

Untersuchungen zur Diagnostik und Prophylaxe der alveolären
Echinokokkose bei Makaken

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Karen Ann-Kathrin Lampe
Clausthal-Zellerfeld

Hannover 2013

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.

Lampe, Karen Ann-Kathrin:

Untersuchungen zur Diagnostik und Prophylaxe der alveolären Echinokokkose bei Makaken
ISBN 978-3-86376-064-9

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Deutsches Primatenzentrum Göttingen,
Abteilung Infektionspathologie

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Deutsches Primatenzentrum Göttingen

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. C. Strube, PhD,
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Institut für Parasitologie

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2013

Alle Rechte vorbehalten

1. Auflage 2013

© Optimus Verlag, Göttingen

URL: www.optimus-verlag.de

Coverfoto: © Margrit Hampe – DPZ (Rhesusaffen),

© AtWaG – istockphoto.com, (Fuchs), © Karen Lampe – DPZ (Histologische Aufnahme)

Printed in Germany

Papier ist FSC zertifiziert (holzfrei, chlorfrei und säurefrei,
sowie alterungsbeständig nach ANSI 3948 und ISO 9706)

Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes in Deutschland ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Meinen Eltern und Christian

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Untersuchte Makakenspezies.....	3
2.1.1 Systematik und Vorkommen von Makaken	3
2.1.2 Javaneraffen (<i>Macaca fascicularis</i>)	3
2.1.3 Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>)	4
2.2 Der kleine Fuchsbandwurm <i>Echinococcus multilocularis</i>	5
2.2.1 Taxonomie, Biologie und epidemiologische Aspekte.....	5
2.2.2 Die epidemiologische Situation in Südniedersachsen.....	8
2.2.3 Die alveoläre Echinokokkose des Menschen	10
2.2.3.1 Pathogenese und Klinik.....	10
2.2.3.2 Pathologische und histologische Merkmale.....	13
2.2.4 Alveoläre Echinokokkose bei nicht humanen Primaten	15
2.3 Diagnostik der AE beim Fehlwirt	17
2.3.1 Bildgebende Verfahren.....	18
2.3.2 Serologische Untersuchung	20
2.4 Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen	22
2.4.1 Immunisierung von Zwischenwirten.....	22
2.4.2 Anthelminthische Beköderung von Füchsen.....	24
3 Tiere, Material und Methoden	27
3.1 Tiere, Haltungsbedingungen und tierärztliche Bestandsbetreuung	27
3.2 Prämortale Diagnostik	29
3.2.1 Bildgebende Verfahren.....	29

3.2.2	Hämatologie und klinische Chemie	30
3.2.3	Serologische Untersuchungen	30
3.3	Postmortale Diagnostik	33
3.3.1	Datenaufnahme	33
3.3.2	Sektion und Probenentnahme	35
3.3.3	Histologische Präparationen	35
3.3.4	Histochemische Verfahren und Färbungen	36
3.3.5	Immunhistochemische Untersuchungen	36
3.3.6	Befunderhebung und -dokumentation	37
3.3.7	Nachweis von <i>Echinococcus multilocularis</i> -DNA im Gewebe infizierter Makaken	37
3.3.7.1	DNA-Isolierung aus Gewebeproben	37
3.3.7.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	38
3.3.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.3.7.4	Agarosegelelektrophorese	39
3.3.7.5	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	40
3.3.7.6	Ethanol-fällung von DNA	40
3.3.7.7	Klonierung des PCR-Produktes	40
3.3.7.8	Sequenzierung	42
3.4	Stammbaumanalysen	43
3.5	Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen	44
3.5.1	Impfstudie mit rekombinantem Em 14-3-3-Antigen bei Rhesusaffen	44
3.5.2	Untersuchungen zum Fuchsvorkommen auf dem Gelände des DPZ mittels Fotofallen	46
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Klinische Symptome an AE erkrankter Makaken	49
4.2	Prämortale Diagnostik	49
4.2.1	Bildgebende Verfahren	49
4.2.2	Hämatologie und klinische Chemie	52
4.2.3	Serologische Untersuchungen	54

