G.....	GC	200	
<i>Masi-DRB4*0101</i>	151	GG..GCG	G.....	GA	200	
<i>Masi-DRB*W101</i>	151	..A.....	GG..GC	G.....	GA	200	
<i>Masi-DRB*W201</i>	151A	..G	CT.GCG.G	C.....GC	200	
<i>Masi-DRB*W301</i>	151	..G.....	GG.....	T.TG	C.....	A..GC	200	
<i>Masi-DRB*W3501</i>	151	GG.....AG.CG	C.....	GC	200	
<i>Masi-DRB*W401</i>	151	..C	C..GGTGGC	200	
<i>Masi-DRB*W402</i>	151A	GG.....G	200	
		210	220	230	240	250			
<i>Masi-DRB1*0301</i>	201	GGTGGACAAT	TACTGCA	GAC	ACAAC	TACCG	GGTTGGTGAG	AGCTTC	250
<i>Masi-DRB1*0401</i>	201G	CG.....	250	
<i>Masi-DRB4*0101</i>	201	CA GTGG	250	
<i>Masi-DRB*W101</i>	201	CC GTGT	250	
<i>Masi-DRB*W201</i>	201	CC GTG	G	A	TG.....	250	
<i>Masi-DRB*W301</i>	201	CG	C	250	
<i>Masi-DRB*W3501</i>	201	CCG	C	250	
<i>Masi-DRB*W401</i>	201	CC	250	
<i>Masi-DRB*W402</i>	201	C	250	

Abb. 24: *Masi-DRB*-Allele der Bartaffenkolonie des DPZ. Die PCR-SSP Primer wurden farbig gekennzeichnet (grau-vorwärts Primer, gelb-rückwärts Primer).

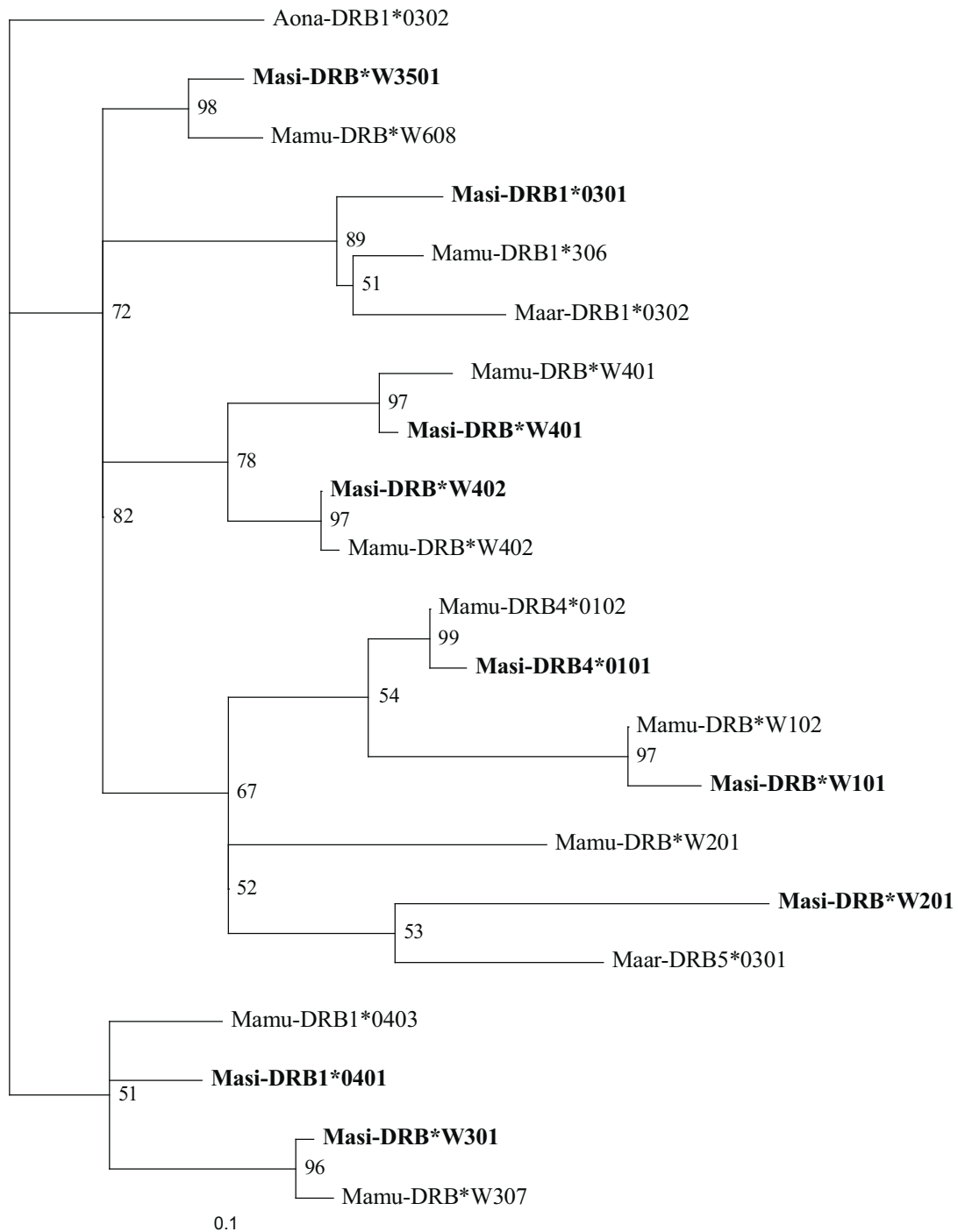


Abb. 25: Phylogenetischer Baum von einigen MHC-II-DRB-Allelen bei einigen Primaten (Aona - *Aotus nancymae*, Maar - *M. arctoides*, Mamu - *M. mulatta*, Masi - *M. silenus*).

5 Diskussion

Die Untersuchung der Auswirkungen einer alveolären Echinokokkose auf den Organismus von nichtmenschlichen Primaten war ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit. Die betroffenen Tiere waren Bartaffen - Vertreter der Makaken -, die zu den stark bedrohten Arten der Welt gehören. Den Veränderungen, die sowohl prä- als auch postmortal zu beobachten waren, wurde besondere Beachtung geschenkt.

Ausgehend von Überlegungen zur denkbaren besonderen Empfänglichkeit von Bartaffen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung des MHC Klasse II. Dies wurde mit dieser Arbeit erstmalig bei dieser Spezies durchgeführt und stellt den Anfang von immungenetischen Studien bei Bartaffen dar.

5.1 Überlegungen zur Infektion

Die Bartaffen der DPZ Kolonie leben seit dem 11.06.1997 in einer Kombination aus Innen- und Außengehege. Vor diesem Zeitpunkt lebten die Bartaffen in einem anderen Gehege, welches ebenfalls aus einem Außen- und Innengehege bestand. Das jetzige und das frühere Außengehege grenzen an einen Bereich, der stark mit Sträuchern, Bäumen und Gras bewachsen ist, und in dem nachweislich Füchse und Feldhamster leben. Es sind also sowohl typische Endwirte als auch typische Zwischenwirte vorhanden, die für den Lebenszyklus von *E. multilocularis* notwendig sind. Im Rahmen von stichprobenartigen Kontrollen sind tatsächlich auch Infektionen mit *E. multilocularis* bei Hamster und Fuchs nachgewiesen worden. Weiterhin traten vereinzelt Fälle von AE nicht nur bei den Bartaffen des DPZ auf, sondern auch in der Rhesusaffenkolonie (*M. mulatta*) (BRACK et al. 1997) und unter den Javaneraffen (*M. fascicularis*). Dies spricht für das endemische Vorkommen des Fuchsbandwurmes in diesem Gebiet. Nach ECKERT (1997) und ROMIG et al. (1999 b) liegt die Befallsrate von Füchsen in Niedersachsen bei bis zu 50 %.

Die betroffenen Bartaffen - Hanna (5006), Ida (5092) und Heinrich (6434) - lebten viele Jahre in der Kolonie des DPZ. Die AE wurde bei allen Tieren in einem Zeitraum von ca. einem Jahr diagnostiziert. Hanna lebte seit 1988 am DPZ, Ida seit 1989 und Heinrich wurde 1993 im DPZ geboren und wurde am 10.06.1997 (also einen Tag vor dem Umzug der Tiere in ein neues Innen-/Außengehege) in den Zoo Rostock verbracht. Da das Auftreten der ersten Symptome bei allen drei Tieren innerhalb eines Jahres geschah, lässt dies vermuten, dass auch die Infektionszeitpunkte der drei Tiere nahe beieinander lagen. Es ist wahrscheinlich, dass sich Heinrich, bei dem Symptome erst auftraten als er schon in Rostock war, wie die anderen Tiere während seiner Zeit am DPZ infiziert hat. Zur Infektionsart gibt es verschiedene Möglichkeiten: Der Fuchs könnte in der direkten Nähe des Gehegezaunes Kot abgesetzt haben, oder der Wind hat die Eier von *E. multilocularis* in das Gehege getrieben. Die wahrscheinlichste Infektionsursache ist aber, dass die Bartaffen die Eier von *E. multilocularis* aufgenommen haben, als sie mit Beeren und Zweigen von Johannisbeersträuchern gefüttert wurden, die von außerhalb des Geheges stammten. Dies wurde auch schon praktiziert, als die Bartaffenkolonie noch in dem alten Gehege untergebracht war, also vor dem 11.06.1997. Da Heinrich auch an AE erkrankt ist, obwohl er nie in dem neuen Innen-/Außengehege lebte, lässt dies darauf schließen, dass der Infektionszeitpunkt während der Zeit vor dem 11.06.1997 liegen muss. Demnach beträgt die Inkubationszeit in den vorliegenden Fällen mindestens ca. 3 Jahre (Heinrich wurde 1997 nach Rostock verbracht und erkrankte 1999) und höchstens ca. 11 Jahre (Hanna war seit 1988 am DPZ und erkrankte 1999). Beim Menschen, der wie der Bartaffe als Fehlwirt infiziert werden kann, liegt die Inkubationszeit bei ca. 15 Jahren. Bei den typischen Zwischenwirten scheint die Inkubationszeit der kürzeren Lebensdauer dieser Tiere angepasst zu sein. Überträgt man dieses Prinzip auf den Bartaffen, müsste die Inkubationszeit zwischen der des Menschen und der von Nagern liegen, da die durchschnittliche Lebensdauer der Bartaffen auch zwischen der des Menschen und der von Nagern liegt.

5.2 Klinische Veränderungen

Im Grunde ist die AE der Bartaffen vergleichbar mit der AE des Menschen. Symptome ergaben sich erst in sehr fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und beschränkten sich bei den drei Bartaffen fast ausschließlich auf eine Umfangsvermehrung im abdominalen Bereich. Bei Ida (5092) und Heinrich (6434) wurde die AE zufällig während einer Routineuntersuchung bzw. während der Vorbereitungen einer Kastration festgestellt. Bei Hanna (5006) war die Umfangsvermehrung so stark, dass sie mit einer Trächtigkeit verwechselt wurde. Das Allgemeinbefinden war jedoch bei keinem der Tiere gestört. Erst bei Heinrich zeigte sich zwei Monate nach Diagnose der AE eine starke Abmagerung. Das lässt darauf schließen, dass erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auch bei den Bartaffen Störungen des Allgemeinbefindens auftreten würden. Auch andere Primaten mit einer AE zeigten Symptome, wie z. B. die von REHMANN et al. (2003) beschriebene Apathie, Anorexie, Schwäche und Abmagerung bei einem betroffenen Gorilla. Diese Symptome traten bei den hier untersuchten Bartaffen wahrscheinlich deshalb nicht auf, weil die Tiere schon vorher euthanasiert wurden. Auch beim Menschen wird eine asymptomatische Inkubationsphase von 5 - 15 Jahren beobachtet, der dann ein chronischer Krankheitsverlauf folgt und in unbehandelten Fällen zum Tod führt. Zu den Symptomen beim Menschen zählen v. a. Hepatomegalie, Gewichtsverlust und Ikterus (PAWLOWSKI et al. 2001).

Pathomorphologische Veränderungen in den Ausmaßen, wie sie bei Hanna, Ida und Heinrich beschrieben wurden (BLANKENBURG et al. 2001, 2002), sind mittels bildgebender Verfahren wie Ultraschall und Röntgen sehr gut darzustellen. Allerdings sind frühere Stadien der AE, wie auch beim Menschen, viel schwerer auszumachen. Daher ist es notwendig, andere Methoden zur frühen und rechtzeitigen Diagnosestellung zu etablieren, um gleichzeitig entsprechende Therapiemaßnahmen einleiten zu können. Die Chancen einer erfolgreichen Behandlung hängen sehr stark vom Stadium der Erkrankung ab. Die Serologie hat sich in den letzten Jahren zu einer Methode entwickelt, die mit immer höherer Sensitivität und Spezifität eine Möglichkeit bietet, schon in frühen Erkrankungsstadien eine AE festzustellen. So berichten GOTTSTEIN et al. (1993) vom Em2^{plus}-ELISA, in dem zwei *E. multilocularis*-Antigene (Em2 und II/3-10) kombiniert werden, und der eine Sensitivität von 97 % besitzt.

Durch Kombination mit einem *E. granulosus*-Antigen-ELISA kann eine optimale Spezifität erreicht werden, um die AE von der CE zu unterscheiden. Trotzdem kommen AE-Patienten vor, die keine Antikörper gegen diese Antigene produzieren. Deshalb kann die Nutzung von verschiedenen Antigenen eine Serodiagnose der AE verbessern. FROSCH et al. (1993) beschreiben ein Echinokokken-Antigen (Em13), welches eine hohe Sensitivität und Spezifität für die serologische Diagnose einer AE besitzt.

In der vorliegenden Studie wurde die gesamte Bartaffenkolonie serologisch auf AE getestet. Außerdem wurden im Zuge dieser Untersuchungen auch die Rhesusaffen (*M. mulatta*), Javaneraffen (*M. fascicularis*) und die Paviane (*Papio hamadryas*) des DPZ untersucht. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Echinokokken des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass aus der Bartaffenkolonie ein weiteres Tier (Marina, 1252) und bei den Javaneraffen 7 Tiere serologisch positiv sind. Paviane und Rhesusaffen waren alle negativ, obwohl diese Tiere den gleichen Haltungsbedingungen unterworfen waren und im selben Außenbereich lebten. Dies ließ die Frage nach einer besonderen Empfänglichkeit von Bartaffen und Javaneraffen aufkommen.

