

# Echinococcus multilocularis, der Erreger der alveolären Echinokokkose

Autor(en): **Gottstein, Bruno**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =  
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **82 (1993)**

Heft 1-2

PDF erstellt am: **18.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308717>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

***Echinococcus multilocularis*,**  
**der Erreger der alveolären Echinokokkose**

von BRUNO GOTTSTEIN,  
Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen und der Medizinischen Fakultät  
der Universität Bern

## **1. Einleitung**

Unter der alveolären Echinokokkose des Menschen verstehen wir ein Krankheitsbild, das im Rahmen einer Infektion mit dem Larvenstadium des sogenannten Kleinen Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* erfolgt. Da dieser Bandwurm sowie die damit verbundene Erkrankung beim Menschen in letzter Zeit vermehrt in die Schlagzeilen der Tagespresse geriet, u.a. weil, ohne klare Vergleichsdaten zur Verfügung zu haben, von einer zunehmenden Verbreitung des Endemiegebietes und somit zugleich von einem erhöhten Expositionsrisiko beim Menschen die Rede war, soll im folgenden eine Übersicht über neuere Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der alveolären Echinokokkose des Menschen und der Biologie des Parasiten dargestellt werden.

## **2. Biologie von *E. multilocularis***

*E. multilocularis* kommt als adulter Bandwurm vorwiegend im zweiten Abschnitt des Dünndarmes seiner Endwirte vor. In Mitteleuropa ist hauptsächlich der Rotfuchs betroffen, wobei auch Hund und Katze in Frage kommen. Neuere Untersuchungen bezüglich der Befallsextenzität sowie der Befallsintensität in der Schweiz wiesen auf die starke Präsenz des Parasiten hin (EWALD et al., 1992): Insgesamt wurden 12 Kantone untersucht; die Durchschnittsprävalenz bezogen auf die Jahre 1990 bis 1992 betrug dabei 29%, mit kantonalen Schwankungen von 2% (Kanton Graubünden) bis 52% (Appenzell Außerrhoden). Die meisten der betroffenen Füchse zeigten eine relativ geringgradige Befallstärke (67% beherbergten weniger als 100 Echinokokken pro Darm), nur 9% hatten mehr als 1000 Bandwürmer pro Darm. Über den Befall bei Hund und Katze liegen aus der Schweiz keine genaueren Daten vor.

Im benachbarten Baden-Württemberg waren bei der Untersuchung größerer Tierzahlen durchschnittlich 12–14% der Füchse, 1,4% der Hunde und 0,5–1,3% der Katzen mit *E. multilocularis* infiziert (MÜLLER & PARTRIDGE, 1974; ZEYHLE & FRANK, 1982). Sexuelle Maturität erlangen die adulten Würmer bereits 4 bis 5 Wochen nach der Infektion, gefolgt von einer Abstoßung gravider Proglottiden, die je ungefähr 200 Echinokokkeneier enthalten. Mit dem Kot an die Außenwelt gelangte Eier sind für Zwischenwirte bereits voll infektiös. Eine kurze Übersicht über den Entwicklungszyklus von *E. multilocularis* wird in Abb. 1 dargestellt. Im Gegensatz zu *E. multilocu-*

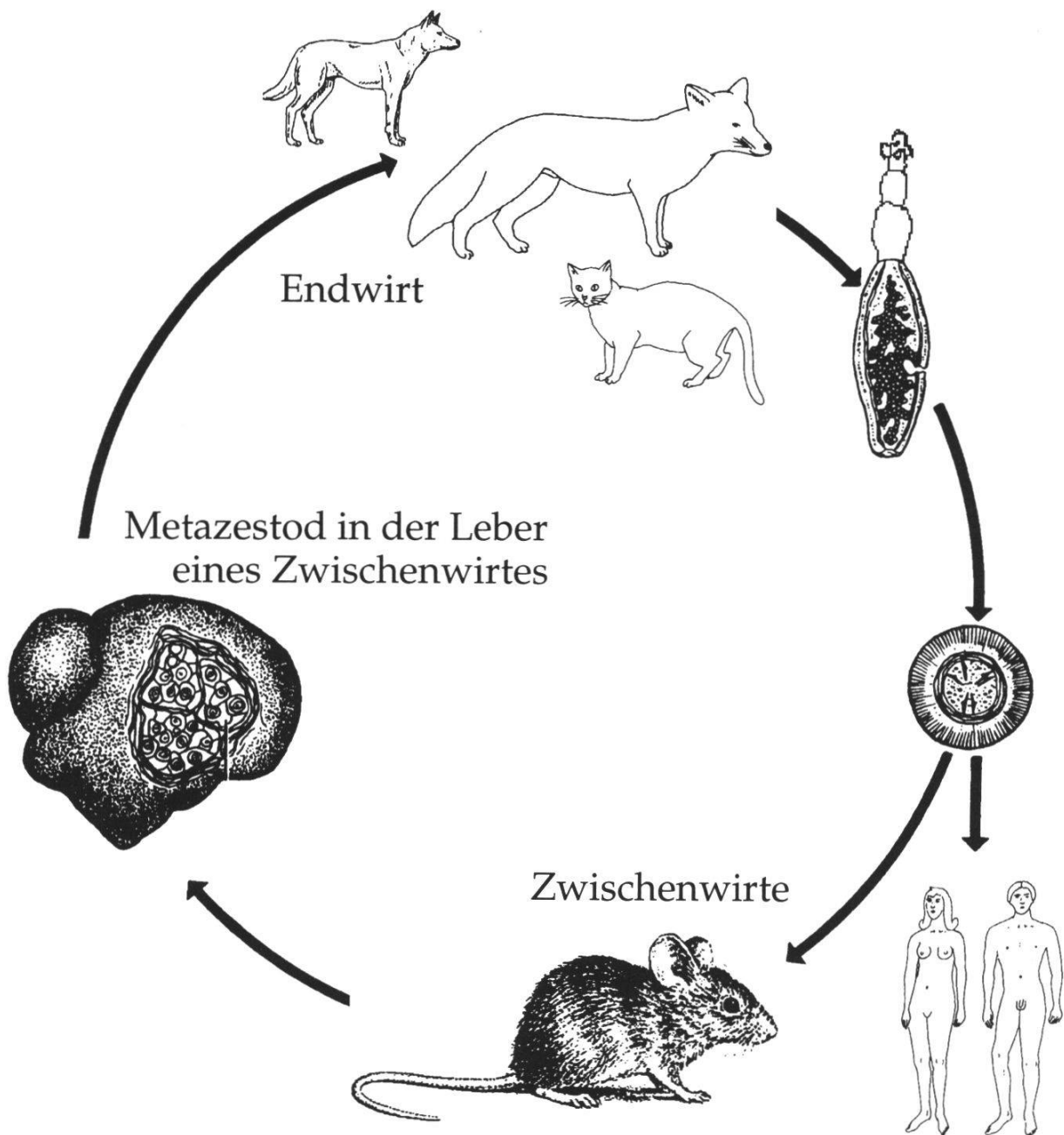


Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Echinococcus multilocularis*. Adulte Bandwürmer parasitieren im Dünndarm vorwiegend des Fuchses. Mit dem Fuchskot werden Bandwurmeier ausgeschieden, die für Zwischenwirte infektiös sind. In der Leber der Zwischenwirte entwickelt sich das sogenannte Metazestodienstadium, bei dem auch Kopfanlagen (Protoskolizes) gebildet werden können, die für den Endwirt infektiös sind.

*laris* benutzt sein enger Verwandter *Echinococcus granulosus* vorwiegend Hunde als Endwirt und verschiedene Nutz- und Wildtiere als Zwischenwirt (Abb. 2).

Kleine Säugetiere, hauptsächlich *Arvicola terrestris* sowie *Microtus arvalis*, fungieren als Zwischenwirte für *E. multilocularis*. Diese infizieren sich durch perorale Aufnahme von *E. multilocularis*-Eiern, die über kontaminierte Nahrung, möglicherweise

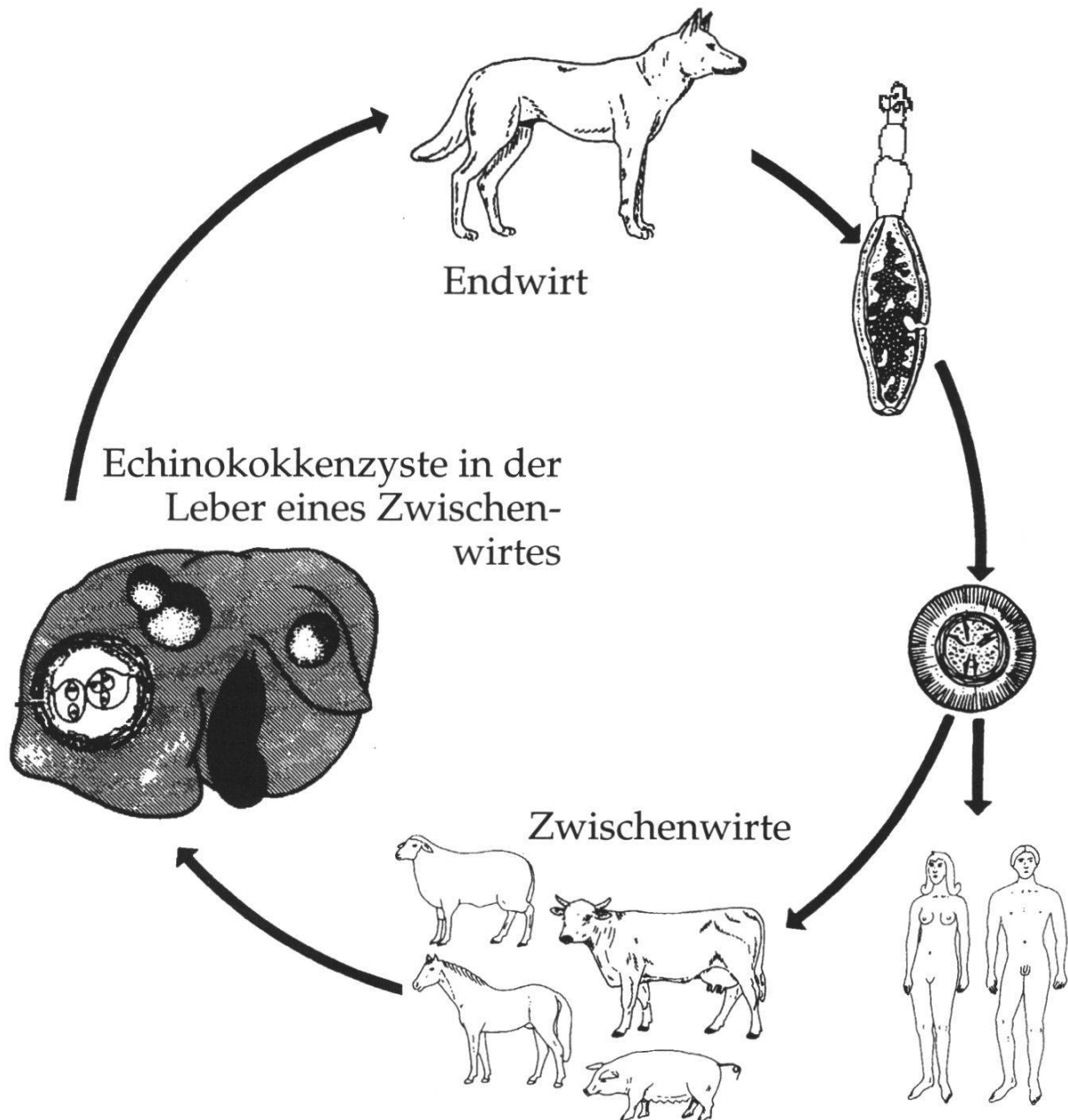


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *Echinococcus granulosus*. Adulte Bandwürmer parasitieren im Dünndarm des Hundes. Mit dem Hundekot werden Bandwurmeier ausgeschieden, die für Zwischenwirte infektiös sind. In der Leber, in der Lunge oder in anderen Organen der Zwischenwirte entwickeln sich sogenannte Echinokokkenzysten oder «Hydatiden», in denen sich auch Kopfanlagen (Protoskolizes) ausbilden, die für den Endwirt infektiös sind.

Wasser, ingestiert werden. Im Magen des Zwischenwirts wird aufgrund physiologischer Vorgänge die aus hexagonalen Keratinblöcken geformte dicke Eischale aufgelöst und darauf eine von einer schützenden Lipidmembran umgebene Onkosphäre freigesetzt. Die Membran wird später im Dünndarm vor allem durch Gallensalze aufgelöst. Dieselben Vorgänge aktivieren die Onkosphäre, die mittels gerichteter, amöboider Bewegungen und unter Zuhilfenahme von Embryonalhäkchen sowie proteolytischer Enzyme sich einen Weg ins Darmgewebe bahnt. Die Onkosphäre gelangt anschließend über Mesenterialvenen und möglicherweise Lymphgefäße in die Leber, wo sie sich zu einem bläschenförmigen Vesikel weiterentwickelt. In vitro-Studien haben gezeigt, daß sich solche Vesikel innerhalb von 12 Tagen mit einer PAS-positiven Laminarschicht umgeben, welche aus einem Polysaccharid-Protein-Komplex mit vorwiegend Galaktosamin sowie Glukosamin besteht (GOTTSTEIN et al., 1992). Weiter unten im Artikel werden wir erläutern, wie die Laminarschicht beim Überleben des Parasiten bezüglich der Wirtsimmunantwort eine zentrale Rolle spielt. Die Vesikel, die aus einer kugelförmigen proliferierenden Keimschicht bestehen und mit Flüssigkeit gefüllt sind, vergrößern und vermehren sich durch primäre Bildung von Ausstülpungen, die sich zu Tochtervesikeln weiterentwickeln (Abb. 3 und 4), wobei die einzelnen Vesikel in der Regel miteinander in Verbindung stehen und fließend und ohne Unterbruch von der Laminarschicht umgeben sind. Mit der Zeit erfolgt von der Keimschicht ausgehend eine Differenzierung zu sogenannten Protoskolizes (Kopfanlagen), die, wenn ein Endwirt einen infizierten Zwischenwirt frißt und so Protoskolizes peroral ingestiert, sich schließlich wieder zu adulten Bandwürmern weiterentwickeln (Abb. 1).

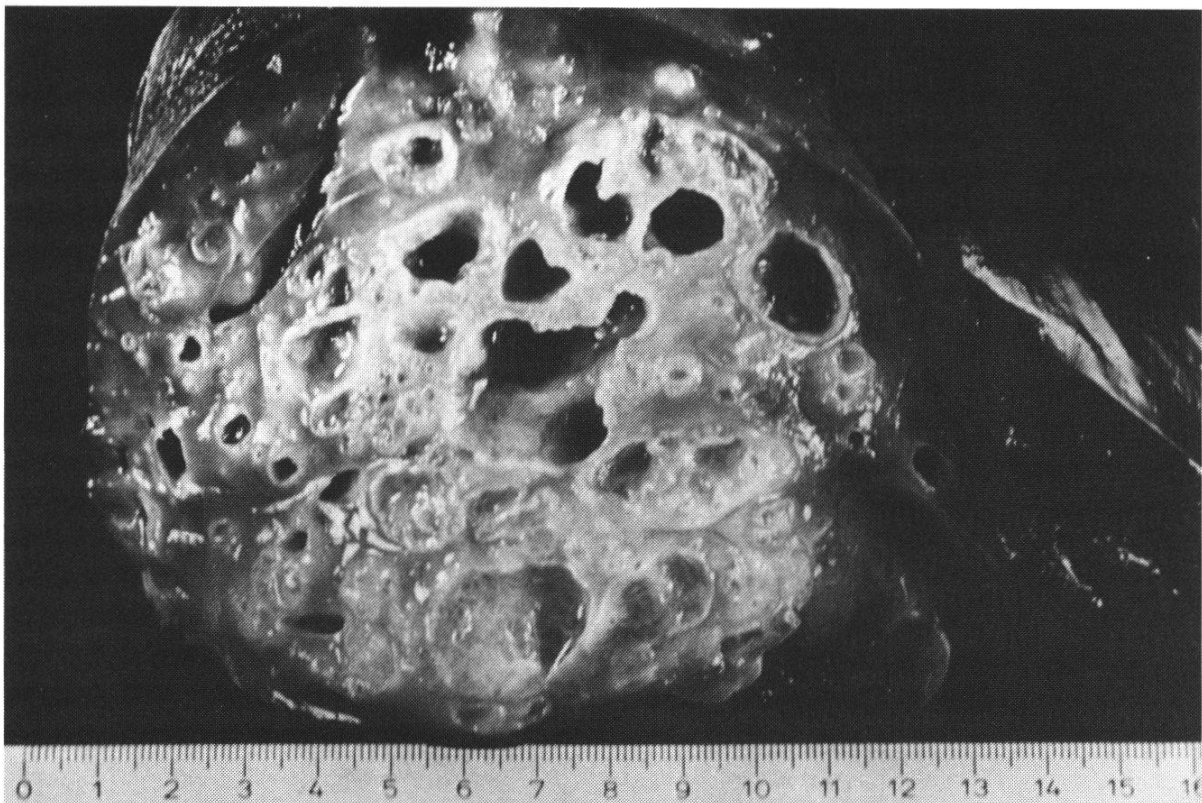


Abb. 3: Metazestodengewebe von *E. multilocularis* in der Leber vom Menschen.

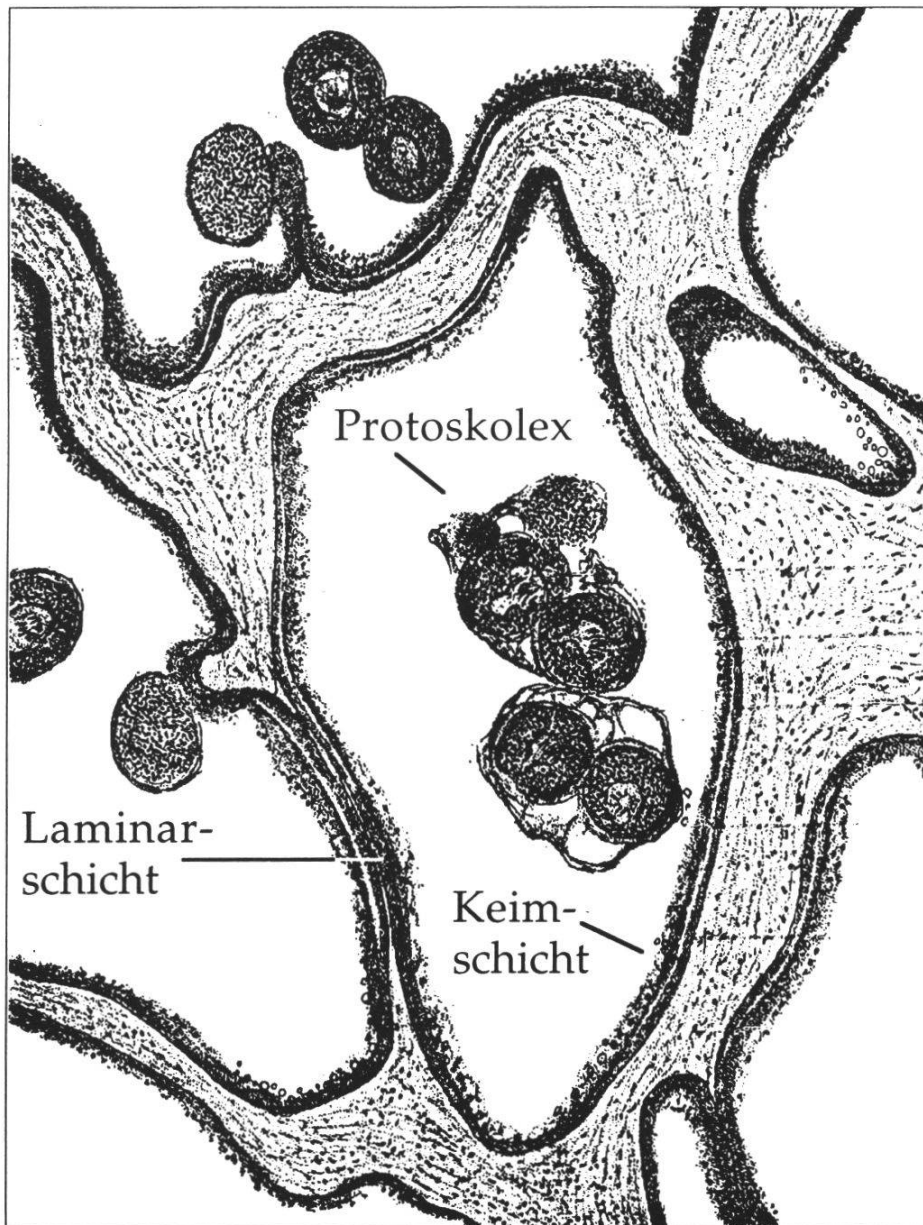


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Schnittes durch *E. multilocularis* (Metazestode) in der Leber einer Maus.

Als Zwischenwirte können sich gelegentlich auch andere Tiere und der Mensch mit Echinokokkeneiern infizieren. So sind durch *E. multilocularis*-Metazestoden verursachte Läsionen in der Leber von Schweinen (SAKUI et al., 1984), Wildschweinen (LUZIUS, pers. Mitteilung), Pferden (MIYAUCHI et al., 1984) und Hunden (LÖSCHER, pers. Mitteilung; ECKERT, pers. Mitteilung) nachgewiesen worden. Abb. 5 und 6 zeigen zu Vergleichszwecken die Morphologie einer *E. granulosus*-Zyste sowie die schematische Darstellung eines histologischen Schnittes durch *E. granulosus*-Zystengewebe. Im folgenden Text wird allerdings auf diesen Parasiten nicht mehr weiter eingegangen.



Abb. 5: Echinokokkenzyste (Hydatide) von *E. granulosus* in der Leber eines Menschen.

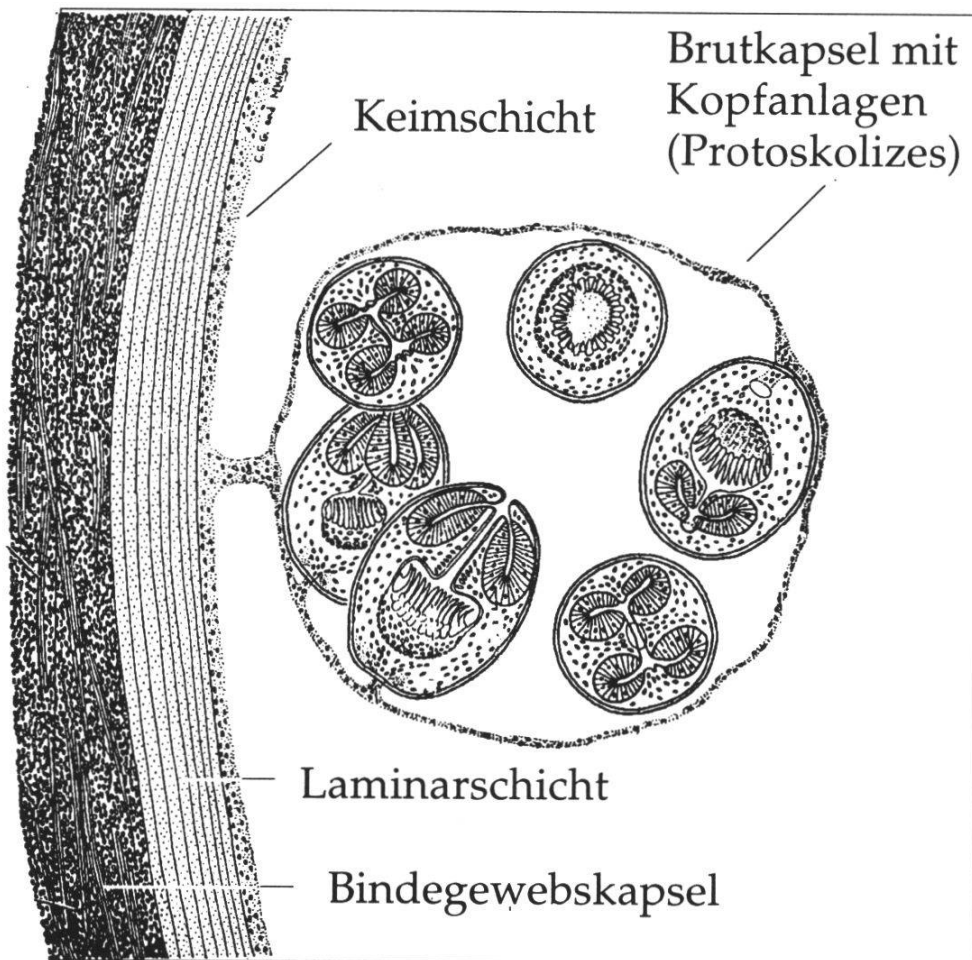


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Schnittes durch *E. granulosus* (Hydatide) in der Leber eines Zwischenwirtes.