4.3	Postmortale Diagnostik	62
4.3.1	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	62
4.3.2	Histopathologische Untersuchungen	67
4.3.3	Immunhistochemische Untersuchungen	72
4.3.4	Nachweis von <i>Echinococcus multilocularis</i> -DNA im Gewebe infizierter Makaken	79
4.4	Stammbaumanalysen	81
4.5	Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen	82
4.5.1	Impfstudie mit rekombinantem Em14-3-3-Antigen bei Rhesusaffen	82
5	Diskussion	89
5.1	Klinische Befunde	89
5.2	Prämortale Diagnostik	91
5.2.1	Bildgebende Verfahren	91
5.2.2	Hämatologie und klinische Chemie	92
5.2.3	Serologie	93
5.3	Postmortale Diagnostik	98
5.3.1	Makroskopische Befunde	98
5.3.2	Histologische Befunde	100
5.3.3	Ergänzende Methoden (PCR und Immunhistochemie)	103
5.4	Stammbaumanalysen	104
5.5	Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen	106
5.5.1	Immunisierung mit rekombinantem Em14-3-3-Antigen bei Rhesusaffen	106
5.5.2	Fuchsvorkommen und anthelminthische Beköderung	107
5.6	Ausblick	109
6	Zusammenfassung	113
7	Summary	117
8	Literaturverzeichnis	119
9	Anhang	151

9.1	Anhangstabellen.....	151
9.1.1	Ergebnisse der serologischen Screeninguntersuchung mittels Gesamtlarven-ELISA	151
9.1.2	Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der Javaneraffen	158
9.1.3	Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der Javaneraffen.....	160
9.1.4	Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der Rhesusaffen	162
9.1.5	Übersicht über die an AE verstorbenen Javaner- und Rhesusaffen	164
9.2	Göttinger Mischung II.....	165
9.3	Serologie (Gesamtlarven-ELISA).....	165
9.3.1	Lösungen, Puffer und Reagenzien.....	165
9.3.2	Formel zur Berechnung des „cutoff“ sowie des Index:.....	166
9.4	Protokolle für die Histologie.....	166
9.4.1	Phosphatpuffer.....	166
9.4.2	Fixierlösung.....	167
9.4.3	Paraffineinbettung	167
9.4.4	Histochemische Verfahren und histologische Färbungen von Paraffinschnitten.....	167
9.4.4.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	167
9.4.4.2	Periodic Acid Schiff (PAS)-Reaktion	168
9.4.4.3	Amyloid-Färbung mit Kongorot	169
9.4.5	Protokoll für die Immunhistochemie.....	170
9.5	Primer und Reagenzien für die PCR.....	171
9.6	Chemikalien und Puffer für die Agarosegelelektrophorese.....	171
9.7	Klonierung	172
9.7.1	Medien, Puffer und Reagenzien	172
9.7.2	Bakterienstamm.....	173

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklungszyklus von <i>E. multilocularis</i> (nach GOTTSTEIN 1992).	8
Abb. 2: Schematische Darstellung des ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Gesamtlarvenantigen von <i>E. multilocularis</i> (nach BLANKENBURG 2004).....	32
Abb. 3: Westgelände des Deutschen Primatenzentrums.	48
Abb. 4: Ostgelände des Deutschen Primatenzentrums.	48
Abb. 5: Sonographie der Leber eines Javaneraffe (12331).	50
Abb. 6 : MRT-Aufnahmen eines Javaneraffen.....	51
Abb. 7: CT-Aufnahme und Sektionssitus eines Javaneraffen.	51
Abb. 8: Verlauf der Konzentration der Antikörper gegen <i>E. multilocularis</i> bei vier Tieren zwischen 2008 und 2013 zur exemplarischen Veranschaulichung der verschiedenen beobachteten Verläufe.	59
Abb. 9: Makroskopisches Erscheinungsbild der AE in der Leber bei verschiedenen Makaken.	65
Abb. 10: Makroskopisches Erscheinungsbild der AE in diversen Organen bei verschiedenen Makaken.	66
Abb. 11: Histologische Merkmale der AE bei Makaken (I).	73
Abb. 12: Histologische Merkmale der AE bei Makaken (II).	74
Abb. 13: Histologische Merkmale der AE bei Makaken (III).	75
Abb. 14: Histologische Merkmale der AE bei Makaken (IV).	76
Abb. 15: Histologische Merkmale der AE bei Makaken (V).	77
Abb. 16: Immunhistochemische Merkmale der AE bei Makaken.	78
Abb. 17: Ergebnis der Sequenzierung des aus dem Gewebe eines der an AE erkrankten Makaken isolierten, durch PCR amplifizierten und in den pDrive cloning vector ligierten 250 bp langen Fragmentes	80
Abb. 18: Verlauf der anti-Em-14-3-3-Antikörperkonzentration bei dem ersten vakzinierten Rhesusaffen (13698) über einen Zeitraum von etwa 13 Monaten nach Erstimmunisierung.....	83
Abb. 19: Verlauf der anti-Em-14-3-3-Antikörperkonzentration bei den vier vakzinierten Rhesusaffen vor und nach Immunisierung sowie bei dem Kontrolltier 13703	85
Abb. 20: Aufnahmen der Fotofallen an verschiedenen Lokalisationen des DPZ-Geländes.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die an AE verstorbenen Rhesus- und Javaneraffen sowie die jeweils durchgeführten Untersuchungen.....	34
Tabelle 2:	Übersicht über die für die Impfstudie mit rekombinantem Em 14-3-3-Antigen ausgewählten Versuchstiere und die jeweils verwendete Impfstoffzusammensetzung.....	44
Tabelle 3:	Impfschema und jeweils durchgeführte Untersuchungen und Behandlungen der Tiere der Gruppe 1 und 2.....	46
Tabelle 4:	Übersicht über die 9 Rhesusaffen, deren Serum in der Screeninguntersuchung einmalig oder mehrmals einen eindeutig serologisch positiven Befund aufwies.....	56
Tabelle 5:	Übersicht über die 16 Javaneraffen, deren Serum in der Screeninguntersuchung einmalig oder mehrmals einen eindeutig serologisch positiven Befund aufwies.....	58
Tabelle 6:	Übersicht über die serologische Untersuchung der an AE verstorbenen Makaken mittels Gesamtlarven-ELISA.	60
Tabelle 7:	Ergebnisse der serologischen Untersuchung von fünf verstorbenen Tieren ohne Leberläsionen.....	61
Tabelle 8:	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen des Gewebes ausgewählter an AE verstorbener Makaken.....	80
Tabelle 9:	Ergebnisse der serologischen Screeninguntersuchung der Altweltaffen des DPZ.....	151
Tabelle 10:	Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der serologisch positiven bzw. an AE verstorbenen weiblichen Javaneraffen mit Angabe von Referenzwerten nach SCHUURMAN et al. (2005) und *KOGA et al. (2005)..	158
Tabelle 11:	Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen der serologisch positiven bzw. an AE verstorbenen männlichen Javaneraffen mit Angabe von Referenzwerten nach SCHUURMAN et al. (2005) und *KOGA et al. (2005).	159
Tabelle 12:	Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der serologisch positiven bzw. an AE verstorbenen weiblichen Javaneraffen mit Angabe von Referenzwerten nach SCHUURMAN et al. (2005).	160