Weiterhin macht das Beispiel von Marina deutlich, dass bildgebende Verfahren nicht immer mit Sicherheit eine AE erkennen lassen, da bei allen Ultraschalluntersuchungen im Bereich der Leber keine Auffälligkeiten erkennbar waren. Die Serologie war bei ihr dagegen positiv. Es ist deshalb wichtig, gerade dieses Tier besonders zu beobachten, um erste Anzeichen zu erkennen und dann entsprechend zu handeln.

Das Differentialblutbild war in Bezug auf die AE wenig aussagekräftig. Eosinophilie ist bei Patienten mit AE normalerweise nicht zu beobachten. Dies war auch bei Marina nicht der Fall. In sehr fortgeschrittenen Fällen ist beim Menschen oft eine Lymphopenie festzustellen (PAWLOWSKI et al. 2001), was in diesem Fall nicht zu beobachten war.

5.3 Pathomorphologische Veränderungen

5.3.1 Pathologisch-anatomische Merkmale

Das Hauptmanifestationsorgan der pathomorphologischen Veränderungen bei den drei Bartaffen war die Leber. Dies ist typisch für die alveoläre Echinokokkose und in der Literatur am häufigsten beschrieben (AYDIN et al. 1986; RIETSCHHEL u. KIMMIG 1994; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997; BLANKENBURG et al. 2001, 2002; MÄTZ-RENSING et al. 2002; REHMANN et al. 2003). Bei Heinrich (Tier 6434) war nicht nur die Bauchhöhle, sondern auch die Brusthöhle betroffen. Hier hatte sich die Echinokokkose über Abklatschmetastasen im Zwerchfellbereich ausgedehnt. Auch bei den anderen beiden Tieren zeigte sich die Infektion nicht beschränkt auf die Leber (Tab. 6). Das Mesenterium war in allen drei Fällen betroffen. Die benachbarten Lymphknoten erschienen bei allen drei Tieren hyperplastisch, und eine Peritonitis wurde ebenfalls in allen drei Fällen nachgewiesen.

Trotz der hochgradigen pathologischen Veränderungen bei den Tieren 5006 und 5092 wurden noch keine Veränderungen des Allgemeinbefindens der betroffenen Tiere festgestellt. Erst bei Tier 6434, bei dem die pathologischen Veränderungen stärker ausgeprägt waren, kam es zu Auffälligkeiten. Die in späteren Stadien der Erkrankung aufgetretene Abmagerung lässt sich zurückführen auf die starke Ausdehnung der Zystengebilde im Abdomen. Eine der in diesem Fall nachgewiesenen Metazestodenstrukturen befand sich im Bereich des Netzes und war mit *Ileum*- und *Caecum*anteilen verwachsen. Dies kann die Verdauungsfunktionen beeinträchtigt haben, was dann zur Abmagerung geführt hat. Auch RIETSCHHEL und KIMMIG (1994) beschreiben einen Fall von einem Javaneraffen (*M. fascicularis*), bei dem die von der Leber ausgehenden Zystenstrukturen mit Magen und Dünndarm verwachsen waren. REHMANN et al. (2003) beschreiben im Fall eines Gorillas eine fibrinöse Adhäsion zwischen allen abdominalen Organen. Bei Tier 6434 hatte sich die Echinokokkose im Gegensatz zu den anderen beiden Tieren auch in die Brusthöhle ausgedehnt. Hierdurch kam es wahrscheinlich zur Beeinträchtigung der Funktionen von Herz und Lunge, wodurch die Ödematisierung der Unterhaut zu erklären wäre. Fälle, in denen die Lunge betroffen ist, werden auch von KONDO et al. (1996) und BRACK et al. (1997) beschrieben. In den anderen beiden Fällen

dieser Studie war die AE noch nicht so weit fortgeschritten. Hätten die Tiere noch einige Monate länger gelebt, wäre es möglicherweise zu einer weiteren Ausbreitung und Vergrößerung der Metazestoden gekommen. Neben den Metazestodenstrukturen wurde bei allen drei Bartaffen eine Peritonitis festgestellt, wie sie auch von anderen Autoren beschrieben wurde (BRACK et al. 1997; REHMANN et al. 2003).

Im Wesentlichen ist das makroskopische Bild der AE bei Affen vergleichbar mit dem beim Menschen. Typisch ist vor allem das infiltrative Wachstum der Zysten in das umliegende Gewebe, wodurch sich die AE von der CE unterscheiden lässt, bei der es in der Regel zur Abkapselung kommt. Hauptsächlich betroffenes Organ ist beim Menschen die Leber, es wird jedoch auch von Fällen im Bereich von Lunge und Gehirn berichtet (AYDIN et al. 1986; BÄHR 1981). Von Fällen einer AE im Bereich des Gehirns existieren auch Berichte bei nichtmenschlichen Primaten (KONDO et al. 1996).

5.3.2 Histologische Merkmale

Die histologischen Veränderungen der AE in dieser Studie zeigen die typischen Merkmale, die auch schon von anderen Autoren beschrieben wurden (ECKERT et al. 1983; RIETSCHEL u. KIMMIG 1994; KONDO et al. 1996; BRACK et al. 1997; MÄTZ-RENSING et al. 2002; REHMANN et al. 2003). Typisch sind vor allem die PAS-positiven lamellenartigen Membranen, die die Zystenräume abgrenzen, sowie eine schwere Entzündungszellreaktion mit Beteiligung von Fremdkörperriesenzellen. Das umliegende Gewebe ist meist fibrotisch verändert. Protoskolizes konnten in den hier untersuchten drei Fällen in geringem Maße nachgewiesen werden. Dieser "Mangel" an Protoskolizes scheint mit den Beobachtungen anderer Autoren bei nichtmenschlichen Primaten übereinzustimmen und ist auch beim Menschen typisch (AYDIN et al. 1986; RIETSCHEL u. KIMMIG 1994; BRACK et al. 1997; REHMANN et al. 2003). Im Vergleich dazu ist die Bildung von Protoskolizes bei typischen Zwischenwirten viel häufiger (ECKERT et al. 2001 b). Amyloidablagerungen sind bei einer AE nach Literaturangaben immer wieder zu beobachten (ALI-KHAN u. RAUSCH 1987; ALKARMI et al. 1994; BACCIARINI et al. 2003). ALKARMI et al. (1994) zeigen in ihrer

Studie, dass die Parasitenantigene von *E. multilocularis* amyloidbildend sind, dies jedoch unabhängig ist von Infektionsweg und Infektionsdosis. BACCIARINI et al. (2003) konnten Amyloid in einem mit AE infizierten Javaneraffen (*M. fascicularis*) nachweisen und ALI-KHAN und RAUSCH (1987) berichten von Amyloidablagerungen beim Menschen in Leber und Niere. In dieser Studie wurde versucht, mit Hilfe der Kongorot-Färbung Amyloid nachzuweisen. Es wurden an vereinzelt Stellen in den Leberpräparaten Bereiche festgestellt, die leicht rot erschienen und im Polarisationsmikroskop eine sehr schwache Doppelbrechung aufwiesen. Somit ließ sich in dieser Arbeit, im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren, eine Amyloidbildung nicht mit Bestimmtheit nachweisen.

5.3.3 Ultrastrukturelle Merkmale

Die Ultrastruktur von Echinokokkus-Metazestoden bei verschiedenen Zwischen- und Fehlwirten wurde schon von einigen Autoren beschrieben (MORSETH 1967; SAKAMOTO u. SUGIMURA 1969, 1970; LASCANO et al. 1975; MARCHIONDO u. ANDERSEN 1983; MEHLHORN et al. 1983; LEDUCQ u. GABRION 1992; MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998). Die elektronenmikroskopischen Befunde dieser Studie sind mit den Beobachtungen der vorgenannten Autoren im Wesentlichen vergleichbar.

Laminarschicht:

Die Laminarschicht stellt sich meist als eine dicke Schicht dar, die die Zyste umrandet. Nach MEHLHORN et al. (1983) besteht diese aus einer amorphen Substanz, die während des Zystenwachstums immer homogener werden soll. SAKAMOTO und SUGIMURA (1969) beschreiben die Laminarschicht bestehend aus feinem, extrazellulären und fibrösen Material, welches gleichmäßig verteilt ist. Auch in dieser Studie stellte sich die Laminarschicht als feine und gleichmäßige Substanz dar. Der Ursprung der Laminarschicht ist noch unklar. Es wird vermutet, dass die Laminarschicht aus degenerierenden eosinophilen Granulozyten des Wirtes und aus den aus dem Tegument sezernierten Glykanen gebildet wird (MEHLHORN u. PIEKARSKI 1998). MEHLHORN et al. (1983) fanden Parallelen zwischen der Degeneration

von Zellen des Wirtsabwehrsystems und der Bildung der amorphen Substanz der Laminarschicht. Die Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Wirtsmaterial an der Bildung der Laminarschicht beteiligt ist.

Germinative Schicht:

Die germinative Schicht umfasst nach VOGEL (1978) das Tegument und die undifferenzierten Zellen. Nach SAKAMOTO und SUGIMURA (1969) ist die äußere Oberfläche der germinativen Schicht überzogen mit einem distalen, synzytialen Zytoplasma (tegumentales Zytoplasma), welches durch Mikrovilli an der Laminarschicht befestigt ist. Dies konnte auch in dieser Studie beobachtet werden. MEHLHORN et al. (1983) bezeichnen diese Mikrovilli auch als Mikrotrichen. In dieser Studie wird jedoch der Begriff Mikrovilli beibehalten, da es nicht zu Verwechslungen mit den Mikrotrichen der Protoskolizes kommen soll. Nach SAKAMOTO u. SUGIMURA (1969, 1970) wird das distale, synzytiale Zytoplasma je nach Entwicklungsstadium der Zyste von verschiedenen Zelltypen gebildet. Aus unreifen synzytialen Zellen und hellen undifferenzierten Zellen entwickeln sich später dunkle undifferenzierte Zellen und synzytiale Zellen, aus denen in noch fortgeschritteneren Stadien sogenannte asteroide Transformationszellen, Muskelzellen, Glykogenspeicherzellen und retikuläre, interstitielle Zellen entstehen. Die Glykogenspeicherzellen, Muskelzellen und retikulären Zellen waren ebenfalls in dieser Arbeit darstellbar. Nach MEHLHORN et al. (1983) bleiben einige der undifferenzierten Zellen brückenartig mit dem Tegument verbunden, andere formen durch wiederholte Teilungen Zellaggregate, die später der Bildung von Brutkapseln dienen. Die nach VOGEL (1978) und ECKERT et al. (1983) beschriebenen Sprossungen der germinativen Schicht entstehen nach MEHLHORN et al. (1983) durch die kontinuierlichen Teilungen der undifferenzierten Zellen. Dadurch kommt es zu dem für die AE typischen infiltrativen Wachstum der Zysten in das umliegende Gewebe. Weiterhin führt die Ablösung einiger dieser Zellen und deren Weitertransport über Blut- und Lymphgefäße zur Bildung von Metastasen in anderen Bereichen des Wirtes (MEHLHORN et al. 1983).

Protoskolex:

Nach LEDUCQ und GABRION (1992) werden Protoskolizes in unterschiedliche Entwicklungsstadien unterteilt, in denen sie ultrastrukturelle und biochemische Veränderungen durchmachen. Die jungen Protoskolizes sind knospenähnlich und weisen nur spärlich Mikrovilli auf. Später werden die Mikrovilli im Basisbereich des Protoskolex von stumpfen Mikrotrichen ersetzt. Im Spitzenbereich entstehen zahlreiche Vorsprünge, während stumpfe Mikrotrichen nur auf die Falten von drei kleinen Einziehungen beschränkt bleiben, aus denen sich später das Rostellum entwickelt. In späteren Entwicklungsstadien unterteilt man den Protoskolex in Rostellum, Saugnäpfe und Soma. Im Bereich des Somas werden die Mikrotrichen durch stumpfe Erhebungen ersetzt, was auch in dieser Arbeit erkennbar war. Auch stachelartige Mikrotrichen, die sich im Bereich der späteren Saugnäpfe und des zukünftigen Rostellums befinden, waren darstellbar (LEDUCQ u. GABRION 1992). SAKAMOTO und SUGIMURA (1969) unterteilen die Protoskolizes in ein Vorderende (einschließlich Rostellum und Saugnäpfe) mit stachelartigen Mikrotrichen und in ein Hinterende mit "beulenartigen" oder stumpfen Mikrotrichen. Die stachelartigen Mikrotrichen sind unterteilt in einen apikalen, elektronendichten Teil und einen basalen Teil. Apikaler und basaler Teil der stachelartigen Mikrotrichen werden durch eine schmale, elektronenhelle Zone voneinander separiert. Diese Zone ist durch ein oder zwei elektronendichte Transversallinien zwei - oder dreigeteilt. Diese Beobachtungen konnten in dieser Studie bestätigt werden. Angrenzend an die Basis der Mikrotrichen befindet sich das distale Zytoplasma, in dem sich zahlreiche Vesikel befinden, die auch in dieser Arbeit darstellbar waren. SAKAMOTO und SUGIMURA (1969) bezeichnen dieses distale Zytoplasma als tegumentales Zytoplasma, welches mit den Tegumentzellen (Perikaria oder dem perinukleären Zytoplasma) in Verbindung steht.

5.4 Genetische Untersuchungen

Der MHC hat durch seine wichtige Stellung im Ablauf der Immunreaktion des Organismus eine zentrale Bedeutung für die Forschung im Bereich der Infektionskrankheiten. Eine Grundlage für immunologische Studien von Infektionskrankheiten sollte es daher sein, den

MHC von verschiedenen Spezies möglichst vollständig zu charakterisieren. Dies war einer der Gedanken, die am Anfang dieses Teils der Arbeit standen. Um weitergehende Untersuchungen in Bezug auf die alveoläre Echinokokkose bei Bartaffen durchführen zu können, müssen Grundlagen geschaffen werden. Ziel dieser Studie war es deshalb, neben den schon beschriebenen morphologischen Untersuchungen zur AE, Teile des MHCs von Bartaffen genetisch zu charakterisieren.

5.4.1 Zusammenhänge zwischen MHC und alveolärer Echinokokkose

EIERMANN et al. (1998) untersuchten den MHC des Menschen in Bezug auf die alveoläre Echinokokkose. Sie vermuteten, dass ein MHC-Polymorphismus die Resistenz des Wirtes gegenüber einer AE, sowie den Krankheitsverlauf beeinflusst. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass HLA-DRB1*11 einen Schutz vor einer Infektion mit *E. multilocularis* liefert, während HLA-DQB1*02 wahrscheinlich ein Risikofaktor für eine progressiv fortschreitende AE ist. Untersuchungen dieser Art konnten in dieser Studie noch nicht durchgeführt werden, da hierfür Daten in nicht ausreichender Zahl erhoben werden konnten. Es wurden insgesamt 10 Bartaffen untersucht, einschließlich eines der Tiere, das an AE verstorben war. Daher war ein signifikanter Zusammenhang zwischen der AE und bestimmten MHC-Merkmalen nicht zu bestimmen. Es ist deshalb wichtig, die Untersuchungen zum MHC bei Bartaffen weiterzuführen.

Auffällig ist jedoch, dass bei Tier 6434 (eines der an AE verstorbenen Tiere) dieselben Allele gefunden wurden, wie bei dem serologisch positiven Tier (1252) aus der derzeitigen DPZ-Bartaffenkolonie. Dies lässt vermuten, dass ein oder mehrere dieser drei Allele für eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber *E. multilocularis* verantwortlich sein könnten. Das serologisch positive Tier (1252) ist die Schwester von Tier 5006, welches eines der drei an AE verstorbenen Tiere ist. Diese beiden Tiere teilen mit großer Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Allel, welches die Empfänglichkeit gegenüber der AE erhöht. Leider konnte Tier 5006 nicht in die genetischen Untersuchungen einbezogen werden, da keine entsprechenden Proben zur Verfügung standen.

Durch nähere Betrachtung der verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der DPZ-Bartaffen-Kolonie können Vermutungen angestellt werden, was die Empfänglichkeit gegenüber einer AE betrifft. Die im Anhang aufgelisteten Stammbäume der Bartaffen (Kap. 9.6) geben einen Überblick über diese verwandtschaftlichen Verhältnisse. Auffällig ist, dass die drei an AE verstorbenen Bartaffen Hanna (5006), Ida (5092) und Heinrich (6434) sowie das serologisch positive Tier der jetzigen Bartaffenkolonie (Marina, 1252) zwei gemeinsame Vorfahren haben – die Tiere mit den Zuchtbuchnummern 591 und 884. Hanna und Marina sind Schwestern. Das Tier mit der Zuchtbuchnummer 591 ist der „Großvater“ von Hanna, Ida, Marina und Heinrich. Tier 884 ist die „Großmutter“ von Ida und die „Urgroßmutter“ von Hanna, Marina und Heinrich. Bringt man diese verwandtschaftlichen Verhältnisse in Zusammenhang mit der AE, können zumindest Vermutungen gemacht werden:

Die Tiere der DPZ-Bartaffen-Kolonie, die an AE erkrankt sind bzw. serologisch positiv sind, haben gemeinsame Vorfahren. Daraus lässt sich schließen, dass die Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *E. multilocularis* genetisch bedingt ist. Die Bedeutung der MHC-Gene für die Empfänglichkeit gegenüber einer AE ist im Moment jedoch nicht einzuschätzen. Marina (das serologisch positive Tier) und Heinrich (das an AE verstorbene Tier) haben zwar die gleiche MHC-DRB-Gen-Kombination (Tab. 7), für eine genaue Aussage ist die Tierzahl in dieser Studie aber zu gering. Weiterhin könnte man vermuten, dass alle Tiere, bei denen die Tiere 591 und 884 zu den Vorfahren gehören, gefährdet sein könnten. Dies trifft auf 6 weitere Tiere der DPZ-Bartaffen-Kolonie zu: Ronja (6433), Pelle (7194), Michel (8295), Jette (8113), Stina (11175) und Skrolan (11439). Sie sind alle mit den an AE verstorbenen Bartaffen verwandt. Diese Tiere, einschließlich Marina (1252), sollten veterinärmedizinisch sorgfältig überwacht werden.

5.4.2 Identifizierung von *Masi* MHC-Klasse-II-Allelen

Die in dieser Studie nachgewiesenen MHC-*DRB*-Allele der Bartaffen gehören zu Linien, die auch in anderen Primatenspezies vorkommen (siehe IPD Nonhuman Primate MHC database: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/nhp>). Von den neun *DRB* Allelen, die in dieser Studie gefunden wurden, gehören acht zu verschiedenen Allellinien. Außer *Masi-DRB*W3501* gehören die anderen zu Allellinien, die auch in Rhesusaffen vorkommen (BLANKENBURG et al. 2003). Der in Abbildung 25 dargestellte phylogenetische Baum der MHC-*DRB*-Allele der untersuchten Bartaffen und anderer Makaken lässt erkennen, dass die DNA-Sequenzen einer Allellinie ähnlicher sind als alle Sequenzen innerhalb einer Art. Dies lässt darauf schließen, dass die Allellinien schon vor der Entstehung der Makakenarten existierten (Transspezies-Theorie der MHC-Evolution) (KLEIN 1987). Das Fehlen einer Konservierung von *DRB*-Haplotypen scheint ein Zeichen für eine häufige Reorganisation der *DRB*-Region zu sein, welche für alle Makaken charakteristisch sein könnte.

Bei den in dieser Studie untersuchten Bartaffen wurde, trotz der Ähnlichkeiten der Allele, kein Beweis für eine Transspezieskonservierung von *DRB*-Haplotypen festgestellt. So ist zum Beispiel beim Rhesusaffen *Mamu-DRB*W401* gekoppelt mit *Mamu-DRB*W303* (KHAZAND et al. 1999; DOXIADIS et al. 2000). Bei den Bartaffen wurden zwar ähnliche Allele festgestellt, diese befanden sich jedoch nicht zusammen in denselben Tieren. Obwohl nur eine begrenzte Zahl von *DRB*-Sequenzen bei den Bartaffen gefunden wurde, scheint es aufgrund der Zugehörigkeit zu vielen verschiedenen Allellinien doch eine beachtliche Diversität zu geben. Dies kann die funktionelle Diversität erhöhen, auch wenn die Nukleotidvariation im gesamten Genom niedrig ist (DEINARD u. SMITH 2001).

Weitere Studien sind nötig unter Einbeziehung einer größeren Anzahl an Tieren sowie verwandter Gruppen, um zu untersuchen, ob Bartaffen tatsächlich eine hohe Diversität auf der Allellinienebene zeigen (trotz der niedrigen genetischen Diversität im gesamten Genom), und ob die *DRB*-Region von Bartaffen ähnlich organisiert ist wie bei den Rhesusaffen. Außerdem könnte die Erforschung des MHC nützlich sein, um funktionelle immunologische Studien zu unterstützen und somit zur Sicherung der gefährdeten Spezies beizutragen.

6 Zusammenfassung

Anja Blankenburg (2004)

Untersuchungen zur alveolären Echinokokkose bei Bartaffen (*Macaca silenus*).

Die alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine Erkrankung, die vom Larvenstadium des Fuchsbandwurmes (*E. multilocularis*) ausgelöst wird und bei Zwischen- und Fehlwirten auftritt. Zu diesen Fehlwirten zählen neben dem Menschen auch nichtmenschliche Primaten. In der Bartaffenkolonie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ), Göttingen traten drei Fälle einer AE auf, die aufgrund einer infausten Prognose euthanasiert wurden. Dies wurde zum Anlass genommen, die Bartaffenkolonie des DPZ (aktuelle Grösse: 11 Tiere) hinsichtlich möglicher weiterer Infektionen mit *E. multilocularis* zu untersuchen und die Veränderungen der drei betroffenen Tiere umfassend pathomorphologisch zu charakterisieren.

Als morphologische Methoden kamen neben der Sektion umfassende lichtmikroskopische Untersuchungen einschließlich Immunhistochemie und transmissionselektronenmikroskopische Analysen zur Anwendung. Weiterhin wurden klinische Untersuchungen (Serologie, Hämatologie, Ultrasonographie) bei den lebenden Bartaffen der Kolonie durchgeführt. Folgende Ergebnisse lassen sich festhalten:

1. Die AE zeigt bei Bartaffen ein ähnliches Bild wie bei anderen nichtmenschlichen Primaten und beim Menschen. Unterschiede fanden sich im Grad der Ausbreitung der Metazestodenstrukturen. Bei der Röntgenuntersuchung eines der an AE erkrankten Tiere konnten die parasitären Veränderungen gut dargestellt werden. Bei den drei betroffenen Bartaffen dieser Studie war das Hauptmanifestationsorgan die Leber. Bei einem Tier hatte sich der Prozess auch auf Lunge und Mediastinum ausgedehnt. Histologisch war ein schwerer mit umfangreichen entzündlichen Veränderungen einhergehender Umbau der Leber mit charakteristischen parasitären Zystenstrukturen feststellbar. In den Zysten wurden Protoskolizes nachgewiesen. Immunhistochemisch konnten Echinokokken-Antigene besonders im Gebiet der germinativen Schicht und der Protoskolizes

nachgewiesen werden.

2. Ultrastrukturell ließen sich im Bereich der germinativen Schicht Muskelzellen, Glykogenspeicherzellen, retikuläre Zellen sowie undifferenzierte Zellen darstellen. Bei den Protoskolizes wurden Mikrotrichen festgestellt, die im Gebiet des zukünftigen Rostellums stachelartig waren. Im hinteren Bereich der Protoskolizes ließen sich stumpfe Mikrotrichen nachweisen. Im Inneren der Protoskolizes konnten Muskelzellen und Glykogengranula dargestellt werden.
3. Bei den klinischen Untersuchungen ergaben sich nur eingeschränkte Aussagemöglichkeiten. Bei einem Tier konnten serologisch Antikörper gegen *E. multilocularis* festgestellt werden. Die ultrasonographischen Untersuchungen waren bei den lebenden Tieren wenig aussagekräftig.

Ausgehend von einem erhöhten Infektionsrisiko bei Bartaffen wurden weiterhin genetische Untersuchungen der MHC-Region initiiert, um denkbare Zusammenhänge mit der Echinokokkose weiter verfolgen zu können. Ein weiterer Aspekt dieser Studie war deshalb die Charakterisierung des MHC Klasse II von Bartaffen, die in der vorliegenden Arbeit erstmalig bei dieser Spezies durchgeführt wurde. Es wurden die *DRB*-Gene von insgesamt 10 Bartaffen untersucht. Davon war ein Tier an AE verstorben und ein weiteres war serologisch positiv. Folgende Ergebnisse wurden bei den genetischen Untersuchungen erzielt:

1. Es wurden neun verschiedene *DRB*-Sequenzen bei zehn untersuchten Bartaffen nachgewiesen, von denen acht zu verschiedenen Allellinien gehören.
2. Die nachgewiesenen Allele der Bartaffen gehören zu Linien, die auch in anderen Primatenspezies vorkommen.
3. Zusammenhänge zwischen bestimmten *MHC-DRB* Eigenschaften und der Empfänglichkeit gegenüber einer AE konnten nicht festgestellt werden. Auffällig war aber, dass das an AE verstorbene und das serologisch positive, noch lebende Tier dieselben Allele hatten. Stammbaumdarstellungen zeigten weiterhin, dass eine genetische Prädisposition gegenüber der Empfänglichkeit für eine AE sehr wahrscheinlich ist.

Eine weitere Beobachtung der Bartaffenkolonie des DPZ und nähere Untersuchungen zum MHC bei Bartaffen unter Einbeziehung der Verwandtschaftsverhältnisse ist nach den vorliegenden Ergebnissen anzuraten.

7 Summary

Anja Blankenburg (2004)

Investigations on alveolar echinococcosis in lion-tailed macaques (*Macaca silenus*).

Alveolar echinococcosis (AE) is a disease which is caused by larval stages of the fox tapeworm (*E. multilocularis*) and occurs in intermediate and aberrant hosts. Aberrant hosts are humans but also nonhuman primates. Three cases of AE were observed in the colony of lion-tailed macaques of the German Primate Center (GPC), Göttingen. These animals were euthanized because of poor prognosis. This gave reason to examine the whole lion-tailed macaque colony of the GPC (current size: 11 individuals) for further infections with *E. multilocularis* and to characterize the alterations of the three infected animals pathomorphologically.

Morphological methods comprised necropsies and comprehensive light microscopic examinations including immunohistochemistry and transmission electron microscopy. Furthermore clinical investigations (serology, haematology, ultrasonics) of living lion-tailed macaques of the colony were carried out. The following results could be established:

1. AE shows a similar pattern in lion-tailed macaques, other nonhuman primates and humans. There is a difference in the degree of spreading of the cystical structures. X-ray examination of one animal infected with *E. multilocularis* revealed definite parasitic alterations. The liver of the three infected lion-tailed macaques was the main manifestation organ. In one of them the disease had also spread into the lungs and the mediastinum. Histologically a severe transformation of liver tissue with extensive inflammation and typical parasitic cystic structures was observed. Protoscolices could be detected in the cysts. Immunohistochemically echinococcal antigens were located predominantly within the germinal layer and the protoscolices.
2. Ultrastructural examination revealed muscle cells, glycogen-storing cells, reticular cells and undifferentiated cells within the germinal layer. Microtriches with different shapes

were observed in the protoscolices: in the region of the future rostellum and suckers the microtriches showed a spine-like structure and appeared knob-like in the posterior part of the protoscolex. Muscle cells and glycogen granules could be detected inside the protoscolices.

3. Clinical examinations did not provide significant data. Antibodies against *E. multilocularis* were detected in one animal of the colony. The ultrasonic investigations also showed no significant results.

Assuming a higher risk of infection in lion-tailed macaques genetic investigations of the MHC region were initiated to pursue possible connections with echinococcosis. For this reason the characterization of the MHC class II of lion-tailed macaques was an additional aspect of this study and was carried out in this species for the first time. *DRB* genes of 10 lion-tailed macaques in all were investigated. One of these animals died of AE and another animal developed antibodies against *E. multilocularis*. The following results were achieved:

1. Nine different *DRB* sequences were detected in ten lion-tailed macaques. Eight of these sequences belong to different allelic lineages.
2. The proven alleles of the lion-tailed macaques belong to allelic lineages which also occur in other primate species.
3. Significant connections between certain MHC *DRB* features and the susceptibility to an AE could not be detected. However, it could be noted that the animal which died of AE and the animal which was serologically positive possess the same alleles. Interpretations of pedigrees showed a potential genetical predisposition to an increased susceptibility to alveolar echinococcosis in lion-tailed macaques.

Considering the present results it is advisable to continue observing the lion-tailed macaque colony and to carry out more detailed MHC investigations in this species including the kinships.

8 Literaturverzeichnis

ALI-KHAN, Z., u. R. L. RAUSCH (1987):

Demonstration of amyloid and immune complex deposits in renal and hepatic parenchyma of alaskan alveolar hydatid disease patients.

Ann. Trop. Med. Parasitol. 81, 381-392

ALKARMI, T., F. K. DAR u. H.-K. OOI (1994):

Echinococcus multilocularis: Effect of size of inoculum and route of infection on metastasis, amyloidogenesis and alveolar hydatid cyst mass in mice.

J. Vet. Med. Sci. 56, 335-339

AMMANN, R., u. J. ECKERT (1995):

Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans.

In: R. C. A. THOMPSON u. A. J. LYMBERY (Hrsg.): *Echinococcus* and hydatid disease.

CAB International, Wallingford, Oxon, UK, S. 411-463

AMMANN, R. W., u. J. ECKERT (1996):

Cestodes. *Echinococcus*.

Gastroenterol. Clin. North Am. 25, 655-689

AYDIN, Y., O. BARLAS, C. YOLAS, I. H. AYDIN, A. CEVIZ, A. ALADAG, D. ÖREN u. D. AKDEMIR (1986):

Alveolar hydatid disease of the brain.

J. Neurosurg. 65, 115-119

BACCIARINI, L. N., B. GOTTSSTEIN, O. PAGAN u. A. GRÖNE (2003):

Hepatic alveolar echinococcosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).

In: Proceedings of the 21st annual meeting, ESVP, Dublin 2003, S. 113

BÄHR, R. (1981):

Die Echinokokkose des Menschen.

Enke Verlag, Stuttgart

BALLEK, D., M. TAKLA, S. ISING-VOLMER u. M. STOYE (1992):

Zur Helminthenfauna des Rotfuchses (*Vulpes vulpes* LINNÉ 1758) in Nordhessen und Ostwestfalen.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 99, 362-365

BAUMGARTNER, R. (1990):

Echinokokken bei Affen im Züricher Zoo.

10. Arbeitstagung der Zootierärzte im deutschsprachigen Raum, Basel 1990, S. 49-50

BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER
u. D. C. WILEY (1987 a):

The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.

Nature 329, 512-518

BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER
u. D. C. WILEY (1987 b):

Structure of the human class I histocompatibility antigen, *HLA-A2*.

Nature 329, 506-512

BLANKENBURG, A., F.-J. KAUP u. U. SAUERMAN (2003):

MHC class II *DRB* sequences of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*).

Tissue Antigens 62, 267-269

BLANKENBURG, A., K. MÄTZ-RENSING, A. DINKEL, U. SAUERMANN u. F.-J. KAUP (2002):

Spontaneous echinococcosis in a colony of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*).

In: Proceedings of the combined meeting of the EAZWV and the EWDA, Heidelberg 2002, S. 367-370

BLANKENBURG, A., U. SAUERMANN u. F.-J. KAUP (2001):

Spontaneous echinococcosis in a colony of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*).

Folia Primatol. 72, 156-156

BONTROP, R. E., N. OTTING, N. G. DE GROOT u. G. G. M. DOXIADIS (1999):

Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates.

Immunol. Rev. 167, 339-350

BOYSON, J. E., K. K. IWANGA, T. G. GOLOS u. D. I. WATKINS (1996 a):

Identification of the rhesus monkey *HLA-G* ortholog: *Mamu-G* is a pseudogene.

J. Immunol. 157, 5428-5437

BOYSON, J. E., C. SHUFFLEBOTHAM, L. F. CADAVID, J. A. URVATER, L. A. KNAPP, A. L. HUGHES u. D. I. WATKINS (1996 b):

The MHC class I genes of the rhesus monkey: Different evolutionary histories of MHC class I and II genes in primates.

J. Immunol. 156, 4656-4665

BRACK, M., K. TACKMANN, F. J. CONRATHS u. S. RENSING (1997):

Alveolar hydatidosis (*Echinococcus multilocularis*) in a captive rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in Germany.

Trop. Med. Int. Health. 2, 754-759

BROWN, J. H., T. S. JARDETZKY, J. C. GORGA, L. J. STERN, R. G. URBAN,
J. L. STROMINGER u. D. C. WILEY (1993):
Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen *HLA-DRI*.
Nature 364, 33-39

CALLAGHAN, C. A., u. J. I. BELL (1998):
Structure and function of the human MHC class Ib molecules *HLA-E*, *HLA-F* and *HLA-G*.
Immunol. Rev. 163, 129-138

CARLSTEAD, K., u. D. SHEPHERDSON (1994):
Effects of environmental enrichment on reproduction.
Zoo Biology 13, 447-458

CHEN, Z. W., S. N. MCADAM, A. L. HUGHES, A. L. DOGON, N. L. LETVIN u.
D. I. WATKINS (1992):
Molecular cloning of orangutan and gibbon MHC class I cDNA: The *HLA-A* and *-B* loci
diverged over 30 million years ago.
J. Immunol. 148, 2547-2554

CRAIG, P. S., L. DESHAN, C. N. L. MACPHERSON, S. DAZHONG, D. REYNOLDS,
G. BARNISH, B. GOTTSTEIN u. W. ZHIRONG (1992):
A large focus of alveolar echinococcosis in central China.
Lancet 340, 826-831

DEINARD, A., u. D. G. SMITH (2001):
Phylogenetic relationships among the macaques: Evidence from the nuclear locus *NRAMP1*.
J. Hum. Evol. 41, 45-59

DEPLAZES, P., u. J. ECKERT (2001):
Veterinary aspects of alveolar echinococcosis - a zoonosis of public health significance.
Vet. Parasitol. 98, 65-87

DINKEL, A. (1998):

Spezifischer Nachweis von *Echinococcus multilocularis* - DNA aus End- u. Zwischenwirten.
Hohenheim, Univ., Inst. f. Zoologie, Fachber. Parasitologie, Diss.

DOXIADIS, G. G. M., N. OTTING, N. G. DE GROOT, R. NOORT u. R. E. BONTROP
(2000):

Unprecedented polymorphism of MHC-*DRB* region configurations in rhesus macaques.
J. Immunol. 164, 3193-3199

DOXIADIS, G. G. M., N. OTTING, N. G. DE GROOT, N. DE GROOT,
A. J. M. ROUWELER, R. NOORT, E. J. VERSCHOOR, I. BONTJER u. R. E. BONTROP
(2003):

Evolutionary stability of MHC class II haplotypes in diverse rhesus macaque populations.
Hum. Immunol. 64, 163

DUJARDIN, L. (1993):

Organization of the *Echinococcus multilocularis* cyst: analytical study of histological sections
by means of a neural network.

Acta Biotheor. 41, 97-103

DZURIS, J. L., J. SIDNEY, E. APPELLA, R. W. CHESNUT, D. I. WATKINS u. A. SETTE
(2000):

Conserved MHC class I peptides binding motif between humans and rhesus macaques.
J. Immunol. 164, 283-291

ECKERT, J. (1996):

Der "gefährliche Fuchsbandwurm" (*Echinococcus multilocularis*) und die alveoläre
Echinokokkose des Menschen in Mitteleuropa.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 109, 202-210

ECKERT, J. (1997):

Epidemiology of *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in central europe.

Parassitologia 39, 337-344

ECKERT, J. (1998):

Alveolar echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*) and other forms of echinococcosis (*Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*).

In: S. R. PALMER, LORD SOULSBY u. D. I. H. SIMPSON (Hrsg.): Zoonoses - biology, clinical practice and public health control. Oxford Univ. Press, Oxford, S. 689-716

ECKERT, J., u. P. DEPLAZES (1999):

Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in central europe and the need for countermeasures.

Parasitol. Today 15, 315-319

ECKERT, J., P. DEPLAZES, P. S. CRAIG, M. A. GEMMELL, B. GOTTSSTEIN, D.

HEATH, D. J. JENKINS, M. KAMIYA u. M. LIGHTOWLERS (2001 a):

Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment.

In: J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (Hrsg.):

WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris, S. 72-99

ECKERT, J., M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (2001 b):

WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern.

World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris

- ECKERT, J., R. L. RAUSCH, M. A. GEMMELL, P. GIRAUDOUX, M. KAMIYA, F.-J. LIU, P. M. SCHANTZ u. T. ROMIG (2001 c):
Epidemiology of *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* and *Echinococcus oligarthrus*.
In: J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (Hrsg.):
WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris, S. 164-182
- ECKERT, J., P. M. SCHANTZ, R. B. GASSER, P. R. TORGERSON, A. S. BESSONOV, S. O. MOVSESSIAN, A. THAKUR, F. GRIMM u. M. A. NIKOGOSSIAN (2001 d):
Geographic distribution and prevalence.
In: J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (Hrsg.):
WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris, S. 100-142
- ECKERT, J., R. C. A. THOMPSON u. H. MEHLHORN (1983):
Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis* I. Animal model, macroscopical and histological findings.
Z. Parasitenkd. 69, 737-748
- EIERMANN, T. H., F. BETTENS, P. TIBERGHIE, K. SCHMITZ, I. BEURTON, S. BRESSON-HADNI, R. W. AMMANN, S. F. GOLDMANN, D.-A. VUITTON, B. GOTTSTEIN u. P. KERN (1998):
HLA and alveolar echinococcosis.
Tissue Antigens 52, 124-129
- ENGE, A. (1996):
Ergebnisse der Untersuchungen von Füchsen auf *Echinococcus multilocularis* im Freistaat Sachsen im Zeitraum 1990 bis 1995.
RKI-Hefte 14, 111-113

FREMONT, D. H., M. MATSUMURA, E. A. STURA, P. A. PETERSON u. I. A. WILSON (1992):

Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b.

Science 257, 919-927

FROSCH, P. M., C. GEIER, F.-J. KAUP, A. MÜLLER u. M. FROSCH (1993):

Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease.

Mol. Biochem. Parasitol. 58, 301-310

GARBOCZI, D. N., P. GHOSH, U. UTZ, Q. R. FAN, W. E. BIDDISON u. D. C. WILEY (1996):

Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and *HLA-A2*.

Nature 384, 134-141

GARVER, J. J., A. M. ESTOP, P. MEERA KHAN, H. BALNER u. P. L. PEARSON (1980):

Evidence of similar organization of the chromosomes carrying the major histocompatibility complex in man and other primates.

Cytogenet. Cell Genet. 27, 238-245

GEISEL, O., D. BARUTZKI, G. MINKUS, W. HERMANNNS u. T. LÖSCHER (1990):

Hunde als Fintenträger (Intermediärwirt) von *Echinococcus multilocularis*.

Kleintier-Prax. 35, 275-280

GLEDHILL, L. G. (1997):

Lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) international studbook.

Woodland Park Zoo, Seattle

GOTTSTEIN, B. (2000):

Epidemiologie und Systematik der cystischen und alveolären Echinokokkose.

Chirurg 71, 1-8

GOTTSTEIN, B., P. JACQUIER, S. BRESSON-HADNI u. J. ECKERT (1993):
Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using the Em2^{plus} Antigen.

J. Clin. Microbiol. 31, 373-376

GRZIMEK, B. (1987):

Grzimeks Enzyklopädie. Säugetiere.

Bd. 4, Kindler Verlag GmbH, München

GRZIMEK, B. (1988 a):

Grzimeks Enzyklopädie. Säugetiere.

Bd. 2, Kindler Verlag GmbH, München

GRZIMEK, B. (1988 b):

Grzimeks Enzyklopädie. Säugetiere.

Bd. 3, Kindler Verlag GmbH, München

HALLER, M., P. DEPLAZES, F. GUSCETTI, J. C. SARDINAS, I. REICHLER u.

J. ECKERT (1998):

Surgical and chemotherapeutic treatment of alveolar echinococcosis in a dog.

J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 34, 309-314

HELBIG, M., P. FROSCH, P. KERN u. M. FROSCH (1993):

Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens.

J. Clin. Microbiol. 31, 3211-3215

HEYD, B., L. WEISE, V. BETTSCHART u. M. GILLET (2000):

Chirurgische Therapie beim *Echinococcus alveolaris* der Leber.

Chirurg 71, 16-20

HILL, A. V. S. (1998):

The immunogenetics of human infectious diseases.

Annu. Rev. Immunol. 16, 593-617

HIRAI, M., E. TAKAHASHI, T. ISHIDA u. T. HORI (1991):

Chromosomal localization of the major histocompatibility complex (MHC) in the rhesus monkey and chimpanzee by fluorescence in situ hybridization.

Cytogenet. Cell Genet. 57, 204-205

HOHMANN, G. (1988):

A case of simple tool use in wild liontailed macaques (*Macaca silenus*).

Primates 29, 565-567

HUNT, D. F., H. MICHEL, T. A. DICKINSON, J. SHABANOWITZ, A. L. COX,
K. SAKAGUCHI, E. APPELLA, H. M. GREY u. A. SETTE (1992):

Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d.

Science 256, 1817-1820

JANEWAY, C. A., u. P. TRAVERS (1997):

Immunologie.

2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

JARDETZKY, T. S., W. S. LANE, R. A. ROBINSON, D. R. MADDEN u. D. C. WILEY
(1991):

Identification of self peptides bound to purified *HLA-B27*.

Nature 353, 326-329

JENSEN, B., S. REUTER, W. KRATZER, K. NASER, V. KÄCHELE, P. KIMMIG u.
P. KERN (2001):

Long-term seropositivity against *Echinococcus multilocularis* in an epidemiological follow-up study in southwestern Germany (Römerstein).

Infection 29, 310-314

KAUMANN, W., P. SCHMID, C. SCHWITZER, A. HUSUNG u. C. KNOGGE (2001):

The european population of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*): Status and problems.

Primate Report 59, 65-75

KAUMANN, W., M. SINGH, W. BEISENHERZ, C. SCHWITZER u. C. KNOGGE (2000):

Bartaffen und ihr Lebensraum.

Zeitschrift des Kölner Zoo 4, 147-168

KAUMANN, W., D. ZINNER u. J. HINDAHL (1998):

Experimentelle Gruppenbegegnungen als Mittel zur sozialen Stimulans bei in Menschenhand gehaltenen Bartaffen (*Macaca silenus*).

Zool. Garten N. F. 68, 45-55

KERN, P., J. G. WECHSLER, W. LAUCHART u. R. KUNZ (1994):

Klinik und Therapie der alveolären Echinokokkose.

Dtsch. Ärztebl. 91, C1617-C1622

KHAZAND, M., C. PEIBERG, M. NAGY u. U. SAUERMAN (1999):

MHC-DQ-DRB haplotype analysis in the rhesus macaque: Evidence for a number of different haplotypes displaying a low allelic polymorphism.

Tissue Antigens 54, 615-624

KIMMIG, P., u. U. SCHELLING (1991):

Aktuelle Probleme der Echinokokkose (*Echinococcus multilocularis*).

Öff. Gesundh.-Wes. 53, 596-599

KIUEPEL, H. (1996):

Zur epidemiologischen Situation des *Echinococcus multilocularis* in Mecklenburg-Vorpommern.

RKI-Hefte 14, 123

KLEIN, J. (1987):

Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis.

Hum. Immunol. 19, 155-162

KLEIN, J., R. E. BONTROP, R. L. DAWKINS, H. A. ERLICH, U. B. GYLLENSTEN, E. R. HEISE, P. P. JONES, P. PARHAM, E. K. WAKELAND u. D. I. WATKINS (1990):
Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal.

Immunogenetics 31, 217-219

KNAPP, L. A., L. F. CADAVID, M. E. EBERLE, S. J. KNECHTLE, R. E. BONTROP u. D. I. WATKINS (1997):

Identification of new *Mamu-DRB* alleles using DGGE and direct sequencing.

Immunogenetics 45, 171-179

KOLAROVA, L. (1999):

Echinococcus multilocularis: New epidemiological insights in central and eastern europe.

Helminthologia 36, 193-200

KONDO, H., Y.WADA, G.BANDO, M.KOSUGE, K.YAGI u. Y.OKU (1996):

Alveolar hydatidosis in a Gorilla and a Ring-tailed Lemur in Japan.

J. Vet. Med. Sci. 58, 447-449

LASCANO, E. F., E. A. COLTORTI u. V. M. VARELA-DIAZ (1975):

Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts.

J. Parasitol. 61, 853-860

LEDUCQ, R., u. C. GABRION (1992):

Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites.

Parasitology 104, 129-141

LUFT, I. H. (1961):

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414

MADDEN, D. R., J. C. GORGA, J. L. STROMINGER u. D. C. WILEY (1991):

The structure of *HLA-B27* reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation.

Nature 353, 321-325

MARCHIONDO, A. A., u. F. L. ANDERSEN (1983):

Fine structure and freeze-etch study of the protoscolex tegument of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda).

J. Parasitol. 69, 709-718

MÄTZ-RENSING, K., M. ZÖLLER, G. HABERMALZ, A. DINKEL u. F.-J. KAUP (2002):

Alveoläre Echinokokkose bei einem Hund.

Kleintier-Prax. 47, 683-688

MEHLHORN, H., J. ECKERT u. R. C. A. THOMPSON (1983):

Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis* II.

Ultrastructural Investigations.

Z. Parasitenkd. 69, 749-763

MEHLHORN, H., u. G. PIEKARSKI (1998):

Grundriß der Parasitenkunde.

5. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena

MIYAUCHI, T., M. SAKUI, M. ISHIGE, S. FUKUMOTO, A. UEDA, M. ITO u.
M. OHBAYASHI (1984):

A case of multilocular echinococcosis in a horse.

Jpn. J. Vet. Res. 32, 171-173

MORSETH, D. J. (1967):

Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*.

J. Parasitol. 53, 312-325

MÜLHARDT, C. (2000):

Der Experimentator: Molekularbiologie.

2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

NEBEL, W. (1996):

Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen auf *Echinococcus multilocularis* in Schleswig-Holstein.

RKI-Hefte 14, 97

PAMIR, M. N., A. F. ÖZER, G. E. KELES, N. TÖZÜN, N. GÜRMEEN u. S. KÜLLÜ (1991):
Cerebral echinococcosis multilocularis. Case report.

J. Neurosurg. Sci. 35, 161-164

PAWLOWSKI, Z. S., J. ECKERT, D. A. VUITTON, R. W. AMMANN, P. KERN,
P. S. CRAIG, K. F. DAR, F. DE ROSA, C. FILICE, B. GOTTSTEIN, F. GRIMM,
C. N. L. MACPHERSON, N. SATO, T. TODOROV, J. UCHINO, W. VON SINNER u.
H. WEN (2001):

Echinococcosis in humans: Clinical aspects, diagnosis and treatment.

In: J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (Hrsg.):

WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: A public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris, S. 20-71

PFISTER, T., u. W. FRANK (1988):

Experimentelle Untersuchungen zur Empfänglichkeit des Schweines für *Echinococcus multilocularis*.

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10, 103-114

PFISTER, T., V. SCHAD, U. SCHELLING, R. LUCIUS u. W. FRANK (1993):

Incomplete development of larval *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae) in spontaneously infected wild boars.

Parasitol. Res. 79, 617-618

REHMANN, P., A. GRÖNE, A. LAWRENZ, O. PAGAN, B. GOTTSTEIN u.

L. N. BACCIARINI (2003):

Echinococcus multilocularis in two lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*).

J. Comp. Pathol. 129, 85-88

REUTER, S., W. KRATZER, S. KURZ, N. WELLINGHAUSEN u. P. KERN (1998):

Chemotherapie der alveolären Echinokokkose mit Benzimidazolen. Eine prospektive Langzeituntersuchung.

Med. Klin. 93, 463-467

RICHARDSON, K. C., L. JARETT u. E. H. FINKE (1960):

Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy.

Stain Techn. 35, 313-317

RIETSCHEL, W., u. P. KIMMIG (1994):

Alveoläre Echinokokkose bei einem Javaneraffen.

Tierärztl. Prax. 22, 85-88

ROBINSON, J., M. J. WALLER, P. PARHAM, N. DE GROOT, R. BONTROP,
L. J. KENNEDY, P. STOEHR u. S. G. E. MARSH (2003):

IMGT/HLA and IMGT/MHC: Sequence databases for the study of the major
histocompatibility complex.

Nucleic Acids Res. 31, 311-314

ROMIG, T., B. BILGER, A. DINKEL, M. MERLI u. U. MACKENSTEDT (1999 a):

Echinococcus multilocularis in animal hosts: New data from western europe.

Helminthologia 36, 185-191

ROMIG, T., B. BILGER u. U. MACKENSTEDT (1999 b):

Zur aktuellen Verbreitung und Epidemiologie von *Echinococcus multilocularis*.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106, 352-357

ROMIG, T., W. KRATZER, P. KIMMIG, M. FROSCH, W. GAUS, W. A. FLEGEL,
B. GOTTSTEIN, R. LUCIUS, K. BECKH u. P. KERN (1999 c):

An epidemiologic survey of human alveolar echinococcosis in southwestern germany.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 61, 566-573

ROMMEL, M., J. ECKERT, E. KUTZER, W. KÖRTING u. T. SCHNIEDER (2000):

Veterinärmedizinische Parasitologie.

5. Aufl., Parey Buchverlag, Berlin

ROWE, N. (1996):

The pictorial guide to the living primates.

Pogonias Press, East Hampton, New York

RÖTZSCHKE, O., K. FALK, K. DERES, H. SCHILD, M. NORDA, J. METZGER, G. JUNG
u. H.-G. RAMMENSEE (1990):

Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells.

Nature 348, 252-254

RUDENSKY, A. Y., P. PRESTON-HURLBURT, S.-C. HONG, A. BARLOW u.

C. A. JANEWAY JR (1991):

Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules.

Nature 353, 622-627

SAKAMOTO, T., u. M. SUGIMURA (1969):

Studies on echinococcosis XXI. Electron microscopical observations on general structure of larval tissue of multilocular echinococcus.

Jpn. J. Vet. Res. 17, 67-80

SAKAMOTO, T., u. M. SUGIMURA (1970):

Studies on echinococcosis XXIII. Electron microscopical observations on histogenesis of larval *Echinococcus multilocularis*.

Jpn. J. Vet. Res. 18, 131-144

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH u. T. MANIATIS (1989):

Molecular cloning: A laboratory manual.

2. Aufl., Bd. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

SAPER, M. A., P. J. BJORKMAN u. D. C. WILEY (1991):

Refined structure of the human histocompatibility antigen *HLA-A2* at 2.6 Å resolution.

J. Mol. Biol. 219, 277-319

SAUERMAN, U. (1998):

DQ-haplotype analysis in rhesus macaques: Implications for the evolution of these genes.

Tissue Antigens 52, 550-557

SAUERMAN, U., C. STAHL-HENNIG, N. STOLTE, T. MÜHL, M. KRAWCZAK, M. SPRING, D. FUCHS, F.-J. KAUP, G. HUNSMANN u. S. SOPPER (2000):
Homozygosity for a conserved MHC class II *DQ-DRB* Haplotype is associated with rapid disease progression in Simian Immunodeficiency Virus-infected macaques: Results from a prospective study.

J. Infect. Dis. 182, 716-724

SCHANTZ, P. M., J. CHAI, P. S. CRAIG, J. ECKERT, D. J. JENKINS, C. N. L. MACPHERSON u. A. THAKUR (1995):
Epidemiology and control of hydatid disease.
In: R. C. A. THOMPSON u. A. J. LYMBERY (Hrsg.): *Echinococcus* and hydatid disease.
CAB International, Wallingford, Oxon, UK, S. 233-331

SCHMITT, M., F. SAUCY, S. WYBORN u. B. GOTTSTEIN (1997):
Befall von Schermäusen (*Arvicola terrestris*) mit Metazestoden von *Echinococcus multilocularis* im Kanton Freiburg (Schweiz).
Schweiz. Arch. Tierheilk. 139, 84-93

SCHUSTER, R., U. WITTSTATT, A. AUE, I. SCHÖFFEL u. G. BRAUNE (2001):
Finnen von *Echinococcus multilocularis* in der Unterhaut bei einem Hund.
Kleintier-Prax. 46, 435-439

SHOSHANI, J., C. P. GROVES, E. L. SIMONS u. G. F. GUNNELL (1996):
Primate phylogeny: morphological vs molecular results.
Mol. Phylogenet. Evol. 5, 102-154

SLIERENDREGT, B. L., N. OTTING, M. JONKER u. R. E. BONTROP (1994):
Gel electrophoretic analysis of rhesus macaque major histocompatibility complex class II *DR* molecules.
Hum. Immunol. 40, 33-40

STERN, L. J., J. H. BROWN, T. S. JARDETZKY, J. C. GORGA, R. G. URBAN,
J. L. STROMINGER u. D. C. WILEY (1994):
Crystal structure of the human class II MHC protein *HLA-DR1* complexed with an influenza
virus peptide.
Nature 368, 215-221

SYDLER, T., A. MATHIS u. P. DEPLAZES (1998):
Echinococcus multilocularis lesions in the livers of pigs kept outdoors in Switzerland.
Europ. J. Vet. Pathol. 4, 43-46

TAPPE, D., A. BLANKENBURG, K. BREHM, M. FROSCH, K. MÄTZ-RENSING u.
F.-J. KAUP (2003 a):
Efficient serological methods for detecting *E. multilocularis* infection in different Old World
monkey species.
Poster des 41. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der
Zoo- und Wildtiere, Rom 2003

TAPPE, D., A. BLANKENBURG, K. BREHM, M. FROSCH, K. MÄTZ-RENSING
u. F.-J. KAUP (2003 b):
Efficient serological methods for detecting *E. multilocularis* infection in different Old World
monkey species.
In: Verhandlungsbericht des 41. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der
Zoo- und Wildtiere, Rom 2003, S. 421

THOMPSON, R. C. A., u. A. J. LYMBERY (1995):
Echinococcus and hydatid disease.
CAB International, Wallingford, Oxon, UK

THOMPSON, R. C. A., u. D. P. MCMANUS (2001):

Aetiology: parasites and life-cycles.

In: J. ECKERT, M. A. GEMMELL, F.-X. MESLIN u. Z. S. PAWLOWSKI (Hrsg.):

WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris, S. 1-19

VOGEL, H. (1978):

Wie wächst der Alveolarechinokokkus?

Tropenmed. Parasitol. 29, 1-11

WATKINS, D. I. (1994):

MHC of nonhumane primates.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 188, 145-159

WATKINS, D. I. (1995):

The evolution of major histocompatibility class I genes in primates.

Crit. Rev. Immunol. 15, 1-29

WILDE, J., H. KLENSANG u. M. H. SCHWIBBE (1994):

A census for captive primates in Europe and North Africa.

Primate Report 38, 1-179

WORBES, H., K.-H. SCHACHT u. J. ECKERT (1989):

Echinococcus multilocularis bei einem Sumpfbiber (*Myocastor coypus*).

Angew. Parasitol. 30, 161-165

9 Anhang

9.1 Lösungen und Puffer

Lösungen, Puffer	Zusammensetzungen
Probenpuffer	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 15 % (w/v) Ficoll Type 400
DGGE-Probenpuffer	0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 70 % Glycerin
1x Lysispuffer	100 ml Tris (1M); 109,6 g Saccharose; 1 % Triton X-100; ad 1000 ml mit H ₂ O _{dd}
1x TE	10 mM Tris-HCl; 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0
1x TAE	40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0
1x TAEmod.	40 mM Tris-Acetat; 0,1 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0
1x TBE	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M Borsäure; 2 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0
1x STE	10 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0
STE + H ₂ O	5 ml 20 x STE; 88,5 ml H ₂ O
Proteinase K/TE	20 mg/ml Proteinase K in 2x TE-Puffer
Tris-Puffer Stammlösung (0,5 M)	500 ml Aquadd; 60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; mit 1 N HCl auf pH 7,6 einstellen; mit H ₂ O _{dd} ad. 1000ml
Tris-Puffer Gebrauchslösung (0,05 M, pH 7,6)	100ml Tris-Stammlösung; 7,65 g NaCl; H ₂ O _{dd} ad. 1000ml
Tris-Puffer plus Milchpulver (0,05 M, pH 7,6, 2 % Milchpulver)	20 g Milchpulver; 1000 ml Tris-Puffer (0,05 M)
DAB Stammlösung (10 mg/ml)	5,0 g DAB; 500 ml Trispuffer (0,05 M)
DAB Gebrauchslösung (100 mg/200 ml)	10 ml DAB Stammlösung; 190 ml Tris-Puffer (0,05 M)
Formalin 10 %	500 ml PBS Puffer, 285 ml Formalin 35 %, 215 ml H ₂ O dest.

9.3 Protokolle für die Histologie

9.3.1 Hämalaun & Eosin-Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung:

Xylol:	5 min
Xylol:	2 min
Xylol:	2 min
100%iger Alkohol:	2 min
96%iger Alkohol:	2 min
80%iger Alkohol:	1 min
70%iger Alkohol:	1 min
Aqua dest.:	1 min

2. Zur Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt) für 3 min

3. Zum Bläuen 10 min fließend wässern.

4. Zur Gegenfärbung: wäßriges Eosin für 5 min

5. Fließend wässern für 5 s

6. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:

70%iger Alkohol:	1 min
80%iger Alkohol:	1 min
96%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	2 min
Xylol:	1 min
Xylol:	3 min
Xylol:	3 min

7. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

9.3.2 Giemsa-Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. Giemsalösung für 25 min
3. Aqua dest. für wenige s
4. Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure bis die Schnitte einen rötlichen Schimmer bekommen.
5. 90%iger Alkohol für wenige s
6. Isopropanol: 5 min
Isopropanol: 5 min
7. Xylol: 5 min
8. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

9.3.3 Periodic Acid Schiff- (PAS) Reaktion

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. 0,5%ige Perjodsäure für 10 min
3. Aqua dest. fließend für 10 min
4. Schiff's Reagenz für 15 min
5. Aqua dest. für wenige s
6. Leitungswasser fließend für 10 min
7. Zur Gegenfärbung: Hämalaun nach Mayer für 30 s
8. Zum Bläuen: Leitungswasser für 10 min
9. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe:
 - 70%iger Alkohol: 1 min
 - 80%iger Alkohol: 1 min
 - 96%iger Alkohol: 1 min
 - 100%iger Alkohol: 1 min
 - 100%iger Alkohol: 2 min

Xylol:	1 min
Xylol:	3 min
Xylol:	3 min

10. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

9.3.4 Trichromfärbung nach Goldner

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. Hämatoxylin nach Weigert für 1,5 min
3. Fließend wässern für 10 min
4. Azophloxin für 5 min
5. Essigsäure (1%ig) für 45 s
6. Phosphormolybdänsäure - Orange für 1,5 min
7. Essigsäure (1%ig) für 45 s
8. Lichtgrün für 6 min
9. Essigsäure (1%ig) für 5 min
10. 96%iger Alkohol: 2 min
11. 100%iger Alkohol: 2 min
12. 100%iger Alkohol: 2 min
13. Xylol: 2 min
14. Xylol: 2 min
15. Xylol: 2 min

9.3.5 Amyloid-Färbung mit Kongorot

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. Schnitte in Mayers Hämalaun 10 s bestrahlen (Mikrowelle bei 590 W)
3. Fließend wässern für 5 min

4. Schnitte in der Kongorot-Lösung für 30 s bestrahlen (Mikrowelle bei 590 W)
(1 g Kongorot in 200 ml 50%igem Ethanol lösen und filtrieren)
5. Schnitte kurz in der KOH-Lösung differenzieren
(2 ml 1%iges KOH und 200 ml 80%iges Ethanol mischen)
6. Schnitte gründlich in fließendem Aqua dest. für 5 min spülen, um die Reaktion zu stoppen
7. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe

70%iger Alkohol:	1 min
80%iger Alkohol:	1 min
96%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	2 min
Xylol:	1 min
Xylol:	3 min
Xylol:	3 min
8. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)
Die Schnitte sind dunkel aufzubewahren!

9.4 Protokoll für die Immunhistochemie

SABC-Methode (=Streptavidin-Biotin-Complex)

Manuelle Methode:

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. Schnitte in Tris-Puffer (mit Milchpulver) überführen und das Gewebe mit einem PAP- Pen (DAKO, Hamburg, Deutschland) umranden
3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 1,5%igem H₂O₂ für 30 min
(H₂O₂: 10 ml Perhydrol + 190 ml Aqua_{dd})
4. Zweimal Spülen der Schnitte in Tris-Puffer (mit Milchpulver) für jeweils 5 min

5. Inkubieren der Schnitte mit Normalserum (Ziegen Serum 1 : 5 mit PBS verdünnt) für 20 min bei Raumtemperatur
6. Dekantieren des Normalserums und Auftragen des Primärantikörpers (1 : 200) über Nacht bei 4° C
7. Zweimal Spülen der Schnitte in Tris-Puffer (mit Milchpulver) für jeweils 5 min
8. Auftragen des Sekundärantikörpers (DAKO StreptAB-Komplex/HRP-Duett, Maus/Kaninchen; Kat.-Nr. K 0492; DAKO, Hamburg, Deutschland) für 25 min
(500 µl PBS + 5 µl Lösung C aus dem Duett-Kit)
9. Zweimal Spülen der Schnitte in Tris-Puffer (mit Milchpulver) für jeweils 5 min
10. Auftragen des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes
(500 µl PBS + 5 µl Lösung A + 5 µl Lösung B aus dem Duett-Kit)
Achtung: Lösung muß mindestens 15 min vor Gebrauch angesetzt werden!
11. Zweimal Spülen der Schnitte in Tris-Puffer (ohne Milchpulver) für jeweils 5 min
12. Enzymhistochemische Reaktion:
 - € Aliquot von 100 mg DAB (Diaminobenzidin) in 10 ml Tris-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen und nach Zugabe von 190 ml Tris-Puffer durch zwei Filterpapiere filtrieren
 - € Unmittelbar vor Gebrauch 200 µl 30%iges H₂O₂ zugeben
 - € Inkubation der Schnitte für 7 min
13. Zweimal Spülen der Schnitte in Tris-Puffer (ohne Milchpulver) für jeweils 5 min
14. Gegenfärben in Mayers Hämalaun für 30 bis 60 s
15. Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 8 min
16. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe

70%iger Alkohol:	1 min
80%iger Alkohol:	1 min
96%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	1 min
100%iger Alkohol:	2 min
Xylol:	1 min
Xylol:	3 min
Xylol:	3 min
17. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

Maschinelle Methode:

1. Entparaffinierung und Rehydratisierung (siehe Kap. 9.3.1)
2. NexES-IHC-Färbemodul vorbereiten:
 - € APK-Waschpuffer und Öl (Liquid Coverslip) auffüllen sowie den Pegel des Abfallbehälters kontrollieren
 - € Reagenzienkarussell bestücken
 - € Barcode-Etiketten auf die Objektträger kleben, im NexES einspannen und mit APK-Waschpuffer bedecken
3. Lauf starten. Ab jetzt läuft die immunhistochemische Reaktion voll automatisch im Gerät

nach der SABC-Methode ab. Folgendes Protokoll wurde mit dem Ventana Enhanced Alkalische Phosphatase Red Detection Kit (Cat. 760-031) durchgeführt:
 - € Objektträger werden auf 37° C erwärmt
 - € 10 min Option 1 (Ziegen Serum 1 : 5 mit PBS verdünnt, zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen)
 - € 32 min *E. multilocularis* Primärantikörper (1 : 300)
 - € 2 min Fixative 1 (20 µl Glutardialdehyd in 10 ml 0,9 % NaCl)
 - € 8 min Enhanced Biotin Ig (biotinylierter Sekundärantikörper) in Phosphatpuffer
 - € 12 min Enhanced alkalische Phosphatase-Streptavidin-Komplex in Trispuffer mit MgCl₂ und ZnCl₂
 - € 4 min Enhanced Enhancer (MgCl₂) und Enhanced Naphtol in Tris-Puffer
 - € 8 min Enhanced Fast Red A in Acetat Puffer
 - € 8 min Enhanced Fast Red B in Acetat Puffer
 - € 4 min Hämatoxylin (zur Gegenfärbung)
 - € 4 min Bluing Reagent (zum Bläuen)
4. Allen Inkubationsschritten im NexES-IHC-Färbemodul folgen definierte Waschschrte mit dem APK-Waschpuffer von VENTANA (Cat. 250-042)
5. Schnitte aus dem Gerät entnehmen, in einer Küvette mit Aqua dest. und Spülmittel schwenken, um das im NexES verwendete Öl zu entfernen und anschließend in eine Küvette mit Aqua dest. überführen

6. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe
- | | |
|-------------------|-------|
| 70%iger Alkohol: | 1 min |
| 80%iger Alkohol: | 1 min |
| 96%iger Alkohol: | 1 min |
| 100%iger Alkohol: | 1 min |
| 100%iger Alkohol: | 2 min |
| Xylol: | 1 min |
| Xylol: | 3 min |
| Xylol: | 3 min |
7. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

9.5 Protokolle der elektronenmikroskopischen Präparation

9.5.1 Epongemisch nach LUFT (1961)

Mischung A

Glycidether 100 (Fa. Serva, Heidelberg, BRD, Nr. 21045):	71,3 g
DDSA (Fa. Serva, Heidelberg, BRD, Nr. 20755):	115,0 g
<i>auf einem Magnetrührer 1 h rühren</i>	

Mischung B

Glycidether 100 (Fa. Serva, Heidelberg, BRD, Nr. 21045):	100,0 g
MNA (Fa. Serva, Heidelberg, BRD, Nr. 29452):	89,0 g
<i>auf einem Magnetrührer 1 h rühren</i>	

Mischung A und B im Verhältnis 1 : 1 mischen und 30 min rühren

1,8 % Beschleuniger DMP (Fa. Serva, Heidelberg, BRD, Nr. 36975) dazugeben und

1 h rühren

9.5.2 Protokoll der Epon-Einbettung nach LUFT (1961)

1. Spülen in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) über 1,5 h (3x wechseln)
2. Nachfixieren in 1%iger Osmiumtetroxidlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) für 2 h
3. Spülen in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) über 1,5 h (3x wechseln)
4. Dehydrieren in einer aufsteigenden Ethanolreihe (6 Stufen, je Stufe 30 min), Isopropanol (30 min) und Propylenoxid (30 min, 2x wechseln)
5. Infiltration mit Propylenoxid-Epon 2 : 1 für 1 h
6. Infiltration mit Propylenoxid-Epon 1 : 1 für 2 h
7. Infiltration mit Propylenoxid-Epon 1 : 2 für 4 h
8. Infiltration mit reinem Epon über Nacht
9. Infiltration mit reinem Epon über 3 h

9.5.3 Methylenblaufärbung nach RICHARDSON et al. (1960)

Lösung A

Azur II für die Lichtmikroskopie (Fa. Merck, Darmstadt, BRD, Nr. 9211): 1,0 g
in 100 ml Aqua dest. lösen

Lösung B

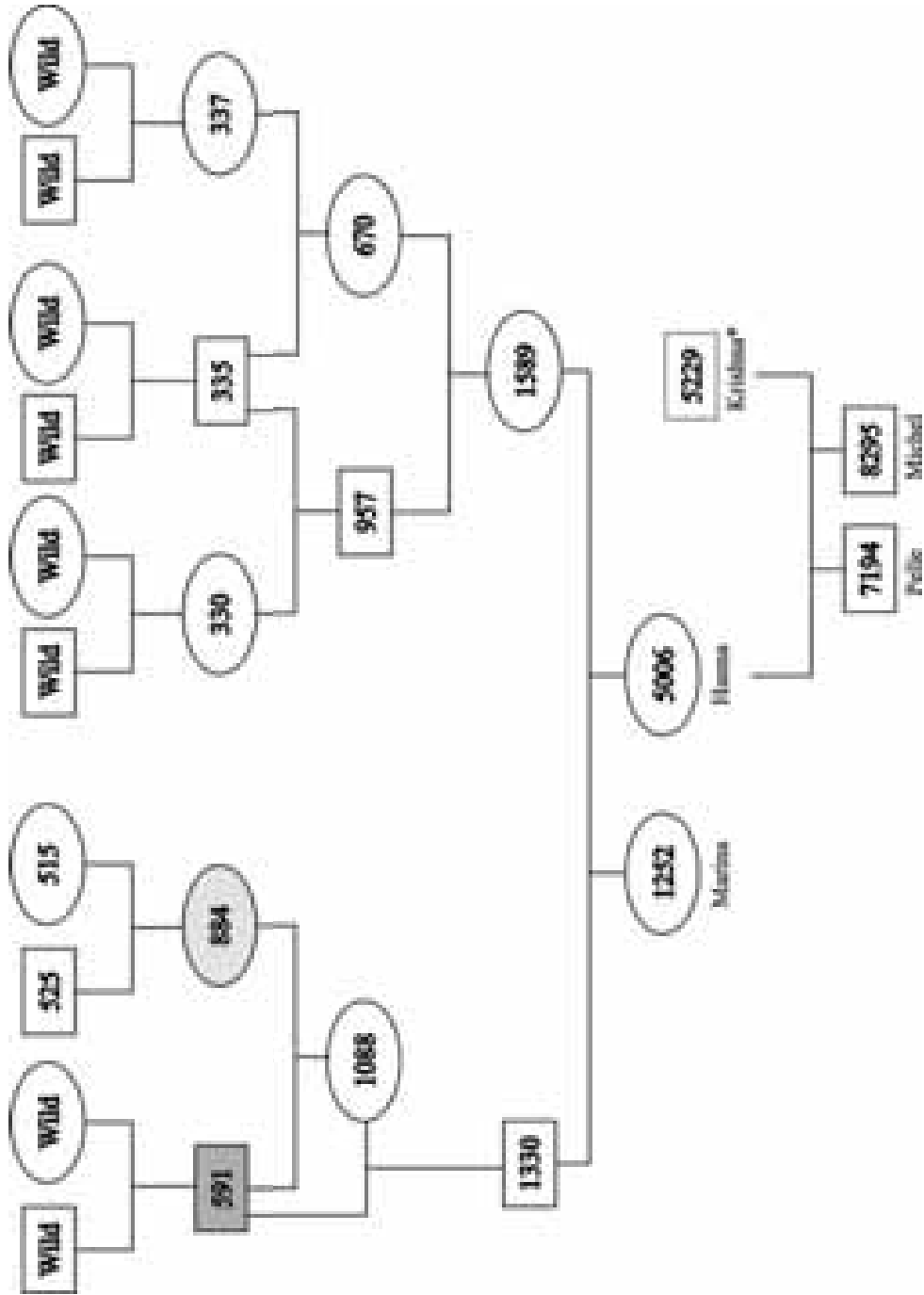
di-Natriumtetraborat p. a. (Fa. Merck, Darmstadt, BRD, Nr. 6306): 1,0 g
in 100 ml Aqua dest. lösen und darin

Methylenblau für die Lichtmikroskopie (Fa. Merck, Darmstadt, BRD, Nr. 15943): 1,0 g
lösen

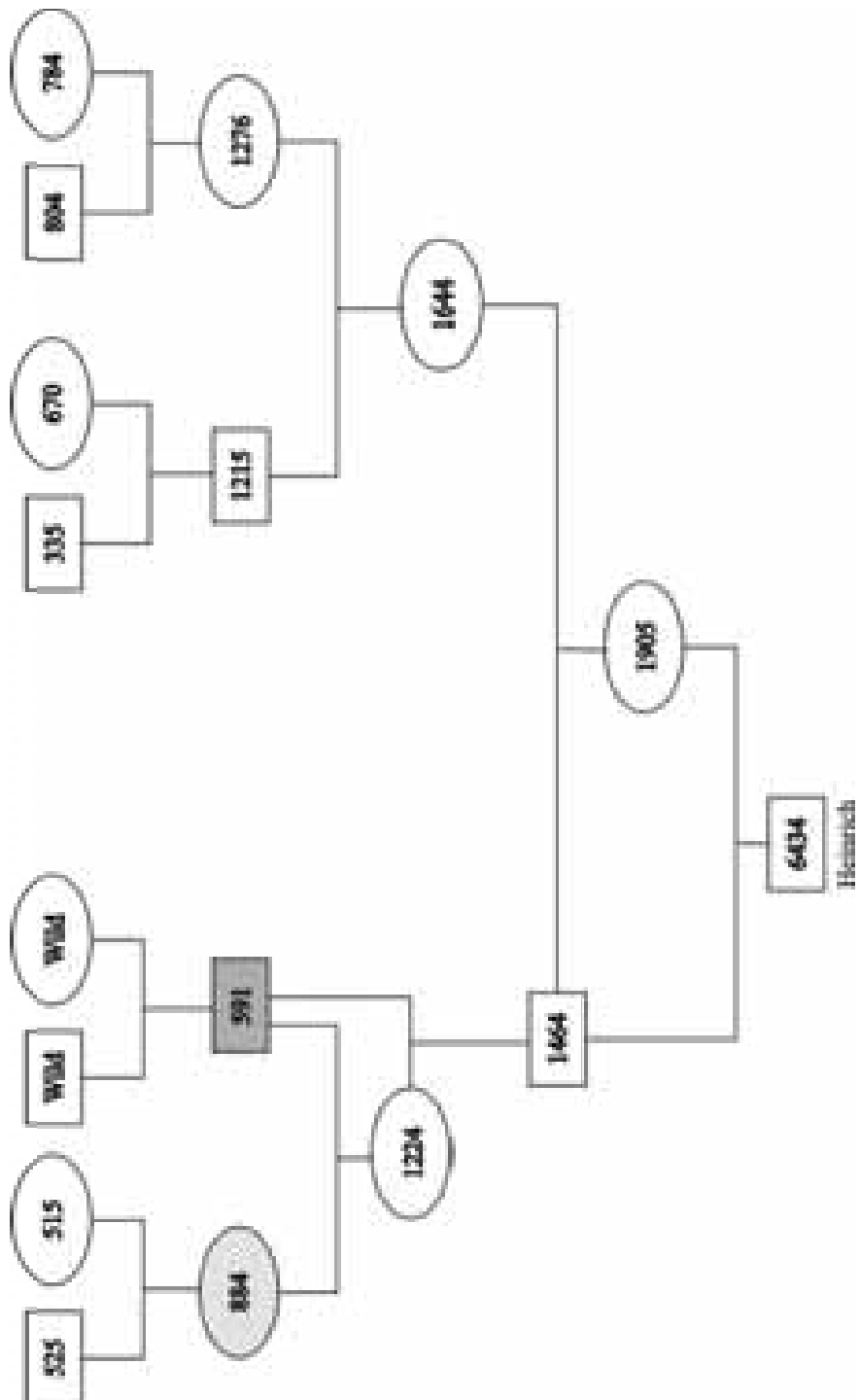
Lösung A und B im Verhältnis 1 : 1 mischen

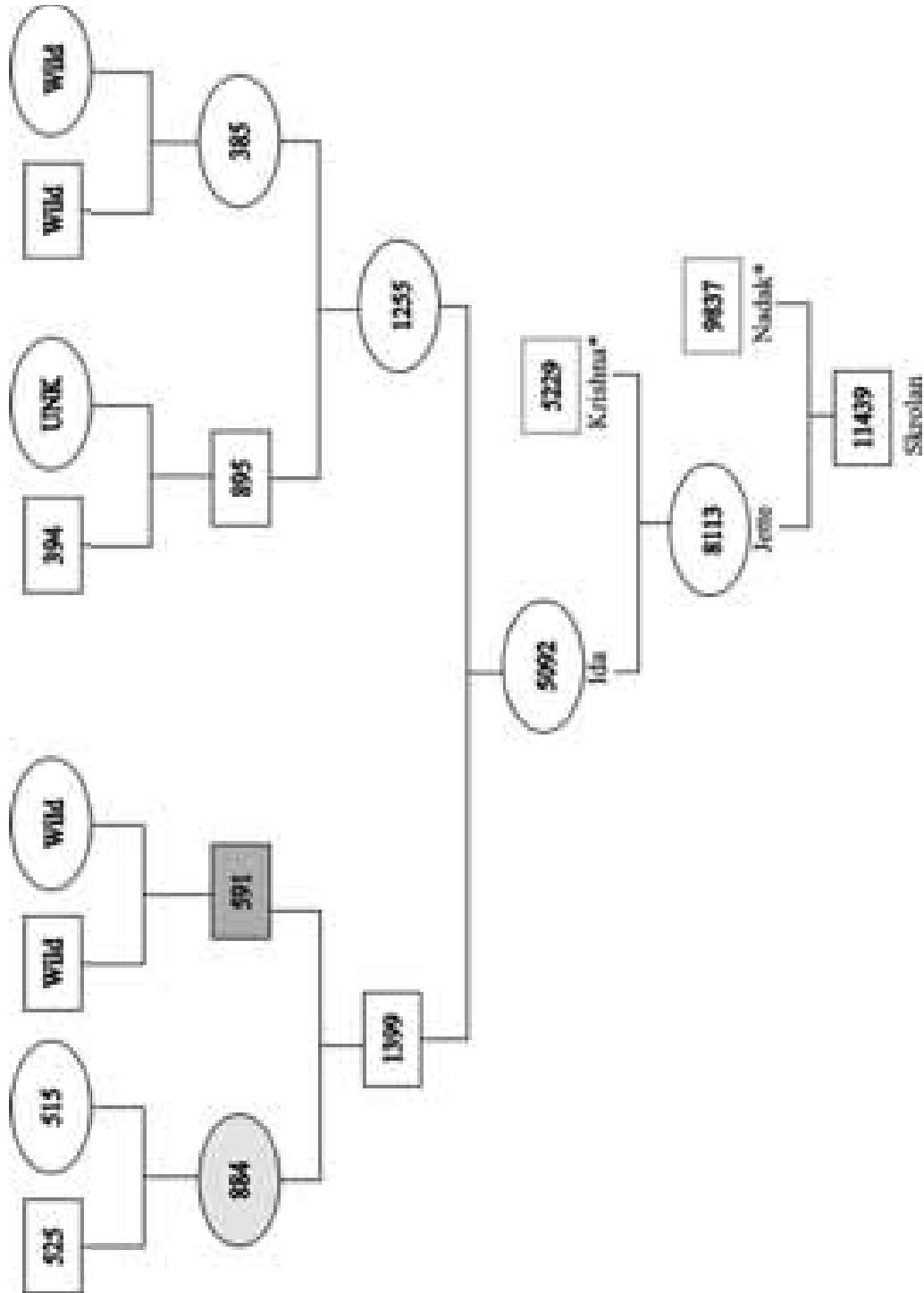
Schnitte auf der Wärmebank bei 60° C 1 min mit der 1 : 1 Mischung färben

9.6 Stammbäume der Bartaffen-Kolonie (nach Informationen von GLEDHILL 1997)

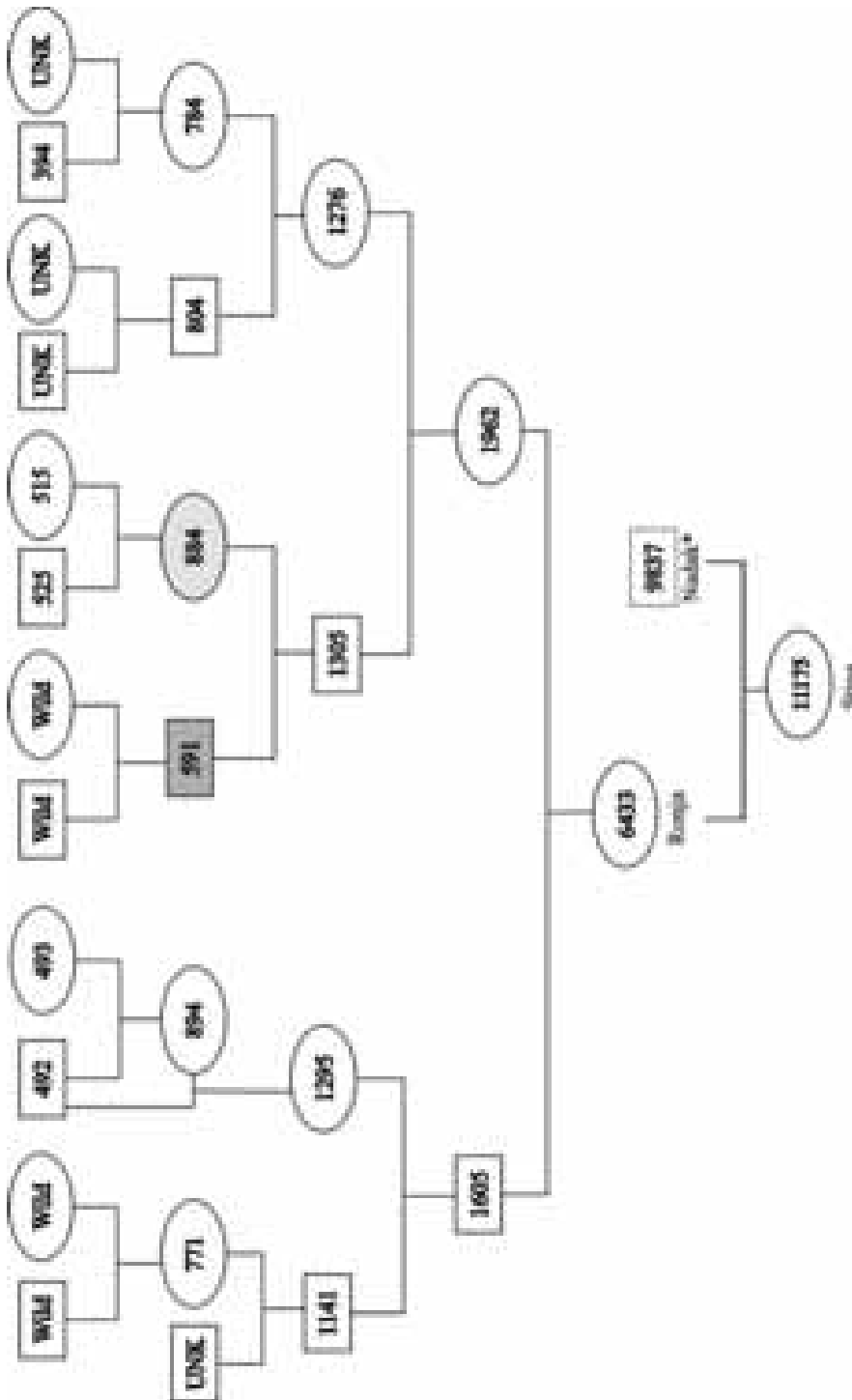


(* siehe Seite 148)

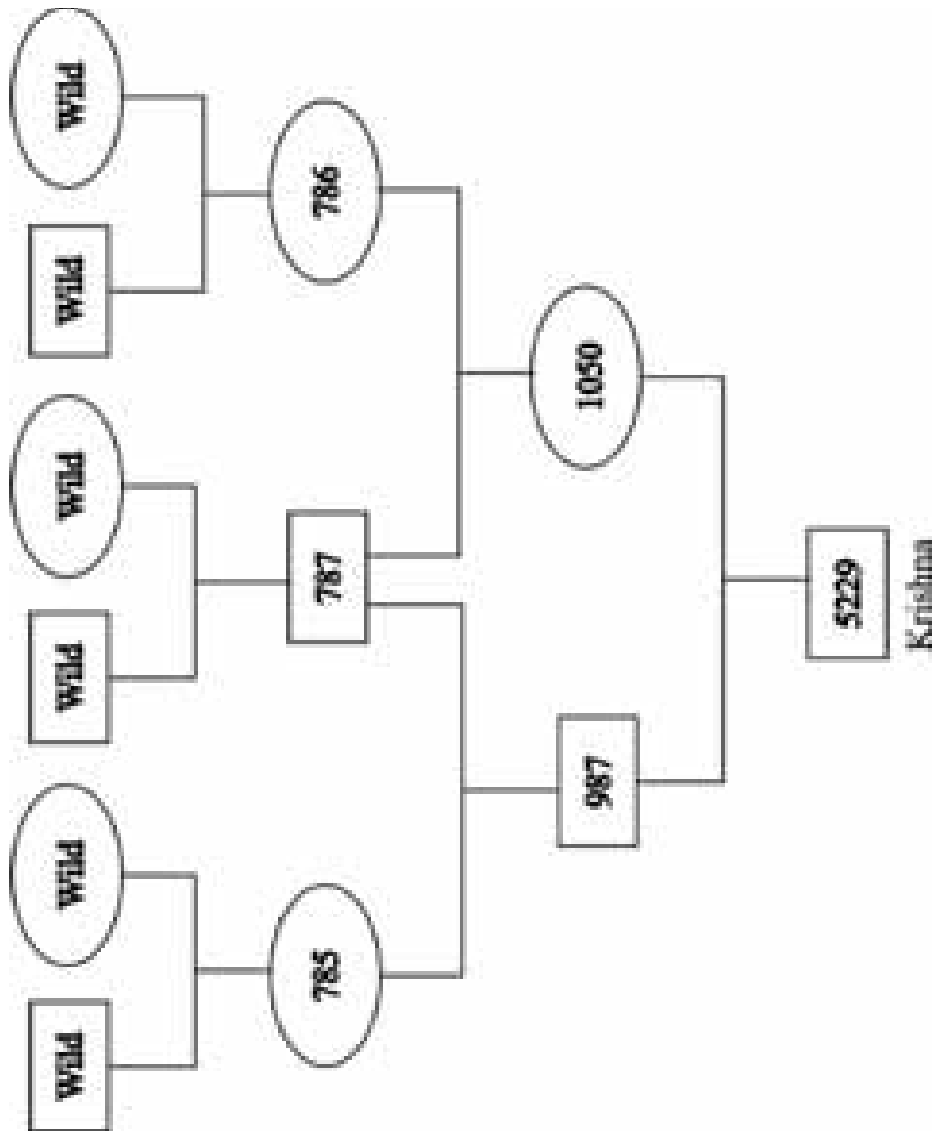


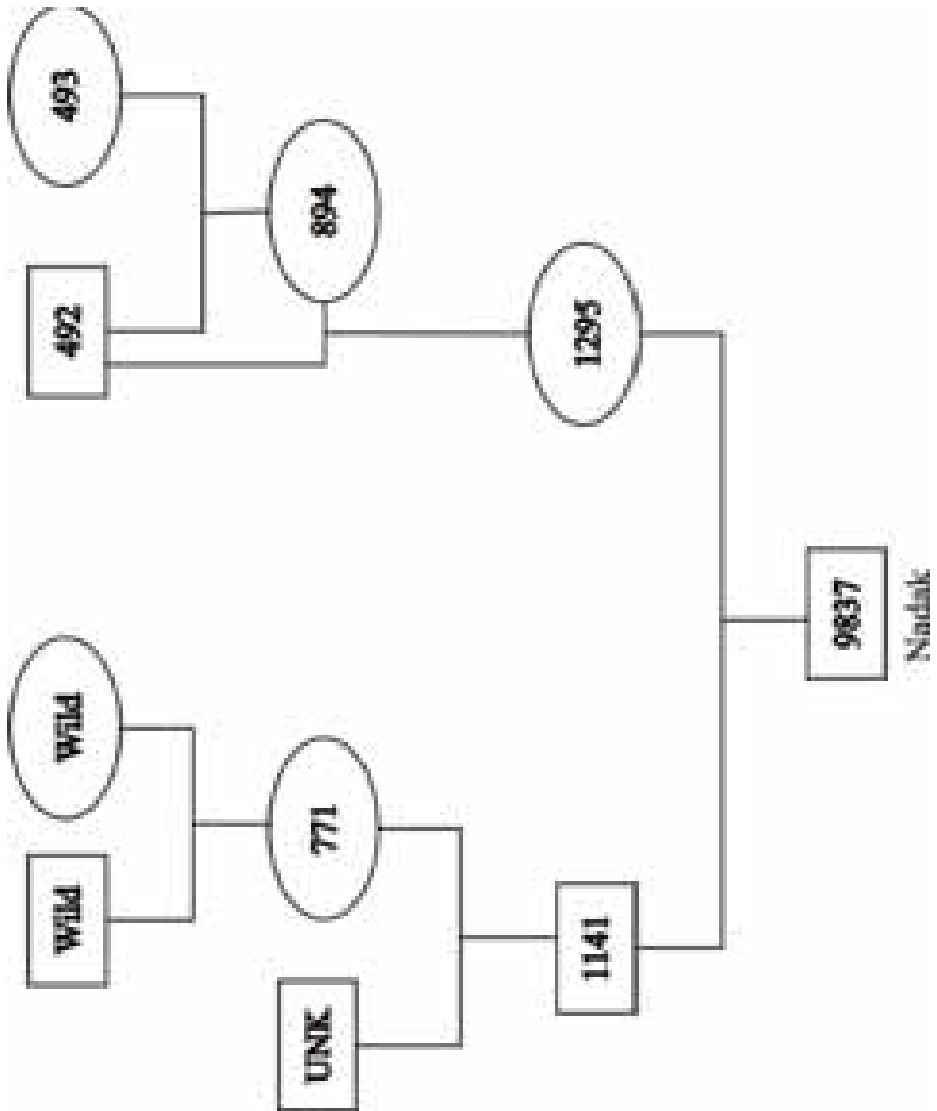


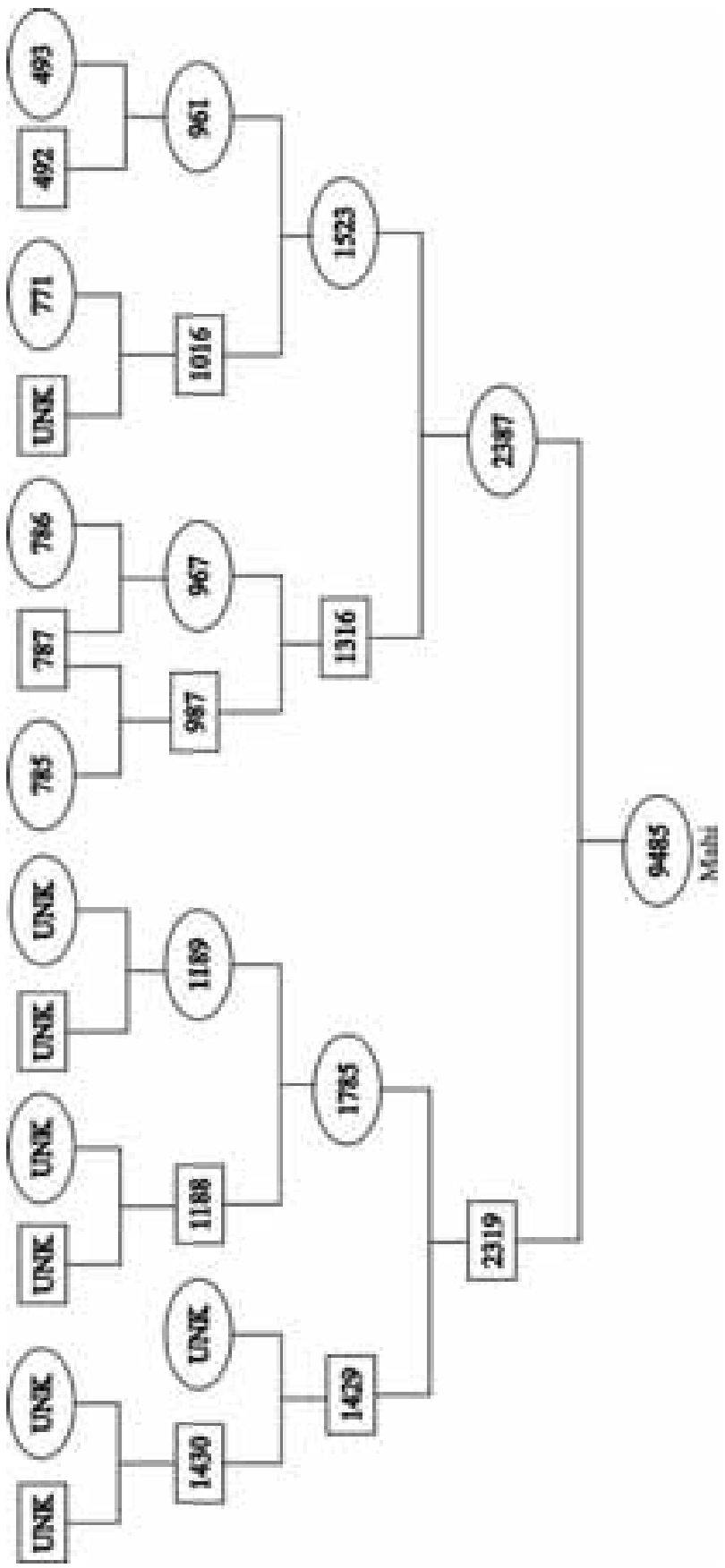
(* siehe Seite 148 für Krishna und Seite 149 für Nadak)

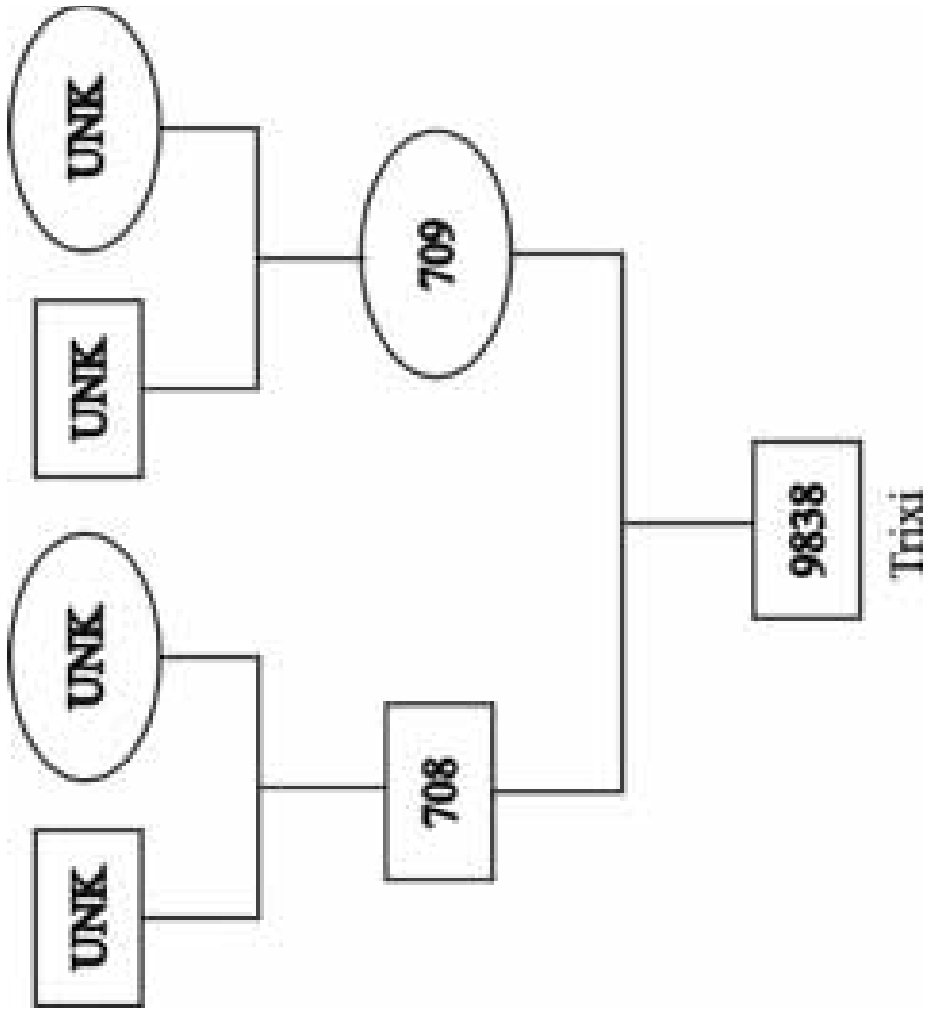


(* siehe Seite 149)









Legende: Wild – Wildfang; UNK – unbekannt; □ = ; ○ =

Göttingen, den 19.02.2004

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur alveolären Echinokokkose bei Bartaffen (*Macaca silenus*)“ selbständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- ∄ Technisch-methodische Einweisung durch technische Assistentinnen der Abteilungen Virologie und Infektionspathologie, Deutsches Primatenzentrum Göttingen.
- ∄ Redaktionelle Überarbeitung durch wissenschaftliche Mitarbeiter und Leiter der Abteilungen Infektionspathologie und Virologie, Deutsches Primatenzentrum Göttingen.
- ∄ Die serologische Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit dem Konsiliarlaboratorium für Echinokokken des Institutes für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt.
- ∄ Der Anti-*E. multilocularis* Antikörper für die Immunhistochemie wurde zur Verfügung gestellt vom Institut für Parasitologie der Universität Bern, Schweiz.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation in der Abteilung Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen unter Leitung von Herrn Univ. Prof. Dr. F.-J. Kaup angefertigt und bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Anja Blankenburg

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. F.-J. Kaup für die Vergabe des Themas, die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten, die Unterstützung bei fachlichen Problemen, aber auch für die vielen lustigen Stunden.

Frau Dr. U. Sauermann danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des genetischen Teils dieser Arbeit, sowie für ihre Unterstützung bei fachlichen Problemen und bei der Korrekturlesung.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. K. Mätz-Rensing für ihr immer offenes Ohr in allen Lebensbereichen, für die fachlichen Tipps und Anregungen und die Korrektur dieser Arbeit. Frau Dr. A. Floto danke ich an dieser Stelle ganz herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, die geopfert Zeit am Mikroskop und für die lustigen und manchmal auch „sauren“ Stunden. Ich hoffe, wir bleiben in Kontakt.

Ich danke ganz herzlich Frau K. Kaiser-Jarry und Frau N. Knöchelmann für ihre immerwährende Geduld am Elektronenmikroskop, für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen/immunhistochemischen Präparate und für ihre Ratschläge bei der Korrektur dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau S. Rensing, Frau Dr. A. Schrod und Frau A. Husung für ihre hilfreichen Ratschläge, die Bereitstellung von Blutproben und die Hilfe bei den Ultraschalluntersuchungen danken.

Ich danke Frau N. Vigon, Frau M. Haussmann und Frau N. Leuchte, die mir mit unendlicher Geduld im Labor zur Seite standen. Herrn Dr. T. Mühl danke ich für die geopfert Zeit zur Klärung fachlicher Probleme, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit. Danke auch an Herrn Dr. C. Roos für seine hilfreichen Tipps.

Besonderen Dank schulde ich Frau I. Roßbach u. a. für die Hilfe bei Übersetzungsarbeiten und für die Durchsicht dieser Arbeit, sowie Frau M. Hampe für die Anfertigung des Bildmaterials.

Ein großes Danke an das Doktorandenzimmer! Ich danke Frau Dr. A. Quohs, Frau M. Zöller, Frau C. Kott, Herrn F. Runge und Herrn M. Caglar für die vielen lustigen Stunden, die immer offenen Ohren, die aufbauende, freundschaftliche Atmosphäre, die vielen fachlichen Tipps und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit. Danke Martina, für die selbstlose Überlassung deines Computers, sowie die witzigen, dornfeldigen Abende. Eure Freundschaft ist mir sehr wichtig geworden, ich hoffe wir verlieren uns nicht aus den Augen.

Allen nicht genannten Mitarbeitern der Abteilungen Infektionspathologie, Primatenhaltung und Virologie danke ich für die freundliche Atmosphäre und das gute Arbeitsklima.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. K. Brehm und Herrn Dr. D. Tappe vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg für die nette Zusammenarbeit und die Tipps für diese Arbeit.

Vielen Dank an Frau Dr. A. Dinkel vom Institut für Zoologie der Universität Hohenheim für die gute Zusammenarbeit bei der Diagnosesicherung mittels PCR, für ihre Ratschläge zu Literaturangaben und für ihre schnelle „Literaturlieferung“.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. B. Gottstein vom Institut für Parasitologie der Universität Bern für die Bereitstellung des Antikörpers für die Immunhistochemie.

Danke an Herrn Dr. W. Kaumanns für die Hilfe bei Fragen zur Bartaffenkolonie, an Herrn Dr. D. Lüerssen für die ultrasonographische Beratung und an Frau Dr. K. Linke für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken, die durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Perspektiven der Primatologie“ die Anfertigung dieser Dissertation unterstützte.

Ich danke meiner Freundin Andrea. Danke, dass du immer für mich da bist, in guten und in schlechten Zeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei all meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren begleitet haben.

Mein herzlichster Dank geht aber an meine Eltern. Ohne euch wäre die Ausbildung zur Tierärztin und die Doktorarbeit ein Traum geblieben. Danke für euren liebevollen Rückhalt und eure moralische und finanzielle Unterstützung.