### 3. Klinische Manifestationen und Epidemiologie

Der primäre Ansiedlungsort von *E. multilocularis*-Metazestoden ist beim Menschen fast ausschließlich die Leber, wobei sekundär erfolgende Metastasierungen in diversen Organen beobachtet werden, mit absteigender Häufigkeit in der Lunge, im Hirn, in der Niere und anderen Stellen (SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986). Die Leberläsion besteht in der Regel aus einer schwammartigen, von zahlreichen Bläschen durchsetzten Tumormasse, gelegentlich eine zentrale, nekrotische Zerfallshöhle einschließend; Protoskolizes werden praktisch nie gebildet (im Gegensatz zu infizierten Mäusen, in denen Protoskolizes mit der Zeit in den meisten Fällen heranreifen (Abb. 4). Im Gegensatz zu *E. multilocularis* wird bei *E. granulosus* eine klar abgegrenzte und abgekapselte Zyste gebildet, in der auch beim Menschen in der Regel Protoskolizes gebildet werden (Abb. 6).

Da sich das proliferierende *E. multilocularis*-Metazestodengewebe wie ein bösartiger Tumor verhält, ist bei unbehandelten Patienten mit alveolärer Echinokokkose die Letalitätsrate sehr hoch. Nach schleichendem, progredientem Verlauf der Erkrankung sterben nach verschiedenen Angaben aus Deutschland und der Schweiz 52% bis 92% der Patienten innerhalb von 10 bis 14 Jahren nach Diagnosestellung, falls sie unbehandelt bleiben (AMMANN, 1992). Demnach ist die alveoläre Echinokokkose des Menschen eine lebensbedrohende Erkrankung von ähnlichem Gefährlichkeitsgrad wie die Tollwut. Eine vollständige Heilung der alveolären Echinokokkose ist nur bei radikaler chirurgischer Entfernung des Metazestodengewebes möglich. Eine solche Radikaloperation (in der Regel Hemihepatektomie oder erweiterte Trisegmentresektion) ist jedoch nur bei 20 bis 40% der symptomatischen Patienten möglich (AMMANN, 1992). Für Fälle, bei denen keine Radikalresektion durchgeführt werden kann, bieten heute die Chemotherapie (AMMANN, 1992) sowie unter bestimmten Umständen die Lebertransplantation (BRESSON-HADNI et al., 1991) gewisse adjuvante oder alternative Behandlungsmöglichkeiten. Eine Dauertherapie mit Benzimidazolderivaten (Mebendazol oder Albendazol) führt zu einer signifikanten Verlängerung der 10-Jahres-Überlebensrate. Diese liegt derzeit bei 85% (AMMANN, 1992) und ist statistisch signifikant höher als bei historischen Kontrollen. Trotz einer häufig für Jahre bis Jahrzehnte andauernden Chemotherapie werden die Metazestoden in der Regel nicht abgetötet, was die kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffes rechtfertigt. Diesbezügliche Untersuchungen bei Absetzen einer Mebendazoltherapie bei Patienten ohne Radikalresektion ergaben eine Rezidivierungsrate von 37% (AMMANN et al., 1990). Alternativ haben französische Autoren die Lebertransplantation als Therapiemaßnahme propagiert. Allerdings sind die diesbezüglichen Erfahrungen noch gering: 15 Monate nach einer Lebertransplantation betrug die Überlebensrate ca. 70%, d. h. 5 von 17 Patienten verstarben (BRESSON-HADNI et al., 1992).

Die alveoläre Echinokokkose des Menschen tritt innerhalb Europas vorwiegend in Deutschland, Frankreich, Österreich und in der Schweiz auf. In der Schweiz wurden in den Jahren 1970 bis 1983 insgesamt 145 klinische Fälle erfaßt, was einer durchschnittlichen jährlichen Morbiditätsrate von 0,18 Fällen pro 100 000 Einwohner entspricht (STÖSSEL, 1989). In den Jahren 1984 bis 1992 betrug die jährliche Morbiditätsrate 0,11 klinisch-pathologisch bewiesene Fälle von alveolärer Echinokokkose pro 100 000 Einwohner. Die Realzahl dürfte etwas höher liegen und die Rate der vorhergehenden



Erfassungsperiode erreichen. Aufgrund einer seroepidemiologischen Studie an ca. 17 000 Blutspendern in der Schweiz wurde eine Morbiditätsrate von 0,7 bis 1,16 errechnet (GOTTSTEIN et al., 1987). Ähnliche Daten wurden aus Frankreich, Deutschland und Österreich gemeldet (WHO, 1988).

#### 4. Immunologie der alveolären Echinokokkose

Bei den meisten Patienten mit alveolärer Echinokokkose sind im Serum parasiten-spezifische Antikörper der IgG-Klasse nachweisbar sowie bei einigen zusätzlich IgA und IgE (GOTTSTEIN et al., 1984, 1986). Solche Antikörper sind bei immunpathologischen Prozessen mitbeteiligt, wie z. B. bei der gelegentlich beobachteten chronisch-granulomatösen Entwicklung des hepatischen Herdes, bei einer immunkomplex-assoziierten membranösen Nephropathie (OZERETSKOVSKAYA et al., 1978) oder bei amyloiden und immunkomplex-assoziierten histopathologischen Veränderungen der Leber (ALI-KHAN & SIBOO, 1980). Zellulär-immunologisch antworten die meisten Patienten mit einer ausgeprägten Lymphozytenproliferation nach in vitro-Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit *E. multilocularis*-Rohantigen (BRESSON-HADNI et al., 1990; GOTTSTEIN et al., 1991). Immunologische Wirts-Parasit-Interaktionen *in situ* sind bei regredienten Verlaufsformen durch eine Infiltration mit Makrophagen, Myofibroblasten und insbesondere CD4+-Lymphozyten charakterisiert, im Gegensatz zu progredienten Verlaufsformen, bei denen CD8+-Lymphozyten das Geschehen zu dominieren scheinen (VUITTON et al., 1989). Das Mausmodell der alveolären Echinokokkose lieferte aufgrund entsprechender Studien detailliertere Daten zur Immunologie des Zwischenwirtes. Eine erste interessante Beobachtung stellte die im Rahmen einer primären Infektion aufgebaute protektive Immunität gegenüber einer sekundären Infektion dar, obwohl diese Reaktion den primären Metazestoden nicht zu eliminieren vermochte (LLOYD, 1981). Neuere Untersuchungen relativierten diese Beobachtungen, indem verschiedene Inzucht-Mausstämme offensichtlich verschiedene Empfänglichkeits- und Resistenzgrade gegenüber dem Entwicklungspotential von *E. multilocularis*-Metazestoden zeigten: Als gut empfänglich gelten AKR- und C57BL/6J-Mäuse (ALKARMI & ALI-KHAN, 1984; LIANCE et al., 1984; GOTTSTEIN et al., 1994); C57BL/10- (LIANCE et al., 1984; GOTTSTEIN et al., 1994) und C3H/HEJ-Mäuse (YAMASHITA et al., 1958) galten als relativ resistent. Aufgrund früherer Studien galt die Ansicht, daß aktivierte Makrophagen (BARON & TANNER, 1977) und Neutrophile (ALKARMI und BEHBEHANI, 1989) bei der Unterdrückung des Metazestodenwachstums eine Rolle spielen könnten. Spezifischere Hinweise auf das immunologische Geschehen sowie auf die diesbezügliche immungenetische Prädisposition lieferten erst neuere Untersuchungen, die alle im Zusammenhang mit der weiter oben erwähnten schützenden Laminarschicht des Metazestoden zu stehen scheinen: Nur resistente C57BL/10-Mäuse nämlich vermochten Antikörper der Subklasse IgG3 gegen das in der Laminarschicht dominante Em2-Antigen zu bilden (GOTTSTEIN et al., 1994). Da es sich beim Em2-Antigen um ein lektinbindendes Kohlenhydratantigen handelt, kommt es beim beobachteten Phänomen zur augenscheinlichen kausalen Übereinstimmung, indem bei der Maus prinzipiell diese Subklasse gerade für Kohlenhydrate spezifiziert (CALLARD & TURNER, 1990). Empfängliche AKR- und C57BL/6J-Mäuse vermochten solche Antikörper nicht zu synthetisieren.

In der Regel sind die Symptome, die mit der klinischen Erscheinung der alveolären Echinokokkose einhergehen, denen eines Lebertumors, einer Leberzirrhose oder anderer Lebererkrankungen sehr ähnlich. Diagnostisch stehen deshalb bildgebende Verfahren, gekoppelt mit immundiagnostischen Methoden, im Vordergrund (GOTTSTEIN, 1992).

#### *Immunologische Tests zur klinischen und sero-epidemiologischen Diagnose sowie für Verlaufskontrollen*

Maßgebend für die immundiagnostische Qualität eines Tests sind seine diagnostische Sensitivität sowie Spezifität, die beide funktionell abhängig von der Qualität des verwendeten Antigens, vom Isotyp des nachzuweisenden Patientenantikörpers sowie von der eingesetzten Antikörpernachweismethode sind. In früheren Jahren wurden zur Serodiagnose der alveolären Echinokokkose mangels homologer Systeme ausschließlich Tests eingesetzt, die eigentlich für die Serologie der zystischen Echinokokkose (*Echinococcus granulosus*) entwickelt worden waren. Der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) zum Beispiel erbrachte dabei immerhin eine relative Sensitivität von 75%–94% (HESS et al., 1974; SCHANTZ et al., 1983; AUER et al., 1988), die Spezifität war jedoch mit erheblichen Problemen bezüglich Kreuzreaktionen im gesamten helminthologischen Sektor behaftet (SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986). Die beste spezifische Leistung erbrachte der Nachweis einer Antikörperreaktion mit dem sogenannten «Antigen 5» mittels Immunelektrophorese oder ähnlicher Techniken (CAPRON et al., 1967). Anti-«Antigen 5»-Antikörper gehören zu den ersten *Echinococcus*-spezifischen Immunglobulinen, die nach erfolgter Infektion gebildet werden (CAPRON et al., 1967; YONG & HEATH, 1979; CONDER et al., 1980). Die diesbezügliche diagnostische Sensitivität betrug bei der zystischen Echinokokkose 50–80% (Lit. in SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986). Eine Vergleichsstudie hatte gezeigt, daß 58% der Patienten aus der Schweiz mit alveolärer Echinokokkose ebenfalls das «Antigen 5» zu präzipitieren vermochten (GOTTSTEIN et al., 1986a). Die beste diagnostische Sensitivität erbrachte der ELISA mit Hydatidenflüssigkeit als Antigen. Mit einem solchen ELISA konnten bis zu 95% der Patienten mit alveolärer Echinokokkose serologisch erfaßt werden (GOTTSTEIN et al., 1983), wobei gleichzeitig jedoch die Spezifität des Tests zu wünschen übrig ließ. Es bestand deshalb ein offensichtliches Bedürfnis nach einem homologen Test mit optimaleren Testparametern. Wir isolierten deshalb mittels Affinitätschromatographie diejenigen antigenen Komponenten aus einem *E. multilocularis*-Rohextrakt-Antigen, die sowohl bei *E. granulosus* als auch bei *E. multilocularis* vorkommen (die sogenannte Em1-Fraktion) und parallel dazu eine weitere, für *E. multilocularis* hoch-spezifische Fraktion Em2 (GOTTSTEIN et al., 1983). Mit beiden kombinierten Antigenen gelang es, in 95% der Fälle eine alveoläre von einer zystischen Form der Echinokokkose zu differenzieren (GOTTSTEIN et al., 1986b). In weiterführenden Studien ließen sich die immunchemischen Eigenschaften des sogenannten Em2-Antigens charakterisieren (GOTTSTEIN, 1985; DEPLAZES & GOTTSTEIN, 1991). Insbesondere die Verwendung eines Em2-spezifischen monoklonalen Antikörpers (MAbG11) zeigte dabei, daß das Em2-Antigen die antigene Hauptkomponente der den Parasiten schützenden Lamina darstellt. Daß dieser Lamina und somit dem dazugehörenden Em2-Antigen eine besondere biologische Bedeutung zukommt, zeigten fol-

gende Versuche: Mäuse, die mit Parasitenstadien infiziert wurden, welche die Lamina-schicht nicht zu bilden vermochten, wie z. B. Protoskolizes, wurden von den Mäusen erfolgreich abgestoßen (GOTTSTEIN et al., 1992). Es überlebten nur diejenigen Parasitenstadien, wie z. B. Metazestodovesikel oder Onkosphären, die bereits von einer Lamina-schicht umgeben waren, resp. die diese Lamina-schicht innerhalb von 12 Tagen nach Infektion zu bilden vermochten. Mit diesen Erkenntnissen öffneten sich äußerst interessante Perspektiven, im Tiermodell Mechanismen aufzudecken, die für eine vor Erkrankung schützenden Abwehr verantwortlich sein könnten. Daß immunprotektive Mechanismen auch bei humanmedizinischen Fragestellungen Bedeutung erlangen könnten, zeigten die bisher noch sehr selten aufgedeckten Fälle bei Eskimos in Alaska, wo die Patienten ohne irgendeine Therapie erfolgreich eine Spontanheilung durchgemacht hatten (RAUSCH et al., 1987).

Zur Herstellung neuer immundiagnostischer Werkzeuge wurden in letzter Zeit vorwiegend rekombinante DNA-Technologien beigezogen. Die erste publizierte cDNA-Bank von *E. multilocularis* wurde unter Verwendung des *Escherichia coli*-Expressionsvektors  $\lambda$ gt11 durch VOGEL et al. (1988) beschrieben. Es resultierte daraus die Identifizierung eines Klons II/3, dessen Genprodukt, das später bezüglich seiner Expression optimiert wurde (MÜLLER et al., 1989), sehr gute immundiagnostische Eigenschaften aufwies. Das Gen des *E. multilocularis*-Antigens II/3 wurde sequenziert und bezüglich seiner biologischen Bedeutung näher charakterisiert (FELLEISEN & GOTTSTEIN, 1993). Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wies eine teilweise Homologie mit Cytovillin, Moesin und Ezrin auf, alles zytoplasmatische periphere Membranproteine, deren Funktionen bis heute noch unbekannt sind. Spätere Western-, Southern- und Northern-Blot-Analysen ließen erkennen, daß verwandte Gene und Genprodukte ebenfalls in anderen Zestodenarten vorkommen können (FELLEISEN & GOTTSTEIN, in press).

Die Immundiagnose der alveolären Echinokokkose spielt eine zentrale Rolle, wenn eine Frühdiagnose ins Auge gefaßt wird. Der Antikörpernachweis gelingt nämlich bereits dann, wenn eine infizierte Person noch keine Symptome einer alveolären Echinokokkose zeigt (GOTTSTEIN et al., 1987). Bei einer frühen Erfassung der Infektion wird normalerweise eine noch äußerst kleine Leberläsion vorgefunden, so daß die chirurgische Entfernung des Parasiten i.d.R. nicht nur wesentlich erleichtert wird, sondern daß auch die Aussichten, daß die operative Entfernung radikal durchgeführt werden konnte, wahrscheinlicher wird. Demzufolge sind die vollständigen Heilungschancen bei einer solchen Diagnose wesentlich höher (KASAI et al., 1980). Konsequenterweise wurden in diversen Endemiegebieten seroepidemiologische Projekte initiiert, welche die frühzeitige Erfassung von infizierten Personen zum Ziel hatten. Es zeigte sich, daß wegen der geringen Prävalenz in den betreffenden Endemiegebieten für solche Studien nur äußerst spezifische Tests wie der oben erwähnte Em2-ELISA einzusetzen waren (GOTTSTEIN in et al., 1987). Im Rahmen einer bei 17 000 Blutspendern in der Schweiz durchgeführten Studie wurden sechs Em2-seropositive Personen ermittelt. Bei zwei dieser Personen wurde mittels bildgebender klinischer Verfahren (Computertomogramm und Ultraschall) Leberherde nachgewiesen, die eindeutig auf eine (zum Zeitpunkt der Diagnose allerdings noch asymptomatische) alveoläre Echinokokkose hinwiesen. Beide Patienten wurden operiert, einer davon wurde vollständig geheilt (GOTTSTEIN et al., 1987). Ähnliche Studien mit gleich guten Ergebnissen wurden später

in Alaska und in Frankreich durchgeführt. Bei den Studien in Alaska stießen wir auf die weiter oben erwähnten Eskimopatien mit Resistenz gegenüber Erkrankung. Trotz einer Persistenz von anti-Em2-Serumantikörpern bei den Patienten enthielten die extirpierten Leberläsionen kein lebendes Echinokokkenmaterial mehr. Von 12 Eskimopatien mit solchen abgestorbenen Parasiten wurden 5 operiert, weil zum Zeitpunkt der Fallbehandlung noch keine Klarheit über die Inaktivität der Metazestoden bestehen konnte. Da bei allen 5 Patienten beim Operationsmaterial kein aktives Parasitengewebe mehr nachgewiesen werden konnte, verzichtete man bei den 7 weiteren auf eine chirurgische Intervention. Die darauf folgende Langzeitverlaufsstudie bestätigte die Annahme, daß eine Operation bei Patienten mit solchen abgestorbenen Parasiten nicht mehr nötig ist, da bei keinem dieser Patienten bis zum heutigen Tag irgendwelche Veränderungen oder Symptome aufgetreten sind. Inzwischen ist man in Frankreich im Rahmen seroepidemiologischer Untersuchungen ebenfalls auf gesunde Personen mit abgestorbenen Parasiten in ihrer Leber gestoßen (BRESSON-HADNI et al., in press).

Eine klinisch manifest gewordene alveoläre Echinokokkose zieht in den meisten Fällen nicht nur eine chirurgische Sanierung der durch den Parasiten verursachten Läsion und Schädigung mit sich, sondern gleichzeitig auch eine für Jahre bis Jahrzehnte andauernde kontinuierliche Chemotherapie (tägliche Verabreichung von Albendazol oder Mebendazol). Die Medikation hat in ca. 60% der Fälle, in denen keine Radikalresektion des Parasitengewebes möglich war, eine Stabilisierung des Krankheitsprozesses zur Folge, und in ca. 20% der Fälle wird sogar eine Abnahme des Volumens der durch den Parasiten verursachten Läsion beobachtet (regrediente Verlaufsform). In den restlichen ungefähr 20% der Fälle ist die Chemotherapie leider insofern nicht wirksam, als es, wahrscheinlich wegen einer im Metazestodengewebe zu geringen Wirkstoffkonzentration oder aus anderen, bisher unbekanntem Gründen, zu einer weiteren Parasitenentwicklung kommt (progrediente Verlaufsform). Der Grund für die oben erwähnte kontinuierliche Verabreichung hängt mit der Tatsache zusammen, daß die eingesetzten Benzimidazolderivate den Metazestoden in der Regel zwar am Weiterwachsen hindern, ihn jedoch nicht abtöten. Ein so inhibierter Metazestode erwies sich sogar nach mehrjähriger kontinuierlicher Medikation im Mäuseinokulationstest als immer noch vital. So ist es nicht erstaunlich, daß sich immunologische Verlaufsparemeter als ungeeignet erwiesen, indirekt die Vitalität eines Metazestoden zu bestimmen. Es sei daran erinnert, daß gerade die ersten Patienten mit abgestorbenem Metazestoden durch serologische Verfahren (Em2-ELISA) eruiert werden konnten. Ein positives Ergebnis im Em2-ELISA bedeutet somit, daß der Patient, unabhängig vom biologischen Status des Metazestoden, Antikörper gegen das dominante Laminarschichtantigen Em2 gebildet hat. Entfernt der Chirurg entweder vitales Metazestodengewebe oder abgestorbene, aber immer noch azelluläre Laminarschicht enthaltende Läsionen vollständig (d. h. radikal), bringt er auch die anti-Em2-stimulierende Antigenquelle zum Verschwinden. Demzufolge erwies sich der Em2-ELISA als günstig, die Radikalität einer chirurgischen Intervention zu kontrollieren. Fällt die anti-Em2-Antikörperkonzentration in einem potentiell radikal operierten Patienten im Rahmen von Wochen oder Monaten auf «0» (negativ), dann ist die Radikalität der Operation mit größter Wahrscheinlichkeit gegeben. Bleibt eine anti-Em2-Antikörperkonzentration im positiven Bereich persistierend, spricht diese serologische Verlaufs-

form eher für einen nicht vollständig entfernten Metazestoden (GOTTSTEIN et al., 1989). Prognostisch liegt der Wert des post-therapeutischen Em2-Verlaufes somit bei der Abschätzbarkeit, ob eine Operation effektiv radikal verlaufen ist. Anhaltspunkte, daß der zelluläre Immunstatus bei diesen Patienten ebenfalls eine Diskriminierung zwischen Radikalität oder Unvollständigkeit einer chirurgischen Intervention erlaubt, haben kürzliche Studien ergeben (GOTTSTEIN et al., 1991). In der Regel demonstrierten Lymphozyten von Patienten mit Radikalresektion oder von Patienten mit abgestorbenen Metazestoden eine sehr ausgeprägte Stimulierbarkeit mit *E. multilocularis*-Antigenen in vitro, im Gegensatz zu Patienten mit proliferierenden Metazestoden, die signifikant schwächere lymphoproliferative Immunantworten aufwiesen. Die Vermutung, daß die Metazestoden selber den zellulären Immunstatus ihrer Wirte zu beeinträchtigen vermögen, konnte im Tierversuch erhärtet werden. Im Gegensatz zu «resistenten» Mausstämmen wurde bei «empfindlichen» Mausstämmen im Verlauf der Infektion eine wesentliche Reduktion der Immunantwort gegenüber dem unspezifischen Lymphozytenstimulans Concanavalin A beobachtet (GOTTSTEIN et al., 1994), was auf eine aktive Immunsuppression des Wirtes durch den wachsenden Parasiten hinweist.

## **5. Molekularbiologische Methoden: DNA-Proben und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Molekularbiologische Techniken haben sich in letzter Zeit so rasch entwickelt, daß deren Anwendung im parasitologisch-diagnostischen Sektor einen fulminanten Einzug hielt. Die Identifizierung art- oder sogar stadien-spezifischer DNA-Sequenzen oder Genexpressionen stehen im Zentrum der Entwicklung diagnostischer Werkzeuge zur Identifizierung und Charakterisierung von Parasiten, insbesondere von Helminthen. Eine Vielzahl verschiedener DNA-Proben stehen gegenwärtig zur Bestimmung und Gruppierung von *E. granulosus*- (RISHI & MCMANUS, 1987; YAP et al., 1988; LYMBERY & THOMPSON, 1989; BOWLES & MCMANUS, 1993) und *E. multilocularis*-Isolaten (VOGEL et al., 1991) zur Verfügung. Der eigentliche diagnostische Wert solcher Proben bestand darin, daß geeignete DNA-Sequenzen zur Entwicklung der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden konnten. Die PCR wurde ursprünglich von SAIKI et al. (1985) in der Firma *Cetus Corporation* für Forschungszwecke entwickelt. Bei der PCR spielt insbesondere die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase (hergestellt aus thermophilen aquatischen Bakterien der Art *Thermus aquaticus*), bei DNA-denaturierenden Temperaturen von 95°C immer noch enzymatisch aktiv zu bleiben, eine bedeutende Rolle. So kann in wenigen Stunden eine millionenfache Amplifikation der Zielsequenz eines spezifischen Genomabschnittes des Parasiten erreicht werden. Die darauf folgende Visualisierung des Amplifikates stellt molekularbiologisch kein Problem dar. Das Resultat ist eine bisher unerreichbare methodische und somit auch diagnostische Sensitivität, die es im besten Falle erlaubt, sogar nur einzelne Zellen in einem voluminösen diagnostischen Untersuchungsmaterial nachzuweisen (z. B. Metazestodenzellen in Punktionsmaterial oder *Echinococcus*-Eier im Kot von Füchsen). Die erste *E. multilocularis*-DNA-Probe wurde von VOGEL et al. (1991) entwickelt und hieß pAL1. Mittels pAL1 wurden vorerst verschiedene *E. mul-*

*tilocularis*-Isolate mittels Southern-blot-Hybridisierungen charakterisiert (VOGEL et al., 1991). Erst später wurde pAL1 sequenziert und so für die Entwicklung einer PCR verwendbar gemacht (GOTTSTEIN & MOWATT, 1991). Zwei sogenannte Oligonukleotid-primers (BG1 und BG2) definierten dabei ein *E. multilocularis*-spezifisches PCR-Fragment mit einer Länge von 2,6 Kilobasenparen (kbp). Aus dem Genom von 14 voneinander unabhängigen *E. multilocularis*-Isolaten aus der Schweiz, Alaska, Kanada, Frankreich, Deutschland und Japan konnte das 2,6 kbp PCR-Produkt amplifiziert werden, nicht jedoch bei *E. granulosus* oder anderen Zestodenarten. Zwei andere Oligonukleotid-primers (BG1 und BG3) mit einem 0,3 kbp PCR-Fragment erwiesen sich als gattungsspezifisch, indem sowohl *E. multilocularis* als auch *E. granulosus* und *E. vogeli* in der PCR identisch zu reagieren vermochten. Solche Werkzeuge eignen sich nicht nur zur Identifizierung und Charakterisierung von Parasiten-Isolaten, sie bilden auch eine Grundlage, um neue, für den Kliniker nützliche Werkzeuge zu entwickeln. Die Weiterführung der PCR zu einer sogenannten RT-PCR (*reverse transcription* PCR) wird es bald ermöglichen, mRNA von Parasiten im diagnostischen Untersuchungsmaterial nachzuweisen und so z. B. die Vitalität des Parasiten im Biopsie-Probenmaterial nachzuweisen, was zur Effizienzeinschätzung einer langdauernden Chemotherapie von größerem Wert sein wird. Im erwähnten Beispiel würde der Vitalitätsnachweis des Parasiten bei gleichzeitiger Regredienz bedeuten, daß beim betreffenden Patienten eine Chemotherapie trotz momentaner klinischer Besserung unbedingt fortgesetzt werden muß.

## 6. Ausblick

Neue Entwicklungen und Erkenntnisse auf dem Gebiet der Immunologie und der Molekularbiologie der alveolären Echinokokkose des Menschen führten zur Einsicht, daß das Verhältnis zwischen Prävalenz beim Fuchs, beim murinen Zwischenwirt sowie beim Menschen bezüglich des Expositionsrisikos und der eigentlichen Erkrankung neu revidiert werden muß. Wir sind heute der Ansicht, daß wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der Menschen, die sich mit *E. multilocularis*-Eiern infizieren, an alveolärer Echinokokkose erkrankt. Das Aufdecken von Resistenzphänomenen bei der Maus und beim Menschen unterstützen diese Annahme. Darauf basierend könnte die Hypothese aufgestellt werden, daß dem Empfänglichkeits- oder Resistenzphänomen eine immungenetische Prädisposition zugrunde liegt, insbesondere als bei der Maus dieselben Phänomene vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Mausstämme abzuhängen scheinen (GOTTSTEIN et al., 1994). Um der Frage beim Menschen nachzugehen, bestimmten wir mittels sogenannter PCR-SSO die Genfrequenz bestimmter lymphoider Zelloberflächenantigene, die im HLA-DR-Bereich kodiert sind (GOTTSTEIN & BETTENS, 1994). Die Untersuchung beinhaltete Blutproben von 32 Patienten mit alveolärer Leberechinokokkose aus der Schweiz. Bei dieser Patientengruppe fanden wir eine statistisch signifikant erhöhte Häufigkeit des HLA-DR13 [DRB1\*1301,1302]-Gens (Patienten 34,4%, Kontrollgruppe 13,6%;  $\chi^2 = 7.0$ ,  $P = 0.008$ ). Umgekehrt stießen wir auf einen HLA-DR-Marker, der für Resistenz gegenüber Erkrankung verantwortlich sein könnte, indem gesunde Kontrollpersonen das HLA-DR4-Gen signifikant häufiger besaßen als Patienten mit alveolärer Echinokokkose (Patienten 15.6%, Kon-

trollgruppe 41,3%;  $\chi^2 = 6.5$ ,  $P = 0.01$ ). Demzufolge gilt ein Hauptpunkt der heutigen Forschung dem Aufdecken funktioneller Zusammenhänge zwischen dem Potential einer Resistenzvermittlung und diesbezüglicher HLA-Antigene bei resistenten Personen oder resistenten murinen Zwischenwirten. Gelingt die Identifizierung und anschließende molekulare Synthese dazugehöriger Parasitenantigene, könnte mit allergrößter Vorsicht von der Möglichkeit zur Entwicklung einer vor Erkrankung schützenden Vakzine oder eines immuntherapeutischen Wirkstoffes gesprochen werden.

## 7. Literatur

- ALI-KHAN, Z., & SIBOO, R.: Pathogenesis and host response in subcutaneous alveolar hydatidosis. I. Histogenesis of alveolar cyst and a qualitative analysis of the inflammatory infiltrates. *Z. Parasitenkde.* 62, 241–254 (1980).
- ALKARMI, T., & ALI-KHAN, Z.: Chronic alveolar hydatidosis and secondary amyloidosis: pathological aspects of the disease in four strains of mice. *Brit. J. Exp. Pathol.* 65, 405–417 (1984).
- – , & BEHBEHANI, K.: *Echinococcus multilocularis*: Inhibition of murine neutrophil and macrophage chemotaxis. *Exp. Parasitol.* 69, 16–22 (1989).
- AMMANN, R. W.: Alveolar echinococcosis: therapy with surgery, chemotherapy or a combination of the two? *Langenbecks Arch. Chir.* 377, 65–67 (1992).
- – , HIRSBRUNNER, R., COTTING, J., STEIGER, U., JACQUIER, P., & ECKERT, J.: Recurrence rate after discontinuation of long-term mebendazole therapy in alveolar echinococcosis (preliminary results). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 506–515 (1990).
- AUER, H., HERMENTIN, K., & ASPÖCK, H.: Demonstration of a specific *Echinococcus multilocularis* antigen in the supernatant of *in vitro* maintained protoscoleces. *Zbl. Bakt. Hyg.* A268, 416–423 (1988).
- BARON, R. W., & TANNER, C. E.: *Echinococcus multilocularis* in the mouse: the *in vitro* protoscolicidal activity of peritoneal macrophages. *Int. J. Parasitol.* 7, 489–495 (1977).
- BOWLES, J., & MCMANUS, D. P.: Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 231–240 (1993).
- BRESSON-HADNI, S., FRANZA, A., MIGUET, J. P., VUITTON, D. A., LENYS, D., MONNET, E., LANDECY, G., PAINTAUD, G., ROHMER, P., BECKER, M. C., CHRISTOPHE, J. L., MANTION, G., & GILLET, M.: Orthotopic liver transplantation for incurable alveolar echinococcosis of the liver: Report of 17 cases. *Hepatology* 13, 1061–1070 (1991).
- – , LAPLANTE, J. J., LENYS, D., ROHMER, P., GOTTSTEIN, B., JACQUIER, P., MERCET, P., MEYER, J. P., MIGUET, J. P., & VUITTON, D. A.: Sero-epidemiological screening of *Echinococcus multilocularis* infection in 7884 subjects in an European area endemic to alveolar echinococcosis. *Am J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
- – , LIANCE, M., MEYER, J. P., HOUIN, R., BRESSON, J. L., & VUITTON, D. A.: Cellular immunity in experimental *Echinococcus multilocularis* infection. II. Sequential

- and comparative phenotypic study of the periparasitic mononuclear cells in resistant and sensitive mice. *Clin. Exp. Immunol.* 82, 378–383 (1990).
- – , MIGUET, J. P., LENYS, D., VUITTON, D. A., VIENNET, G., BECKER, M. C., ROHMER, P., MANTION, G., & GILLET, M.: Recurrence of alveolar echinococcosis in the liver graft after liver transplantation. *Hepatology* 16, 279–280 (1992).
- CALLARD, R. E., & TURNER, M. W.: Cytokines and Ig switching: evolutionary divergence between mice and humans. *Parasitol. Today* 11, 200–203 (1990).
- CAPRON, A., VERNES, A., & BIGUET, J.: Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. Journées Lyonnaises d'Hydatidologie. SIMEP Editions: Paris 1967.
- CONDER, G. A., ANDERSEN, F. L., & SCHANTZ, P. M.: Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: An evaluation of double diffusion, immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal tests. *J. Parasitol.* 66, 577–584 (1980).
- DEPLAZES, P., & GOTTSTEIN, B.: A monoclonal antibody against *Echinococcus multilocularis* Em2 antigen. *Parasitology* 103, 41–49 (1991).
- EWALD, D., ECKERT, J., GOTTSTEIN, B., STRAUB, M., & NIGG, H.: Parasitological and serological studies on the prevalence of *Echinococcus multilocularis*, LEUCKART, 1863, in red foxes (*Vulpes vulpes* LINNAEUS, 1758) in Switzerland. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 11, 1057–1061 (1992).
- FELLEISEN, R., & GOTTSTEIN, B.: *Echinococcus multilocularis*: Molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3–10. *Parasitology* 107, 335–342 (1993).
- – , – – : Comparative analysis of full-length antigen II/3 from *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. *Parasitology* (in press).
- GOTTSTEIN, B.: Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis*. *Parasite Immunology* 7, 201–212 (1985).
- – : *Echinococcus multilocularis* infection: Immunology and immunodiagnosis. In: *Advances in Parasitology* (J. R. BAKER & R. MULLER, eds.) 31, 321–380 (1992).
- – , & BETTENS, F.: Association between HLA-DR13 and susceptibility to alveolar echinococcosis. *J. Infectious Diseases* 169, 1416–1417 (1994).
- – , DEPLAZES, P., & AUBERT, M.: *Echinococcus multilocularis*: Immunological study on the «Em2-positive» laminated layer during *in vitro* and *in vivo* post-oncospherical and larval development. *Parasitology Res.* 78, 291–297 (1992).
- – , ECKERT, J., & FEY, H.: Serological differentiation between *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* infections in man. *Z. Parasitenkde.* 69, 347–356 (1983).
- – , – – , & WOODTLI, W.: Determination of parasite-specific immunoglobulins using the ELISA in patients with echinococcosis treated with mebendazole. *Z. Parasitenkde.* 70, 385–389 (1984).
- – , LENGELER, C., BACHMANN, P., HAGEMANN, P., KOCHER, P., BROSSARD, M., WITASSEK, F., & ECKERT, J.: Sero-epidemiological survey for alveolar echinococcosis (by Em2-ELISA) of blood donors in an endemic area of Switzerland. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 960–964 (1987).
- – , MESARINA, B., TANNER, I., AMMANN, R. W., ECKERT, J., WILSON, J. F., LANIER, A., & PARKINSON, A.: Specific cellular and humoral immune responses in patients



- with different long-term courses of alveolar echinococcosis (infection with *Echinococcus multilocularis*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 734–742 (1991).
- – , & MOWATT, M. R.: Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction (PCR). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 183–194 (1991).
  - – , SCHANTZ, P. M., TODOROV, T., SAIMOT, A. G., & JACQUIER, P.: An international study on the serological differential diagnosis of human cystic and alveolar echinococcosis. *WHO Bulletin* 64, 101–105 (1986b).
  - – , TSCHUDI, K., ECKERT, J., & AMANN, R.: Em2-ELISA for the follow-up of alveolar echinococcosis after complete surgical resection of liver lesions. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 389–393 (1989).
  - – , WITASSEK, F., & ECKERT, J.: Neues zur Echinokokkose. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116, 810–817 (1986a).
  - – , WUNDERLIN, E., & TANNER, I.: *Echinococcus multilocularis*: Parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57BL/6J) or «resistant» (C57BL/10) to secondary alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 96, 245–252 (1994).
- HESS, U., ECKERT, J., & FRÖHLICH, A.: Vergleich serologischer Methoden für die Diagnose der zystischen und alveolären Echinokokkose des Menschen. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 104, 853–859 (1974).
- KASAI, Y., KOSHINO, I., KAWANISHI, N., SAKAMOTO, H., SASAKI, E., & KUMAGAI, M.: Alveolar echinococcosis of the liver. Studies on 60 operated cases. *Ann. Surgery* 191, 145–152 (1980).
- LIANCE, M., VUITTON, D., GUERRET-STOCKER, S., CARBILLET, J. P., GRIMAUD, J. A., & HOUIN, R.: Experimental alveolar echinococcosis. Suitability of a murine model of intrahepatic infection by *Echinococcus multilocularis* for immunological studies. *Experientia* 40, 1436–1439 (1984).
- LLOYD, S.: Progress in immunization against parasitic helminths. *Parasitology* 83, 225–242 (1981).
- LYMBERY, A. J., & THOMPSON, R. C. A.: Genetic differences between cysts of *Echinococcus granulosus* from the same host. *Internat. J. Parasitol.* 19, 961–964 (1989).
- MIYAUCHI, T., SAKUI, M., ISHIGE, M., FUKUMOTO, S., UEDA, A., ITO, M., & OHBAYASHI, M.: A case of multilocular echinococcosis in a horse. *Jpn. J. Vet. Res.* 32, 171–173 (1984).
- MÜLLER, B., & PARTRIDGE, A.: Über das Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* bei Tieren in Südwürttemberg. *Tierärztl. Umschau* 29, 602–612 (1974).
- MÜLLER, N., GOTTSTEIN, B., VOGEL, M., FLURY, K., & SEEBECK, T.: Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for diagnosis of human alveolar echinococcosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 151–160 (1989).
- OZERETSKOVSKAYA, N. N., TOMOSKAYA, N. I., POVERENNY, A. M., SEROV, V. V., PODGORODNITCHENKO, V. K., SIVAKOV, A. E., & MARISINOVSKI, E. I.: The role of the spleen in the origin of some clinical and immunological features of alveococcosis and echinococcosis. In: «The role of the spleen in the immunology of parasitic diseases». *Tropical Disease Series 1*, 259–272. Schwabe: Basel 1978.
- RAUSCH, R. L., WILSON, J. F., SCHANTZ, P. M., & MCMAHON, B. J.: Spontaneous death

- of *Echinococcus multilocularis*: Cases diagnosed serologically by Em2-ELISA and clinical significance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 576–585 (1987).
- RISHI, A. K., & MCMANUS, D. P.: Genomic cloning of human *Echinococcus granulosus* DNA: isolation of recombinant plasmids and their use as genetic markers in strain characterization. *Parasitology* 94, 369–383 (1987).
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., & ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354 (1985).
- SAKUI, M., ISHIGE, M., FUKUMOTO, S., UEDA, A., & OHBAYASHI, M.: Spontaneous *Echinococcus multilocularis* infection in swine in north-eastern Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 33, 291–296 (1984).
- SCHANTZ, P. M., & GOTTSTEIN, B.: Echinococcosis (Hydatidosis). In: «Immunodiagnosis of Parasitic Diseases» (K. W. WALLS & P. M. SCHANTZ, eds.), 1, 69–107. Academic Press: Orlando 1986.
- – , WILSON, J. F., WAHLQUIST, S. P., BOSS, L. P., & RAUSCH, R. L.: Serologic test for diagnosis and post-treatment evaluation of patients with alveolar hydatid disease (*Echinococcus multilocularis*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1381–1386 (1983).
- STÖSSEL, T.: Literaturübersicht zur Häufigkeit und geographischen Verbreitung der Echinokokkose bei Menschen und Tieren in Ländern der EG und EFTA. *Med. Diss. Zürich/Switzerland* 1989.
- VOGEL, M., GOTTSTEIN, B., MÜLLER, N., & SEEBECK, T.: Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 117–126 (1988).
- – , MÜLLER, N., GOTTSTEIN, B., FLURY, K., ECKERT, J., & SEEBECK, T.: *Echinococcus multilocularis*: Characterization of a DNA probe. *Acta Tropica* 48, 109–116 (1991).
- VUITTON, D. A., BRESSON-HADNI, S., LAROCHE, L., KAISERLIAN, D., GUERRET-STOCKER, S., BRESSON, J. L., & GILLET, M.: Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 78, 67–74 (1989).
- WHO. Report of the WHO informal consultation on *Echinococcus multilocularis* research. WHO/CDS/VPH/88.78: Geneva 1988.
- YAMASHITA, J., OHBAYASHI, M., KITAMURA, Y., SUZUKI, K., & OKUGI, M.: Studies on echinococcosis. VIII. Experimental *Echinococcus multilocularis* in various rodents; especially on the difference of susceptibility among uniform strains of the mouse. *Jpn. J. Vet. Res.* 6, 135–155 (1958).
- YAP, K. W., THOMPSON, R. C. A., & PAWLOWSKI, I. D.: The development of nonradioactive total genomic probes for strain and egg differentiation in taeniid cestodes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 472–477 (1988).
- YONG, W. K., & HEATH, D. D.: Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, and *Taenia ovis*. *Parasite Immunology* 1, 27–38 (1979).
- ZEYHLE, E., & FRANK, W.: Antikörper gegen *Echinococcus multilocularis*. Serologische Untersuchungen. *Münchener Med. Wochenschr.* 124, 1133–1134 (1982).