Tabelle 13: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der serologisch positiven bzw. an AE verstorbenen männlichen Javaneraffen mit Angabe von Referenzwerten nach SCHUURMAN et al. (2005).	161
Tabelle 14: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der an AE verstorbenen weiblichen Rhesusaffen (dunkelgrau unterlegt) mit Angabe von Referenzwerten nach CHEN et al. (2009).	162
Tabelle 15: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumuntersuchungen der serologisch positiven männlichen Rhesusaffen mit Angabe von Referenzwerten nach CHEN et al. (2009).	163
Tabelle 16: Übersicht über die 22 zwischen 1994 und 2013 an AE verstorbenen Javaner- (<i>M.f.</i>) und Rhesusaffen (<i>M.m.</i>) sowie die jeweils betroffenen Organe und Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen.	164

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) di-ammonium salt
AE	Alveoläre Echinokokkose
ALT	Alaninaminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartataminotransferase
AT	Adenin, Thymin
BALT	Bronchial associated lymphoid tissue
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bildg. V.	bildgebende Verfahren
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
<i>E.</i>	<i>Echinococcus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
FLASH	Fast Low-Angle Shot (schnelle Bildgebung beim MRT)
forw.	forward
g	Gramm
GC	Guanin, Cytosin
GGT	Gammaglutamyltransferase
Gr.	Gruppe
gw	grenzwertig
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
H.&E.	Hämalaun-Eosin
HK	Hämatokrit

HLA	human leukocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare eines DNA-Stranges)
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
klin.	klinisch
km	Kilometer
Ktrl.	Kontrolltier
LB (Medium)	lysogeny broth
m	männlich / Meter
M (mM; μM)	molar (millimolar; micromolar)
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCV	Mean corpuscular volume
MDP	Muramyl Dipeptid
<i>M.f.</i>	<i>Macaca fascicularis</i> (Javaneraffe)
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHC	Major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
Min.	Minute
ml	Milliliter
<i>M.m.</i>	<i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte

PAS	Periodic-Acid-Schiff
Patho. Us.	pathologische Untersuchung
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
<i>P.h.</i>	<i>Papio hamadryas</i> (Mantelpavian)
pmol	Picomol
PNM	P = parasitic mass in the liver, N = involvement of neighbouring organs, M = metastasis
pos	positiv
Res.	Resultat
rev.	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SABC	Streptavidin-Biotin-Complex
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunde
SIV	simian immunodeficiency Virus
SOB (Medium)	super optimal broth
SOC (Medium)	SOB plus 20 mM Glucose
spp.	Spezies
SRV	simian retrovirus
STLV-1	simian T-cell lymphotropic virus type I
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor-Node-Metastasis
U	Units
u.a.	unter anderem
US	Ultraschall
USA	United States of America
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil