

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Die Rolle der pro- und anti- inflammatorischen Zytokine IL-18, IFN- γ und IL-10 in
Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Patiño Mayer
aus Saarlouis

Referent: Prof. Dr. med. O. Liesenfeld

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld
 2. Prof. Dr. med. R.R. Schumann
 3. Prof. Dr. med. D. Schlüter

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Chagas-Infektion	1
1.1.1. Infektionsweg und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Klinik.....	3
1.1.3. Die Diagnostik der Chagas-Infektion.....	3
1.2. Die Chagas-Infektion in Neugeborenen und die kongenitale Übertragung	3
1.2.1. Epidemiologie der kongenitalen Chagas-Infektion.....	3
1.2.2. Klinik, Diagnose und Behandlung der kongenitalen Chagas-Infektion.....	4
1.3. Die Immunantwort auf <i>T. cruzi</i>	4
1.3.1. Die T- Zell Antwort in der Infektion mit <i>T. Cruzi</i>	5
1.3.2. Die NK-Zell Antwort in der Infektion mit <i>T. Cruzi</i>	8
1.3.3. Regulatorische T-Zellen in der Infektion mit <i>T. Cruzi</i>	9
1.3.4. Zytokine im Allgemeinen und IFN- γ , IL-18 und IL-10 im Besonderen.....	9
1.4. Die Immunreaktion in gesunden Neugeborenen und Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion	10
1.5. Kongenitale Toxoplasmose	13
1.5.1. <i>T. gondii</i> und die kongenitale Toxoplasmose.....	13
1.5.2. Diagnostik und Therapie der kongenitalen Toxoplasmose.....	14
1.5.3. Die Immunantwort bei kongenitaler Toxoplasmose.....	15
1.6. Ziele	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Patientengut und Erfassung der anamnestischen und klinischen Daten	17
2.1.1. Studiendesign.....	18
2.1.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
2.1.1.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien der kongenitalen Chagas Gruppe.....	20
2.1.1.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe.....	20
2.1.1.1.3. Ein- und Ausschlusskriterien der Kontrollgruppe.....	21

2.2. Methoden	21
2.2.1. Diagnostik der Chagas-Infektion.....	21
2.2.1.1. Indirekte Methoden.....	21
2.2.1.1.1. ELISA Test zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen <i>T. cruzi</i>	22
2.2.1.1.2. Indirekter Hämagglutinationstest zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen <i>T. cruzi</i>	22
2.2.1.2. Direkter Nachweis von <i>T. cruzi</i>	22
2.2.1.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von <i>T. cruzi</i>	22
2.2.1.2.2. Mikrohämatokrit Test zum Nachweis von <i>T. cruzi</i>	23
2.2.1.2.3. Xenodiagnose zum Nachweis von <i>T. cruzi</i>	23
2.2.1.3. Behandlung der kongenitalen Chagas-Infektion.....	24
2.2.2. Diagnostik zum Nachweis von <i>T. gondii</i>	24
2.2.2.1. ELISA Test zum Nachweis von anti- <i>T. gondii</i> IgG.....	24
2.2.2.2. Hämagglutinationstest zum von Nachweis anti- <i>T. gondii</i> IgG.....	24
2.2.2.3. ELISA Test zum Nachweis von anti- <i>T. gondii</i> IgM.....	24
2.2.2.4. ELISA Test zum Nachweis von anti- <i>T. gondii</i> IgA.....	25
2.2.2.5. Behandlung der kongenitalen <i>T. gondii</i> Infektion.....	25
2.2.3. Gewinnung und Aufbewahrung der Seren.....	25
2.2.4. Quantifizierung von IFN- γ , IL-18 und IL-10 im Serum.....	26
2.2.4.1. Quantifizierung von IL- 18 im Serum.....	26
2.2.4.2. Quantifizierung von IFN- γ im Serum.....	26
2.2.4.3. Quantifizierung von IL- 10 im Serum.....	27
2.3. Statistisches Vorgehen	27
2.4. Ethische Aspekte	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Patienten	29
3.1.1. Klinik, serologische Diagnostik und direkter Nachweis von <i>T. cruzi</i> in der kongenitalen Chagas Gruppe.....	30
3.1.2. Klinik und serologische Diagnostik in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe.....	32

3.1.3. Kontrollgruppe.....	34
3.2. Konzentrationen von IL-18, IL-10 und IFN-γ im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose, kongenitaler Chagas-Infektion und bei der Kontrollgruppe.....	35
3.2.2. Konzentrationen von IL-18.....	37
3.2.3. Konzentrationen von IFN- γ	37
3.2.4. Konzentrationen von IL-10.....	38
3.3. Serumkonzentrationen von IL-18, IFN-γ und IL-10 vor- vs. nach Behandlung in der kongenitalen Chagas Gruppe.....	39
3.4. Korrelation zwischen IL-18, IFN-γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose oder kongenitaler Chagas-Infektion.....	40
3.4.1. Korrelation zwischen IL-18, IFN- γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion.....	40
3.4.2. Korrelation zwischen IL-18, IFN- γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose.....	41
3.5. Korrelation der Zytokinkonzentrationen mit der Klinik.....	43
3.6. Zytokinkonzentrationen in Seren von gesunden Neugeborenen von Chagas positiven Müttern im Vergleich zu Neugeborenen von nicht-infizierten Müttern.....	43
4. DISKUSSION.....	44
4.1. Klinische Daten in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose.....	45
4.2. Zytokinverhalten in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose.....	48
4.2.1. Unterschiede im Zytokinverhalten in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion im Vergleich zu kongenitaler Toxoplasmose und Kontrolle.....	48
4.2.2. Zytokinverhalten in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion vor und nach Behandlung.....	52
4.2.3. Zytokinverhalten in Seren gesunder Neugeborener von <i>T. cruzi</i> positiven Müttern im Vergleich zu Neugeborenen gesunder Mütter.....	53

4.3. Korrelation von IL-18, IFN-γ und IL-10 in Seren von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose.....	55
4.4. Die Korrelation zwischen Zytokinwerten und der Klinik der Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose.....	57
4.5. Schlussfolgerung.....	58
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	60
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	62
7. ABKÜRZUNGEN.....	81
8. ABBILDUNGEN.....	83
9. LEBENSLAUF.....	84
10. DANKSAGUNG.....	86

1 Einleitung

1. Einleitung

1.1. Die Chagas-Infektion

Die Chagas-Infektion wird durch den Protozoen *Trypanosoma cruzi* übertragen, deren Vektor aus der Familie der Triatominen stammt. Eine Studie aus dem Jahr 2002 erwähnt 12 Millionen Infizierte [Pinto Dias *et al.* 2002], nach der WHO sind im Jahre 2010 über 10 Millionen Menschen mit *T. cruzi* in den endemischen Gebieten infiziert (Abb. 1) [WHO, 2010].



Abbildung 1: Chagas-endemische Länder nach der WHO, 1996

1.1.1. Infektionsweg und Epidemiologie

T. cruzi wird auf den Menschen bei dem Saugakt von Raubwanzen der Gattung Triatominen (z.B. *Triatoma infestans*) übertragen (Abb. 2), ein Insekt das lokal als Vinchuca bekannt ist (Abb. 3). Trypanosomen sind Flagellaten mit einem Nucleus und einer Organelle. Sie pflanzen sich asexuell fort [Bittencourt, 1988]. Der Parasit tritt in drei verschiedenen Stadien im Blut oder Gewebe des Infizierten auf (Abb. 2). Metacyclische Trypomastigoten treten durch den Enddarm des Insekts auf Fäkalien über und gelangen bei dem Saugakt über Mikroläsionen der Haut oder den Einstichkanal in den Menschen. Danach gelangen sie in den Blutstrom und besiedeln Muskel- und Nervengewebe, bilden eine Pseudozyste aus und formen Amastigote. Diese gehen erneut in den Blutstrom und infizieren andere Zellen als Trypomastigote. Bei erneutem Stich gelangen diese in den Darm der Raubwanze, wo sie sich erneut in Epimastigote wandeln, sich vermehren, in metacyklische Trypomastigoten wandeln und erneut auf den Menschen übertragen werden

1 Einleitung

können (Abb. 2) [Brener, 1973; Canals *et al.* 1992; Carlier *et al.* 2005].

Trypanosomiasis, American (Chagas disease) (*Trypanosoma cruzi*)

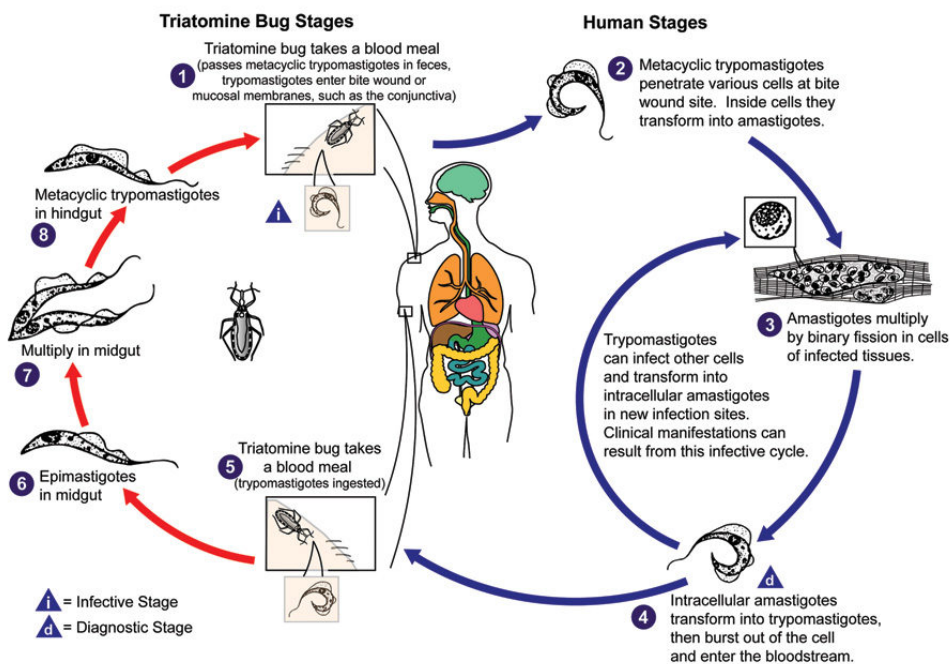


Abbildung 2: Lebenszyklus von *T. cruzi* (aus Centers of Disease Control and Prevention, 2011)



Abbildung 3: *Triatoma infestans*, der Vektor von *T. cruzi* (Bastien JW; Chagas disease in the Americas; The University of Utah Press, 1998)

Die Prävalenz der Infektion in Südamerika bewegt sich zwischen 7.2% in Argentinien bis 18.2% in Bolivien [Schofield *et al.* 1999]. Weinke belegte die Verbindung zwischen Lebensstandard, Inzidenz und Symptomen, die wesentlichen Einfluss auf die ländliche Entwicklung haben [Weinke, 1983]. Die Übertragung über Blutprodukte oder Organtransplantationen ist möglich [Blejer *et al.* 2001]. Die Übertragung in der Schwangerschaft ist ein weiterer wichtiger Weg der Infektion [Bittencourt, 1992; Arcavi *et al.* 1993], und hat in Konsequenz der besseren Vektorkontrolle (Verbesserung der häuslichen Lebensumstände, Aufklärung) proportional in den letzten Jahren zugenommen, in nicht-endemischen Gebieten ist es mittlerweile der Hauptübertragungsweg [Oliveira *et al.* 2010].

1 Einleitung

1.1.2. Klinik

Die klinischen Symptome der Chagas-Infektion treten in zwei Phasen auf: der akuten und der chronischen Phase, die sich bis zu 20 Jahre später entwickeln kann. Infizierte entwickeln bis zur chronischen Phase oft keine Symptome. Akute Symptome mit Fieber, Müdigkeit, vergrößerter Leber und Milz und geschwollenen Lymphknoten treten selten auf und dauern 4 bis 8 Wochen an [Abel *et al.* 2001; Soares *et al.* 2001]. Eine Schwellung tritt an der Stelle des Stiches auf, oder wenn Fäkalien über das Auge eingerieben werden (Romaña-Zeichen). Die Symptome des chronischen Stadiums in Form von Schäden des Herzens, Ösophagus, Kolons und Nerven-Systems, sind irreversibel [Azogue *et al.* 1985].

1.1.3. Die Diagnostik der Chagas-Infektion

Die Diagnostik basiert auf der Klinik und der Präsenz von *T. cruzi* spezifischen IgG Antikörpern; das Mikrohämatokrit Verfahren und die Xenodiagnose werden bei Erwachsenen selten verwendet [Gómes *et al.* 1999]. Die spezifischen Methoden werden in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

1.2. Die Chagas-Infektion in Neugeborenen und die kongenitale Übertragung

1.2.1. Epidemiologie der kongenitalen Chagas-Infektion

In Südamerika schwankt die Prävalenz der *T. cruzi* Infektion in Schwangeren von 2 bis 51% in urbanen Zentren und 23 bis 81% in ländlichen Gegenden [Gürtler *et al.* 2003]. Eine Übertragungsrate von 6.7% unter 315 Neugeborenen wurde in einem Endemiegebiet in Tucumán, Argentinien belegt [Blanco *et al.* 2000]. Azogue wies im Nabelschnurblut von infizierten Müttern in 18.5% *T. cruzi* nach [Azogue *et al.* 1991]. Andere Studien berichten Transmissionsraten zwischen 0.7 und 28% [Arcavi *et al.* 1993; Streiger *et al.* 1995; Moya *et al.* 2005; Velarde *et al.* 2005; Russomando *et al.* 2005; Lorca *et al.* 2005; Bern *et al.* 2011]. Wie bei Erwachsenen verursacht die Infektion hohe sozio-ökonomische Schäden [Billot *et al.* 2005]. Die Rate der Koinfektionen mit *T. gondii*, HIV, *T. pallidum*, CMV und anderen sind hoch [Vissoci-Reiche *et al.* 2000]. Torrico berichtet über die Verbindung zwischen mütterlicher *T. cruzi* Infektion, Morbidität und Mortalität in kongenitaler Chagas: Rückgang von Armut führte zu weniger Morbidität und Mortalität, hatte aber keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Übertragung [Torrico *et al.* 2004].

1 Einleitung

1.2.2. Klinik, Diagnose und Behandlung der kongenitalen Chagas -Infektion

Die Klinik kann asymptomatisch sein, sich aber auch in Kardiomyopathie, Hepatosplenomegalie und Enzephalopathie äußern [Freilij *et al.* 1994; Bern *et al.* 2011]. In zirka 64.8% bleibt sie asymptomatisch [Freilij *et al.* 1995]. In Erhebungen von Freilij und Altcheh von 1995 bis 2005 waren die häufigsten klinischen Symptome bei 168 Neugeborenen Hepatomegalie (27.9%), Hepatitis (11.4%), Sepsis (5.13%), Meningoenzephalitis (2.3%), Myokarditis (2.3%) und Anämie (1.1%) [Altcheh *et al.* 2005]. Infizierte Kinder haben ein bis 30 Prozent erhöhtes Risiko einer gastrointestinalen oder kardialen Erkrankung [Bern *et al.* 2011].

Die Diagnose wird basierend auf Anamnese und Seropositivität der Mutter, sowie serologischen Tests wie IgG ELISA und HA gestellt. Da die IgG Antikörper gegen *T. cruzi* die Plazenta passieren, ist der IgG Nachweis bei Neugeborenen kein Beweis für eine Infektion, so dass hier direkte Nachweismethoden wie Mikrohämatokrit oder PCR nötig sind [Reyes *et al.* 1990; Altcheh *et al.* 2005]. Die Diagnose gilt als gesichert wenn zwei indirekte Nachweise (normalerweise IgG ELISA und IgG HA) und ein direkter Nachweis positiv sind [Freilij *et al.* 1995].

Neugeborene oder Kinder werden zügig behandelt, um das Auftreten klinischer Symptome zu vermeiden [Freilij *et al.* 1983]. Nifurtimox (Lampit[®]) (10-15 mg/kg/d) oder Benznidazol (Rochagan[®]) (5-8 mg/ kg/d) werden hierfür 3 Monate angewandt [Piaggio *et al.* 2001]. Nach der Behandlung erfolgt ein serologisches Follow-up von mindestens 3 Monaten [Suárez *et al.* 2005].

1.3. Die Immunantwort auf *T. cruzi*

Das Immunsystem wird in angeborene und adaptive Immunität untergliedert. Beide beeinflussen sich. Die angeborene Immunantwort handelt schnell, aber unspezifisch durch Beseitigung von Pathogenen im Körper durch Makrophagen und Granulozyten. Diese können z.B. durch Phagozytose Krankheitserreger eliminieren, wie in unseren Falle *T. Cruzi*. Klinische Korrelate sind hier lokale Rötung (nach Stich durch *T. infestans*) und z.B. das Romana- Zeichen [Freilij *et al.* 1994]. *T. cruzi* bewirkt anfänglich eine starke Aktivierung des angeborenen Immunsystems, aber selten erfolgt eine Befreiung von dem Parasiten [Tarleton, 2001]. Hier scheinen immunsupprimierende Aktivitäten von *T. cruzi* eine Rolle zu spielen [Schnapp *et al.* 2002].

Eigenschaft der adaptiven Immunantwort ist hingegen, dass sie ein Gedächtnis entwickelt. Effektoren sind die Lymphozyten. Eine Immunantwort wird eingeleitet, wenn eine Zelle über ihren Rezeptor ein infektiöses Pathogen erkennt. Jede Zelle erkennt ein spezifisches Antigen, da sie einen spezifischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert. Lymphozyten werden in B-Zellen

1 Einleitung

und T-Zellen unterteilt. B-Zellen tragen einen B-Zell-Rezeptor, der entsprechend spezifische Antigene aufnimmt [Janeway *et al.* 2009].

Aktiviert Th-Zellen präsentieren Antigene über MHC-II Proteine auf ihrer Oberfläche und präsentieren diese B-Lymphozyten. Dieses löst die Sekretion von Zytokinen aus, welche zu einer B-Zell-Proliferation und Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen führt. Jede Plasmazelle synthetisiert ein spezifisches Immunglobulin. Diese Antikörper können an ein Pathogen binden, es opsonieren und es für Phagozyten markieren. Außerdem wird das Komplementsystem aktiviert [Janeway *et al.* 2009]. Antikörper besitzen zwei in ihrer Oberflächenstruktur gleiche Antigen-Bindungsstellen und können so an das Pathogen binden und deren Phagozytose und Lyse ermöglichen [Clark *et al.* 2005]. In der akuten Phase der Chagas-Infektion erfolgt eine Expansion von B-Zellen [Carlier *et al.* 1987]. Die daraus folgende humorale Antwort mit Antikörpern trägt zur Resistenz gegen *T. cruzi* bei. Eine Depletion von B-Zell-aktivierten T-Zellen führt zu einer stark erhöhten Parasitämie und Sterblichkeit in infizierten Mäusen [Rottenberg *et al.* 1988].

1.3.1. Die T- Zell Antwort in der Infektion mit *T. Cruzi*

Die Existenz multipler Lebenszyklen hat das immunologische Studium von *T. cruzi* erschwert, da manche Proteine des Parasiten nur in gewissen Zyklen vorkommen [Schnapp *et al.* 2002]. *T. cruzi* wird nach Eindringen in den Wirt von Makrophagen phagozytiert oder dringt aktiv in sie ein und repliziert sich in diesen (Abb. 4). Die Abbauprodukte der dabei mit NO abgetöteten *T. cruzi* werden auf der Zelloberfläche der Makrophagen mit MHC I oder MHC II-Molekülen präsentiert (Abb. 4) [Schnapp *et al.* 2002; Denkers *et al.* 2005]. T-Zellen können keine freien Antigene erkennen, sondern nur die, die im MHC I/II Kontext präsentiert werden. Man unterscheidet CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Solange ein Lymphozyt nicht in Kontakt mit dem Rezeptor-spezifischen Peptid getreten ist, wird er als naiv bezeichnet [Janeway *et al.* 2009]. CD8⁺ T-Zellen erkennen ihr Antigen durch Präsentation der MHC-I Moleküle. Erfolgt eine Infektion der Zelle (Makrophagen, DC) mit *T. cruzi*, werden Fragmente auf der Oberfläche im MHC-I Kontext präsentiert. CD8⁺ T-Zellen spielen hierbei eine wesentliche Rolle in der akuten Infektion, da sie direkt infizierte Wirtszellen abtöten können [dos Santos *et al.* 1990] (Abb. 4). In der chronischen Phase der Infektion beteiligen sie sich an der Zytolyse und Fibrose des Myokards [Antunez *et al.* 2001]. CD8⁺ T-Zellen sekretieren Zytotoxine zur Induktion der Lyse der infizierten Zelle, dabei brauchen CD8⁺ T-Zellen direkte und indirekte Hilfe der T-Helfer Zellen. Diese unterscheiden sich von CD8⁺ T-Zellen durch die Expression des Moleküls CD4⁺. CD4⁺ Zellen erkennen Antigene über MHC-II [Saeftel *et al.* 2001], dass im Falle der *T. cruzi* Infektion von

1 Einleitung

Makrophagen und DC exprimiert wird [dos Santos *et al.* 2001] (Abb. 4). In der Immunantwort entstehen nicht nur Effektor-T-Zellen, sondern auch Gedächtniszellen, die bei einem weiteren Kontakt mit dem Pathogen schneller reagieren. Wichtige Subpopulationen sind Th1- und Th2-Zellen, aber auch T-reg und Th17. Th1-Zellen produzieren Zytokine, welche die zelluläre Immunantwort modulieren, speziell IFN- γ , TNF- α und TNF- β . Diese werden aufgrund ihrer Entzündungsreaktion verursachenden Wirkung als pro-inflammatorische Zytokine bezeichnet. Th2-Zellen sind für die Induktion der humoralen Immunantwort entscheidend und produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Th17 charakterisieren sich durch Produktion von IL-17 und werden als pro-inflammatorisch angesehen, und von IL-6 co-stimuliert (Abb. 4) [Janeway *et al.* 2009].

Die verschiedenen Effekte der Th1- und Th2- Antworten sind für die Bekämpfung von *T. cruzi* von großer Bedeutung. *T. cruzi* wird effektiv durch eine Th1-Immunreaktion bekämpft [Schnapp *et al.* 2002], Th2-Immunität führt stattdessen zu einer Vermehrung von *T. cruzi* und Überführung in die chronisch latente Phase, und ist von der Produktion von IL-10 gekennzeichnet [Saeftel *et al.* 2001]. Ebenfalls wird eine Th2-Antwort eingeleitet, in der Regel findet man bei der Infektion eine gemischte Antwort, mit einer Th1 Dominanz [Antunez *et al.* 2000; Saeftel *et al.* 2001].

Die Entwicklung der naiven T-Helfer-Zelle in eine Zytokin-sekretierende Th1- oder Th2-Zelle erfolgt durch Bindung an den MHC-Komplex über Aktivierung eines stimulatorischen Signals. Die Differenzierung zur Th1- oder Th2-Antwort wird durch die immunologische Umgebung im Zeitpunkt der Aktivierung geprägt. Sekretiert sie in größerer Relation IL-12, kommt es zu einer Th1- Differenzierung, bei erhöhter Sekretion von IL-4 erfolgt eine Polarisierung zur Th2-Zelle (Abb. 4) [Janeway *et al.* 2009]. Beide Th-Subtypen inhibieren hierbei die Differenzierung des jeweils anderen Subtyps (Abb. 4). IL-12 und IFN- γ , das von IL-18 co-stimuliert wird, inhibieren damit die Differenzierung von Th2-Zellen, IL-4 die Differenzierung zu Th1-Zellen [Clark *et al.* 2005]. Im Gegensatz zu der B-Zell-Expansion wird die Proliferation der T-Zellen durch *T. cruzi* unterdrückt [Schnapp *et al.* 2002]. Trotz dieser inhibierten T-Zell-Antwort können sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase inflammatorische Zytokine nachgewiesen werden. Vor allem TNF- α und IFN- γ werden permanent in den parasitierten Geweben freigesetzt [Schnapp *et al.* 2002]. Die Produzenten sind jeweils unterschiedliche Zellpopulationen.

Während in der chronischen Phase vor allem CD8+ T-Zellen die Gewebeinflammation verursachen, sind in der akuten Phase CD4+ T-Zellen und NK-Zellen von Bedeutung. Für eine erfolgreiche Immunantwort gegen *T. cruzi* ist es entscheidend, dass sich eine Th1 Immunantwort ausbildet. Unterstützt wird dies durch Sekretion von IL-12, welches insbesondere von infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert wird (Abb. 4). IL-12 bewirkt in T- und NK-Zellen die Sekretion von IFN- γ , dieses induziert in infizierten Zellen Prozesse zur effektiveren

1 Einleitung

Bekämpfung der intrazellulären Parasiten, mit dem Hauptmediator NO (Abb. 4) [Saeftef *et al.* 2001].

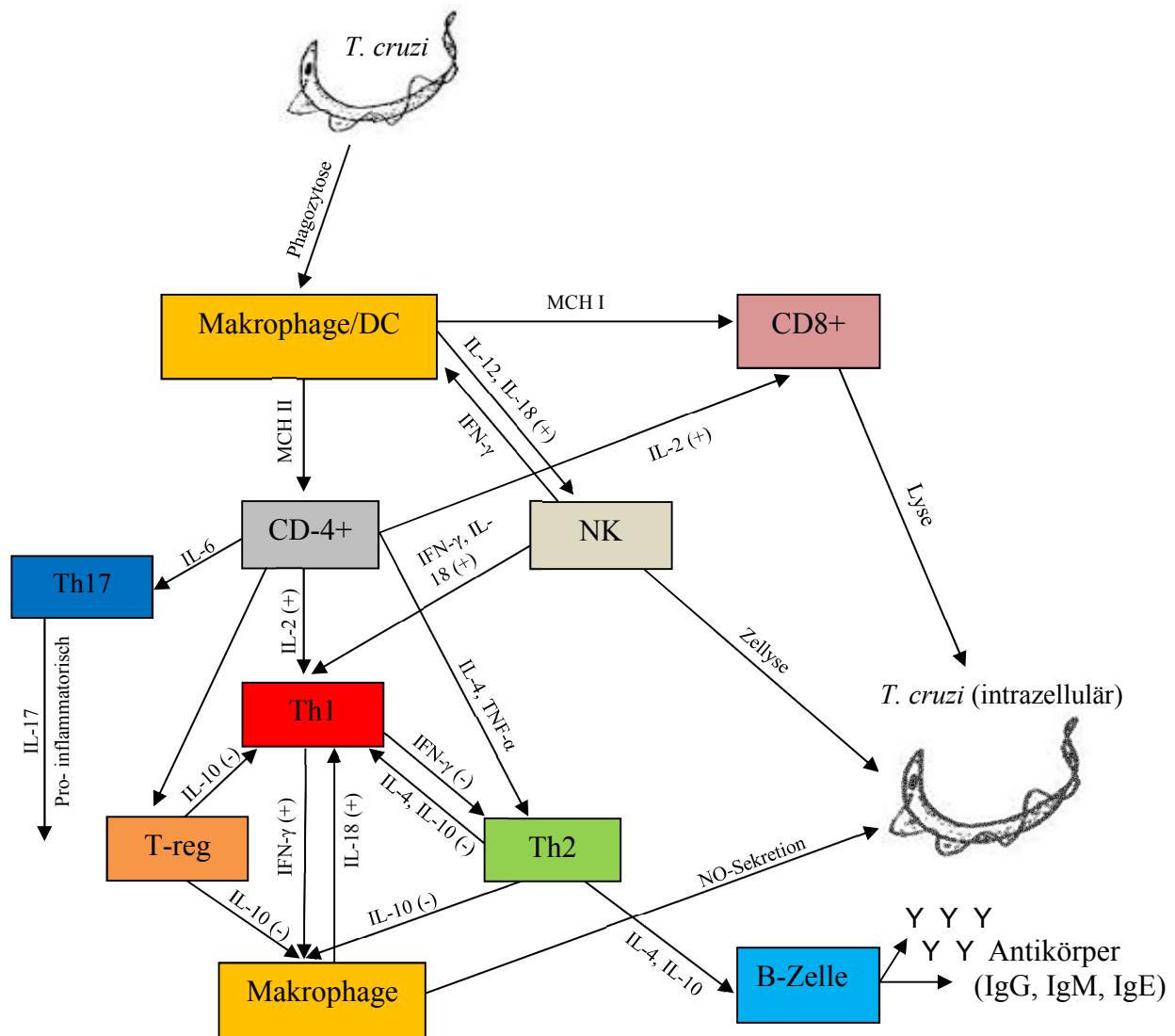


Abbildung 4: Schema der T-Zell Antwort auf *T. cruzi*: Abtöten des Parasiten unter co-Stimulierung von IFN- γ , hauptsächlich sekretiert von Th1 und NK -Zellen. Nachdem *T. cruzi* von Makrophagen oder DC phagozytiert oder erkannt wurde, produzieren diese Zytokine (TNF- α , IL-12), die eine Migration und Aktivierung inflammatorischer Zellen bewirken (nicht abgebildet). Unter Mithilfe von DC Zellen werden die naiven T-Zellen unter Präsentation von MHC II auf der Oberfläche unter co-Stimulation von IL-18 (u.a. über NK-Zellen, Makrophagen) und IFN- γ zu einer inflammatorischen Th1 Antwort geführt, aber auch Th17 oder T-reg. IL-12 und IL-18 induzieren T-Lymphozyten zur Produktion von IFN- γ , dass zu einer Makrophagen-Aktivierung und NO Sekretion führt, was wiederum zur Lyse der befallenen Zelle führt. IL-10 reguliert die Makrophagen-Aktivierung und inflammatorische Immunantwort, was der Proliferation des Parasiten entgegenkommt. (-): inhibierend; (+): stimulierend

Schaltet man in Mäusen Gene für IL-12 oder IFN- γ aus, haben diese eine signifikant höhere Sterblichkeit bei Infektion mit *T. cruzi* [Une *et al.* 2003]. Kumar berichtete, dass der Transfer von spezifischen Th1-Zellen, aber nicht von Th2-Zellen Mäuse vor einer tödlichen *T. cruzi* Infektion bewahrten [Kumar *et al.* 2001] und in Verbindung mit CD4+ und CD8+ Zellen tragen

1 Einleitung

NK-Zellen zur frühen Abwehr durch frühzeitige IFN- γ Produktion in der akuten Infektion bei [Cardillo *et al.* 1996]. Dies aktiviert Makrophagen, nach NO und TNF- α Produktion, intrazelluläre Parasiten zu zerstören [Antunez *et al.* 2004]. IFN- γ und NO-Sekretion werden auch mit der Pathogenese der chronischen Krankheit in Verbindung gebracht, speziell der Kardiomyopathie durch Provokation der schweren Gewebeschäden [Antunez *et al.* 2001; Machado *et al.* 2008]. Morato beschrieb das Zytokinprofil in der experimentellen Chagas-Infektion in 2 Maustypen. Immunkompetente Mäuse (B10.D2) entwickelten eine schwerere Infektion als immunkompromitierte (DBA/2) [Morato *et al.* 1998]. Eine ausgeprägte Immunantwort in anfälligen Mäusen trug zur schweren Erkrankung mit erhöhten Titern von IL-10, IL-4 und IFN- γ bei [Araujo *et al.* 2000]. IL-12 und IL-18 sind in Mäusen mit akuter *T. cruzi* Infektion erhöht, und im Vergleich zu IFN- γ früher nachweisbar [Meyer zum Büschenfelde *et al.* 1997]. Die Balance zwischen den protektiven (IFN- γ) und gegenregulatorischen Zytokinen (IL-10) ist der entscheidende Faktor in der Determinierung der Anfälligkeit gegen *T. cruzi* [Rottenberg *et al.* 1988; Meyer zum Büschenfelde *et al.* 1998]. IL-12-defiziente Mäuse sind hoch anfällig gegen *T. cruzi*, und IL-18 aktivierte CD4⁺ T-Zellen sind die Quelle der IL-12 unabhängigen IFN- γ Produktion [Une *et al.* 2000]. Es zeigte sich, dass IL-18 unabhängig von IL-12 in *T. cruzi* infizierten Mäusen die IFN- γ Produktion in CD4⁺ T-Zellen anregt [Müller *et al.* 2001]. In einem gering virulenten *T. cruzi* Strang ist IFN- γ wichtiger für die Kontrolle der Infektion als NO oder spezifisches IgG [Marinho *et al.* 2001]. Die Serum-Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α waren in einer anderen Studie in chronischen Patienten im Vergleich zu nicht-infizierten aber nicht erhöht [Ward *et al.* 1999]. Die pro-inflammatorische Th1 Antwort charakterisiert durch IFN- γ Ausschüttung, scheint zur Zellschädigung bei Menschen im chronischen Stadium der Infektion beizutragen. Eine höhere IFN- γ Ausschüttung kann in Patienten, die eine Kardiomyopathie entwickeln, im Vergleich zu asymptomatischen Patienten nachgewiesen werden [Saeftel *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2002].

1.3.2. Die NK-Zell Antwort in der Infektion mit *T. Cruzii*

NK-Zellen können vor einer T-Zell-induzierten Immunantwort mit Zytokin-Sekretion auf ein Pathogen reagieren, wodurch sie eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen [Janeway *et al.* 2009]. Es können zwei NK-Zelltypen unterschieden werden: 1: die zytotoxischen NK-Zellen, die das intrazelluläre Pathogen *T. cruzi* über Zellyse direkt angreifen (Abb. 4). Sie stellen den größten Anteil dar. 2: die Zytokin-produzierenden NK-Zellen. Diese können mit Zytokinen auf Stimuli reagieren, z.B. IL-12 und IL-18 induzieren IFN- γ , IL-12 und IL-15 induzieren IL-10 [Romagnani, 2006]. Die Sekretion von IFN- γ , welches eine Th1 Immun-

1 Einleitung

antwort auslöst und IL-10, das eine gegenteilige Wirkung besitzt, zeigt, dass NK-Zellen regulativ wirken (Abb. 4). Eine Depletion von NK-Zellen in vivo bei *T. cruzi*-Infektion führt zu verminderten IFN- γ -Konzentrationen und einer erhöhten Suszeptibilität in Mäusen [Cardillo *et al.* 2002]. Es konnte über eine zweite Beteiligung von NK-Zellen bei der Immunabwehr gegen *T. cruzi* berichtet werden: NK-Zellen gehen eine direkte Interaktion mit extrazellulären *T. cruzi* ein, was zu einer erniedrigten Mobilität von *T. cruzi* führt [Hatcher *et al.* 1982].

1.3.3. Regulatorische T-Zellen in der Infektion mit *T. Cruzi*

CD4⁺CD25⁺ T-reg-Zellen wurden zunächst aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Obwohl die Suppression der T-Zell-vermittelten Immunantwort dem Parasiten entgegen kommt, ist der Schutz gegen die Zellschädigung zum Nutzen des Patienten. Wichtig in der Kontrolle der Immunantwort sind hierbei die T-regulatorischen Zellen (T-reg), die in sie eingreifen, um eine schädigende Immunopathologie zu vermindern [Powrie *et al.* 2003]. Das Vollblut von Patienten in der indeterminanten Chagas Form zeigte eine erhöhte Anzahl T-reg Zellen nach Stimulation mit *T. cruzi* als bei Patienten mit der kardialen Chagas-Form, was nahelegt, dass die Expansion von T-regs zur Limitierung der Gewebeschädigung durch die zytotoxische Aktivität beiträgt [de Aaraujo *et al.* 2011].

1.3.4. Zytokine im Allgemeinen und IFN- γ , IL-18 und IL-10 im Besonderen

Zytokine sind von Zellen produzierte Botenstoffe. Ihre Wirkungsweise ist variabel und synergistisch. Sie wirken auf viele Zelltypen. Zytokine können auf die Zelle selbst, auf Zellen der Umgebung oder systemisch wirken. Sie bewirken eine Veränderung der Genaktivität der Zelle. Die Wirkung ist abhängig vom Ort und der weiteren immunologischen Situation [Romagnani, 2006]. **IFN- γ :** IFN- γ wird als pro-inflammatorisch beschrieben. Es wird von CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen sekretiert und von IL-12 und IL-18 co-induziert. In CD4⁺ T-Zellen ist die Expression von IFN- γ charakteristisch für Th1-Zellen. Es stimuliert die Th1-Immunantwort, während Th2-Zellen inhibiert werden [Romagnani, 2006]. Makrophagen werden durch IFN- γ aktiviert, was in einer Synthesestimulation von NO in diesen resultiert [Nathan *et al.* 1986]. Die NO-Induktion ist daher determinant für die antiparasitäre Wirkung von IFN- γ auf *T. cruzi*.

IL-18: IL-18 wird durch Makrophagen, Kupfer-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Epithelien und Mikrogliazellen sekretiert [Jonuleit *et al.* 1998; Janeway *et al.* 2009]. IL-18 wurde zunächst als IFN- γ -induzierender Faktor (IGIF) bezeichnet. IL-18 triggert die Freisetzung

1 Einleitung

von IFN- γ durch Th1-Zellen, aber auch unpolarisierten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und DC. Es induziert zusammen mit IL-12 IFN- γ in T-Zellen, aber auch IL-12 unabhängig. Während die Proliferation der Th1-Zellen durch IL-18 gesteigert wird, hat es auf Th2-Zellen keinen Effekt [Yoshimoto *et al.* 1998]. Makrophagen sezernieren IL-12 und IL-18, was zu einer IFN- γ Induktion führt. Hierdurch wird die Entstehung einer Th2-orientierten Immunreaktion antagonisiert.

IL-10: Die Produktion von IL-10 durch Th2, T-regs, DC und Makrophagen verhindert die exzessive Zytokinproduktion von Th1- Zellen (Abb. 4) [Belkaid *et al.* 2005; Roncarolo *et al.* 2006; Wu *et al.* 2007]. Es hat ebenfalls einen anti-apoptotischen Effekt auf B-Zellen [Afzali *et al.* 2007]. Es reduziert die Makrophagen-Aktivität und ist nötig, um in Mäusen Zellschädigungen aufgrund zu strenger T-Zell Aktivierung zu vermeiden [Gazzinelli *et al.* 1992]. Die IFN- γ Ausschüttung ist in Mäusen nach Applizierung von IL-10 Antikörpern erhöht, während die Abwesenheit von IFN- γ produzierenden NK-Zellen zur erhöhten IL-10 Produktion führt [Cardillo *et al.* 1996]. Im Gegenteil dazu erhöht IL-10 die humorale Immunantwort durch Stimulation der IgG, IgM und IgA Produktion [Meng *et al.* 1998]. In mit *T. congolense* infizierten Mäusen führt die Blockade der IL-10 Rezeptoren zu verkürzten Überlebenszeiten mit erhöhter IFN- γ Sekretion [Shi *et al.* 2003]. *T. cruzi* infizierte IL-10 KO Mäuse haben geringere Parasitenzahlen in Blut und Gewebe und erhöhte IFN- γ und NO Produktionen als wilde Mäuse. Die Behandlung von IL-10 KO Mäusen und wilden Mäusen mit synthetischen IL-10 resultiert in einer erhöhten Parasitämie der IL-10 KO Mäusen [Abrahamson *et al.* 1996].

1.4. Die Immunreaktion in gesunden Neugeborenen und Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion

Die Immunantwort des Neugeborenen steht in enger Verbindung zur Immunlage in der Schwangerschaft [Strittmatter *et al.* 2007]. Die Schwangerschaft und ihr Erfolg sind eigentlich mit einer kompetenten Th1 Immunantwort inkompatibel. IFN- γ produzierende CD4⁺/CD8⁺ T- Zellen sind in der Schwangerschaft signifikant erniedrigt, IL-10, IL-4 und IL-5 erhöht, was eine Verlagerung zur Th2 Immunantwort nahelegt [Ragupathy, 1997]. Neonatale CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sind, geprägt durch ihren Phänotyp, unreifer als in Erwachsenen [Ragupathy, 2001].

Die Abstoßung des "allografts" Fetus durch reaktive T-Zellen muss in der Schwangerschaft verhindert werden; dieser Effekt wird durch Trophoblasten-induzierende Faktoren wie Progesteron und Relaxin moduliert [Sacks *et al.* 1999; Geis *et al.* 2001]. Neue Studien zeigen, dass IL-10 produzierende Zellen über die Erhöhung der Toleranz in der Schwangerschaft den Abort verhindern [Guleria *et al.* 2007]. Die IL-10-Produktion durch T-regs ist bei Mäusen in der Schwanger-

1 Einleitung

schaft erhöht [Zenclussen, 2005]. T-regs scheinen das mütterliche Immunsystem so zu beeinflussen, dass es der Antigenpräsenz bewusst ist und sie nicht angreift [Zenclussen, 2006]. Erhöhungen von IL-10 nach dem Transfer von protektiven T-regs in der Schwangerschaft in Mäusen zeigten, dass sie dies über die Sekretion von IL-10 erreichen [Guleria *et al.* 2007]. T-regs produzieren Inhibitor co-stimulierende Moleküle und supprimieren so Funktionen von Antigen präsentierenden Zellen. In der Immunentwicklung des Neugeborenen läuft die Polarisierung zu Th2/T-reg nach der Geburt zunächst weiter [Levy, 2007]. Die mütterliche Immunität beeinflusst die Antikörper- und Zell-basierte Immunität des Nachwuchses [Morein *et al.* 2002]. In menschlichen Neugeborenen und Kindern zeigt sich eine altersabhängige Sekretion von IL-5 und IL-10, obwohl insgesamt vermindert im Vergleich zu Erwachsenen [Härtel *et al.* 2005]. Die IFN- γ Titer sind signifikant niedriger in gesunden Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen, während die Th2 abhängige IL-4 Produktion sich kaum unterscheidet [Protonotariou *et al.* 2004]. Dieses lässt sich auf die meisten Infektionen übertragen. Tabelle 1 fasst weitere Studien der Immunreaktion Neugeborener in weiteren Infektionen zusammen.

Tabelle 1: Immunantwort in Neugeborenen mit kongenitalen Infektionen.

Pathogen / Infektion	Patient/ Proben	Zytokinantwort
HIV [Kuhn <i>et al.</i> 2001] [Kuhn <i>et al.</i> 2002]	Nabelschnurblutzellen von 71 HIV + & HIV – Müttern	IFN- γ und IL-10 Produktion erhöht bei infizierten NG
	Nabelschnurblutzellen von HIV + und HIV – NG von HIV + Müttern	HIV+ haben mehr CD4+ Zellen, weniger IL-2 + IFN- γ und höhere IL-4 und IL-5 Titer
RSV [Tsutsumi <i>et al.</i> 1996]	Nabelschnurblutzellen von NG vs. Erwachsenenzellen nach in vitro Infektion	Erhöhte TNF- α und IL-6 Sekretion und erniedrigte IFN- γ /IL-12 Titer in NG
HSV [Burchet <i>et al.</i> 1992]	Peripheres Blut von 13 Neugeborenen und 3 Frauen postpartal mit frischer HSV Infektion	Neugeborenen und Frauen zeigen verminderte IFN- γ Produktion im Vergleich zu (-) Kontrolle
B-Streptokokken [La Pine <i>et al.</i> 2003]	Zytokinsekretion von Nabelschnurblutzellen vs. adulte	IL-12, IL-18, IFN- γ Produktion in NG im Vergleich vermindert
<i>P. falciparum</i> [Fievet <i>et al.</i> 1996]	164 Nabelschnurblutproben von (+) Müttern vs. Erwachsene	Verminderte IFN- γ Titer in NG im Vergleich zu Erwachsenen

NG: Neugeborene

1 Einleitung

Zusammenfassend zeigen diese Erkrankungen mit Ausnahme von HIV eine verminderte pro-inflammatorische Immunreaktion in kongenitalen oder kindlichen Infektionen. Fievet beschreibt hochgradig reduzierte IFN- γ Titer in 164 Nabelschnurblutentnahmen von kamerunischen Neugeborenen von *P. falciparum* infizierten Müttern im Vergleich zu Erwachsenen aus derselben Umgebung [Fievet *et al.* 1996]. Die Infektion der Plazenta treibt die Neugeborenen zu einer Th2-orientierten Immunantwort gegen *P. falciparum* Antigene, wobei die IFN- γ Ausschüttung durch neonatale T-Lymphozyten reduziert wird [Ismaili *et al.* 2003]. Die plazentare Malaria ist hierbei mit einer Erhöhung von Antigen-spezifischen IL-10 produzierenden CD4+ T-Zellen in Zellkulturen aus Nabelschnurblut assoziiert. Der Erhalt dieser Zellen in Utero unterdrückt hierbei die Pathogen-Antigen induzierte Th1-Immunantwort [Brustoski *et al.* 2005]. Es gibt nur wenige detaillierte Berichte über die Immunantwort in Neugeborenen mit *T. cruzi* Infektion. Es ist nachgewiesen, dass die mütterliche *T. cruzi* Infektion in Utero die angeborene, als auch die adaptive Immunreaktion des Neugeborenen durch Transfer von Antigenen über die Plazenta moduliert [Truyens *et al.* 2005]. Samudio berichtet von einer Studie in 25 Kleinkindern mit Chagas: akut infizierte Kinder zeigen eine erhöhte zellvermittelte und humorale Immunantwort mit Aktivierung von pro- (IL-2, IFN- γ) und anti-inflammatorischen (IL-4, IL-10) Zytokinen [Samudio *et al.* 1998]. IFN- γ , IL-10 und TNF- α Titer wurden ebenfalls in Seren von Müttern gemessen, welche *T. cruzi* infizierte oder nicht infizierte Kinder zur Welt brachten. Weder IL-10 noch IFN- γ zeigten sich in beiden Gruppen erhöht [Cardoni *et al.* 2004].

In einer Studie mit nicht-infizierten Neugeborenen von *T. cruzi*-positiven Müttern, sind Vollblutzellen fähig hohe Mengen an pro-inflammatorischen IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie anti-inflammatorisches IL-10 nach Parasitlysat-Aktivierung zu produzieren [Vekemans *et al.* 2000]. Feten die kongenital lebenden Pathogenen exponiert wurden, sind in der Lage eine den Erwachsenen ähnliche T-Zell vermittelte Immunreaktion mit Parasit-spezifischen IFN- γ produzierenden CD8-T-Zellen zu entwickeln, die IFN- γ produzieren, nachdem sie in Vollblutzellen mit *T. cruzi* inkubiert wurden [Hermann *et al.* 2002]. Die Parasitenzahlen und Immunantwort in Vollblutzellen *T. cruzi*-positiver Mütter, welche die Infektion auf ihre Kinder übertrugen, sind weniger aktiviert mit verminderten IFN- γ als in nicht übertragenden Müttern. Die kongenitale Übertragung ist hierbei mit hohen Parasitenzahlen assoziiert. Die Proportion von CD56+ NK-Zellen war im Nabelschnurblut von kongenital infizierten Neugeborenen signifikant erniedrigt. Die verbleibenden CD56+ NK-Zell Produktion zeigt weniger IFN- γ nach in vitro Aktivierung mit IL-12 und IL-2 oder IL-12 im Vergleich zu NK-Zellen nicht infizierter [Hermann *et al.* 2004].

In der einzigen Studie, in der die Seren nicht-infizierter Neugeborener und ihrer infizierten Müttern verwendet werden, werden IFN- γ , TNF- α , IL-10, und TGF- β 1 in chronisch infizierten Müt-

1 Einleitung

tern mit erhöhter Parasitämie und ihren nicht-infizierten Neugeborenen per ELISA im peripheren Blut, Nabelschnurblut und plazentaren Blut bestimmt, und mit denen mit geringer Parasitenlast verglichen. TNF- α ist hier höher bei Müttern mit erhöhter Parasitämie und ihren Neugeborenen als bei denen mit geringer Parasitenlast, während die IL-10 und TGF- β 1 Werte bei allen 3 Entnahmestellen in beiden Gruppen unverändert sind. Dies legt nahe, dass die erhöhte Parasitenzahl die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine anregt [Cuna *et al.* 2009]. In anderen Studien mit *T. cruzi*-infizierten Ratten schützte die Verabreichung von IFN- γ den Nachwuchs vor der akuten Infektion [D'Avila *et al.* 1996], verringerte das Parasitenwachstum, resultierte in einer erhöhten IgG Synthese [Didoli *et al.* 2000], und identifizierte IFN- γ als Schlüsselzytokin der Resistenz gegen *T. cruzi* [Torricco *et al.* 1991]. Es zeigte sich, dass die Behandlung *T. cruzi*-infizierter Mäuse mit Pentoxifylin, welches die IFN- γ Produktion reduziert, die fetale Sterblichkeit im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen senkt [Mjihdi *et al.* 2004].

Basierend auf diesen Studien spielen beide Zytokinwege eine wichtige Rolle in Neugeborenen mit *T. cruzi* Infektion. Da die Th1 Immunantwort den Fetus schädigen kann, scheint es einen Shift zur Th2 Antwort zu geben, welcher bereits in der Schwangerschaft moduliert wird.

1.5. Kongenitale Toxoplasmose

1.5.1. *T. gondii* und die kongenitale Toxoplasmose

T. gondii ist der Erreger der Toxoplasmose. Aufgrund seiner geringen Wirtsspezifität ist der Erreger befähigt ein breites Spektrum von Lebewesen zu infizieren, Endwirt ist die Hauskatze. Serologische Untersuchungen bei in Zentraleuropa lebenden Menschen ergaben eine Durchseuchungsrate bis 58% [Tenter *et al.* 2000]. *T. gondii* tritt im Verlauf seines Entwicklungszyklus in verschiedenen Stadien auf: Tachyzoiten, die sich innerhalb der Zelle im Wirt rasch vermehren und Pseudozysten ausbilden, Bradyzoiten, welche sich innerhalb von Zysten und langsamer als die Tachyzoiten vermehren. Sie können im befallenen Organismus viele Jahre im Gewebe persistieren. Die Zysten entwickeln sich aus den Pseudozysten, insbesondere im Gehirn und Muskulatur der Zwischenwirte. Die einsetzenden Abwehrreaktionen des Wirtes scheinen diese Entwicklung zu begünstigen. Menschen und Tiere können sich durch die orale Aufnahme zystenhaltigen Fleisches oder Exkrementen infizieren. Oozysten entstehen dann als Endprodukt im Darmepithel von Katzen. Diese mit dem Kot ausgeschiedenen Dauerstadien sporulieren innerhalb weniger Tage und sind für Menschen infektiös [Tenter *et al.*, 2000]. Eine Erstinfektion einer zuvor seronegativer Schwangeren führt im 3. Trimenon in ca. 60% der Fälle zur pränatalen In-

1 Einleitung

fektion des Fötus. Bei Frauen mit vor Schwangerschaft erworbener Infektion besteht keine Gefahr der diaplazentaren Übertragung. Am Beginn der Schwangerschaft ist das Übertragungsrisiko geringer als im letzten Drittel, dafür führt eine Infektion im ersten Trimenon zu stärkeren Schäden [Groß *et al.* 2001]. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt und Intensität können sich leichte, unspezifische Krankheits Symptome wie Fieber, Hautausschlag und Purpura zeigen, oder auch die schwerere Trias aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis bei Neugeborenen auftreten [Friedmann *et al.* 1999]. Die Infektion verläuft zu Beginn oft subklinisch und unauffällig, kann jedoch später im Säuglings- und Kleinkindalter Anzeichen von Hirn- und Augenschäden aufweisen [Montoya *et al.* 2004]. 10% der an schwerer Toxoplasmose erkrankten Kinder versterben, die anderen sind meist durch neurologische Spätschäden wie psychomotorische Retardierung, Krampfanfälle, Ophistotonus, Achalasie und eingeschränktes Sehvermögen gekennzeichnet [Groß *et al.* 2001; Speer *et al.* 2004]. Ohne Therapie können sich noch bis ins Erwachsenenalter Spätsymptome manifestieren [Groß, 2004].

1.5.2. Diagnostik und Therapie der kongenitalen Toxoplasmose

Es werden indirekte serologische Bestimmungsverfahren zum Nachweis von Antikörpern angewandt und direkte Nachweisverfahren. In den ersten drei Monaten der Schwangerschaft sollte ein Toxoplasma-IgG- und IgM-Antikörper-Suchtest durchgeführt werden. Wird weder IgG noch IgM nachgewiesen, liegt keine Infektion und keine schützende Immunität vor. Bei Nachweis von IgG gibt es für Feten von immunkompetenten schwangeren Frauen kein Risiko für eine Übertragung von *T. gondii* in der Schwangerschaft. Bei positivem IgM wird durch weitere Verfahren eine aktive von einer inaktiven Infektion mit persistierenden IgM-Antikörpern differenziert. Hierzu zählt die Bestimmung der Avidität von IgG-Antikörpern. Diese unterscheiden zwischen einer erst erworbenen und einer vorangehenden Infektion. Dies ist beim Neugeborenen und in der Schwangerschaft wichtig, da IgM-Antikörper nach anfangs schnellem Anstieg persistieren können und zu falsch positiven Ergebnissen führen können [Liesenfeld *et al.* 1997, Groß *et al.* 1998]. Der Nachweis von IgA-Antikörpern zeigt eine höhere Sensitivität als der Nachweis von IgM, der Nachweis in beiden Testverfahren ist mit einer 75% Sicherheit mit einer kongenitalen Infektion verbunden [Durlach *et al.* 2008]. Die PCR ist bei unsicherer Serologie die direkte Nachweismethode. Zu beachten ist, dass hier ein positiver Befund zwar beweisend für eine Infektion ist, ein negatives Ergebnis diese jedoch nicht ausschließt. Es erfolgt in der Schwangerschaft die Therapie mit Spiramycin, die Therapie wird in der 18- 21 SSW auf Pyrimethamin und Sulfadiazin umgestellt. Für IgG-Antikörper beim Neugeborenen kann auch

1 Einleitung

eine diaplazentare Übertragung verantwortlich sein. Mütterliche IgG verschwinden nach sechs bis zwölf Monaten. Bei Diagnose wird im ersten Lebensjahr mit Pyrimethamin und Sulfadiazin behandelt, es werden begleitende neuroradiologische und augenärztliche Untersuchungen empfohlen. Bei aktiver Retinochoroiditis erfolgt die Behandlung mit Kortikosteroiden [Groß *et al.* 2001; Montoya *et al.* 2004].

1.5.3. Die Immunantwort bei kongenitaler Toxoplasmose

In 24 Seren von 12 Schwangeren mit einer Serokonversion wurde eine erhöhte IFN- γ Sekretion in fetalen Blutproben beobachtet, im Vergleich zu 3 *T. gondii* seronegativen [Raymond *et al.* 1997]. Nigro beschreibt eine geringere Zahl an NK-Zellen in *T. gondii* übertragenden Müttern im Vergleich zu nicht Übertragenden [Nigro *et al.* 1999]. Neugeborene mit kongenitaler Toxoplasmose zeigen höhere Werte an IFN- γ im Vergleich zu Neugeborenen die nach Behandlung einen erneuten Titer Anstieg haben; interessanterweise zeigen letztere eine gesteigerte Th2 Immunantwort als in der normal verlaufenden kongenitalen Toxoplasmose [Kahi *et al.* 1999]. Dieselben Autoren beschreiben aktivierte CD25-T-Zellen aufgrund ihrer erhöhten Präsenz in einer Kohorte von Kindern unter einem Jahr im Vergleich zu Kindern über einem Jahr als Marker der Infektion mit *T. gondii* in Neugeborenen [Fatoohi *et al.* 2003]. Studien mit KO Mäusen zeigen, dass IL-12 die IFN- γ Synthese in NK-Zellen stimuliert und dies entscheidend zur Krankheitskontrolle durch die Synthese von NO beiträgt [Alexander *et al.* 1997]. Die erhöhte Anfälligkeit schwangerer Mäuse und damit verbundene transplazentare Passage von *T. gondii*, ist verbunden mit der Th2 Immunantwort [Thouvenin *et al.* 1997]. Wie bei der kongenitalen Chagas-Infektion kann die pro-inflammatorische Immunantwort im Mausmodell zu verstärkter Pathologie führen. Die IL-12 vermittelte IFN- γ Sekretion steuert den Widerstand gegen *T. gondii*, -exogenes Zufügen von IL-10 vermindert deren Sekretion [Hunter *et al.* 1994]. IL-12 und IL-18 spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Immunopathologie des Dünndarms nach oraler Infektion mit *T. gondii*, aber IL-12 ist hier dominant über IL-18 in der Abwehr der Parasitenreplikation [Vossenkamper *et al.* 2004]. Das gegenregulatorische IL-10 ist nötig für die Vermeidung intestinaler Nekrosen und Mortalität [Suzuki *et al.* 2000]. In Mäusen wird IL-10 in hohen Mengen von ebenfalls IFN- γ produzierenden CD4⁺ Lymphozyten als andere Quelle als T-reg_s produziert. Wie bei der kongenitalen Chagas ist die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischer Immunreaktion von entscheidend in der Pathogenese der Krankheit. Das Immunsystem des Neugeborenen hat hierbei einen Shift zur Th2 Antwort [Jankovic *et al.* 2007].

1 Einleitung

1.6. Ziele

Die kongenitale Chagas-Infektion ist weiterhin ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem in den betroffenen Regionen. Trotz hoher Inzidenz der kongenitalen Infektion, weiß man wenig über die immunologische Interaktion von *T. cruzi* in der kongenitalen Infektion. Kenntnisse darüber würden für mehr Verständnis der Pathogenese beitragen und könnten zu neuen diagnostischen Strategien führen. Zytokinspiegel wurden bisher nicht im Serum Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion bestimmt. Deswegen vergleichen wir die Immunreaktion in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion mit gesunden Neugeborenen und Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose.

Wir definierten folgende Fragestellungen:

- 1: Wie strukturieren sich Anamnese und Klinik bei den uns vorgestellten Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder Toxoplasmose?
- 2: Unterscheidet sich das Zytokinprofil im Serum Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion von dem in Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose oder gesunden Neugeborenen; und unterscheidet sich hierbei das Zytokinprofil im Serum Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion vor und nach der Behandlung? Hierzu erfolgt die Messung von IFN- γ und seinem besonders von Makrophagen und daher in der Immunantwort auf *T. cruzi* determinanten sezernierten Stimulans IL-18, als anti-inflammatorischer Marker erfolgt die Messung von IL-10.
- 3: Sind IL-18, IFN- γ und IL-10 Mengen untereinander korreliert in den Seren von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose?
- 4: Gibt es eine Korrelation zwischen Klinik und Zytokinverhalten von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose?

2 Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1. Patientengut und Erfassung der anamnestischen und klinischen Daten

Das Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des “Hospital Ricardo Gutiérrez“ in Buenos Aires, Argentinien, ist ein Referenzzentrum für kongenitale Infektionen. Das „Hospital Ricardo Gutiérrez“ ist ein Kinderkrankenhaus mit 380 Betten, mit allen kinderärztlichen und kinderchirurgischen Subspezialisierungen. Die Mehrheit der Patienten kommt aus niedrigen sozialökonomischen Verhältnissen aus den Vororten von Buenos Aires. Multimorbidität und Befall mit anderen Parasiten sind hoch.

Alle Patienten wurden bei Erstvorstellung mit Namen und anamnestischen Daten wie Geburtsdatum, Alter, Geburtsort und Geburtsort der Eltern, andere bekannte Infektionen, Zahl der Geschwister, aktuelles Gewicht und Geburtsgewicht erfasst. Hierbei erfolgte die Durchsicht und Datenerhebung aus dem Impfpass, der in Argentinien Informationen über weitere postnatale Erkrankungen und Fehlbildungen, Gewicht bei Geburt, APGAR bei Geburt und Schwangerschaftsdaten umfasst (entsprechend dem deutschen U-Heft). Die Dokumentation erfolgte mittels standardisierter Anamnese Bogen. Ebenfalls erfolgte die Evaluierung der bisherigen Wachstumsperzentilen (Gewicht, Kopfumfang und Länge) zur Feststellung eventueller Wachstumsretardierungen und einer Mikro- oder Makrozephalie.

Eine eingehende Untersuchung nach einem standardisierten Statusbogen wurde durchgeführt. Es erfolgte eine Blutabnahme zur serologischen Weiterverarbeitung (*T. cruzi*/*T. gondii*) und Screening auf *CMV*, *T. pallidum*, und HIV sowie ein Differentialblutbild, CRP, Bilirubin direkt und indirekt, ALAT und γ -GT. Bei allen Patienten mit Verdacht auf kongenitale *T. cruzi* Infektion erfolgte eine konsiliarische Vorstellung in der kinder-kardiologischen Ambulanz des Krankenhauses mit Durchführung eines EKG und Herzechos. Jedes Kind mit Verdacht auf kongenitale *T. cruzi* Übertragung wurde in der radiologischen Abteilung zur Feststellung einer Hepato- oder Splenomegalie mit einer Abdomensonographie untersucht. Bei Kindern mit Verdacht auf kongenitale *T. gondii* erfolgte eine augenärztliche Konsultation mit Spiegelung des Augenhintergrunds, sonografische ZNS Kontrolle oder bei geschlossener Fontanelle eine Computertomographie in Sedierung in der radiologischen Ambulanz des Hospitals. Alle Befunde wurden fachärztlich kontrolliert befundet. Dies wurde in der Krankenakte hinterlegt und in der Patientenverlaufskurve dokumentiert.

2 Material und Methoden

2.1.1. Studiendesign

Insgesamt wurden 57 Patienten, welche im Ambulanzzentrum zwischen 1998 und 2003 behandelt wurden, aus dem Archiv, welches zum Erhebungszeitpunkt 567 kongenitale Chagas und kongenitale Toxoplasmose Fälle führte, nach den unten angeführten Kriterien eingeschlossen. Das Studiendesign wird in Abb. 5 erläutert. Die kongenitale Chagas Gruppe besteht aus 18 Neugeborenen mit nachgewiesener kongenitaler *T. cruzi* Infektion. Zwei Kontrollgruppen werden gebildet: 19 Neugeborene oder Kleinkinder mit nachgewiesener kongenitaler Toxoplasmose und 20 nicht infizierte Neugeborene. In der letzten Gruppe schlossen wir 10 Neugeborene mit *T. cruzi* positiven Müttern in der Schwangerschaft (Kontrolle 1) und 10 nicht-infizierte Kinder mit nicht-infizierten Müttern (Kontrolle 2) ein. Die Titer der pro- inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-18 und des gegenregulatorischen Zytokin IL-10 im Serum Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion, werden zu denen mit kongenitaler Toxoplasmose und den gesunden Kontrollen verglichen. In den Neugeborenen mit kongenitaler Chagas vergleichen wir ebenfalls die Titer vor und nach der Behandlung.

Die Erhebung von Anamnese, Klinik, serologischen Tests der Mütter, Screening auf weitere Erkrankungen (klinisch und mikrobiologisch), Serologie und direkten Erregernachweis der Neugeborenen und Kinder erfolgte aus den Krankenakten retrospektiv und wurde tabellarisch (SPPS) festgehalten.

Die Durchführung der ELISA Tests für IL-18, IFN- γ und IL-10 aus dem Serum erfolgte im Anschluss vor Ort im Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des "Hospital Ricardo Gutiérrez" in Buenos Aires, Argentinien, unter Assistenz von Herrn Miguel Biancardi, Leitender MTA des Labors.

2 Material und Methoden

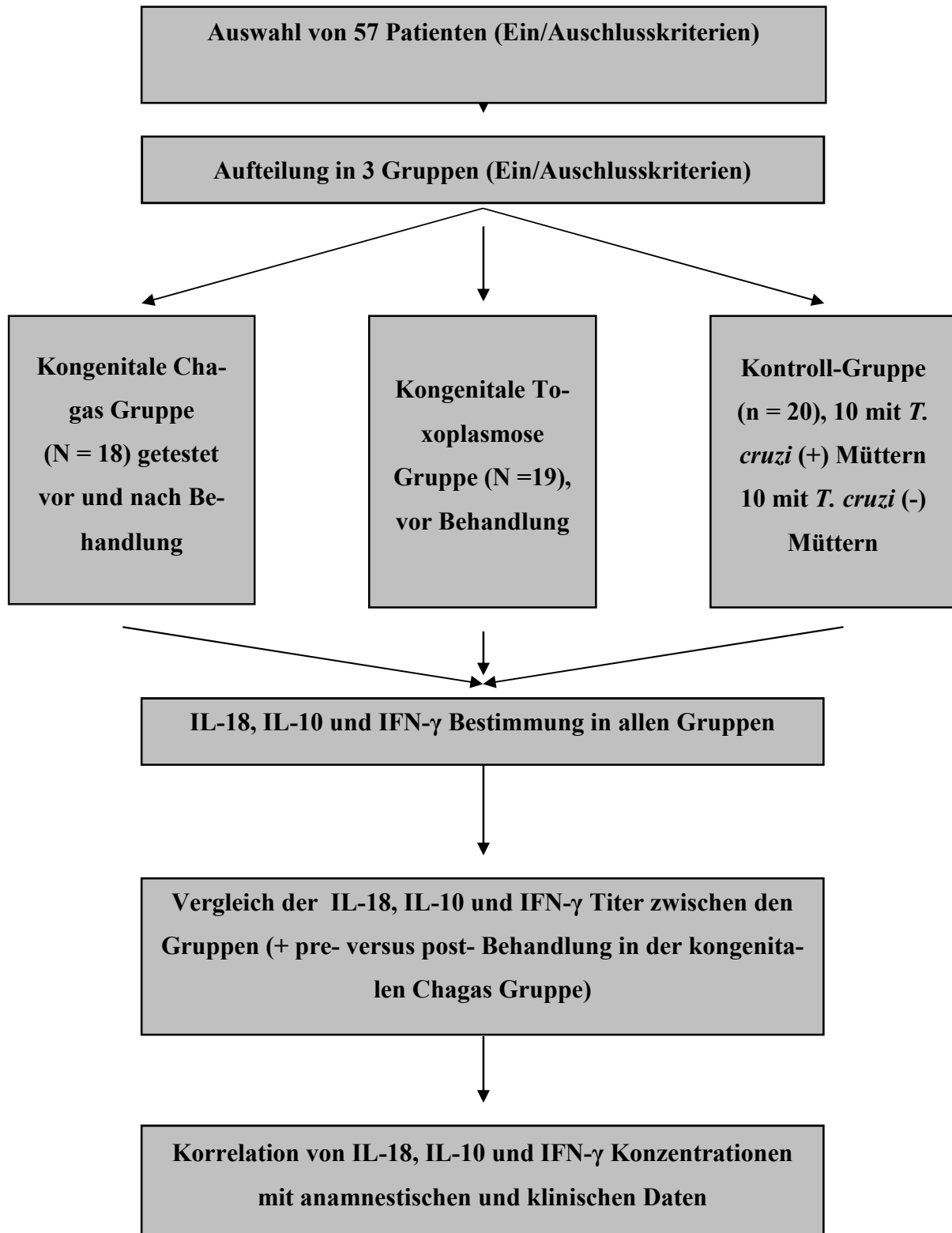


Abbildung 5: Organigramm der Ein- und Ausschlusskriterien und diagnostisches Vorgehen bei Patienten mit kongenitaler Chagas-Infektion oder Toxoplasmose und Kontrollen

2 Material und Methoden

2.1.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

2.1.1.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien der kongenitalen Chagas Gruppe

Die Einschlusskriterien für die kongenitale Chagas Gruppe sind:

- a) Alter \leq 6 Monate,
- b) Mütter mit positiver Serologie (IgG ELISA) auf *T. cruzi* ohne klinische Symptome in der Schwangerschaft (Erhebung aus Mutterpass),
- c) ein positiver Mikrohämatokrit Test und/oder PCR in den ersten 6 Lebensmonaten,
- d) ein ausschließlicher Aufenthalt in der Provinz von Buenos Aires (um die postnatale Exposition zum Vektor auszuschließen) [Gürtler *et al.* 2003], und
- e) ein Follow-up von mindestens sechs Monaten nach Beginn der Behandlung.
- f) Behandlung in den vorangehenden 5 Jahren vor Beginn unserer Erfassung.

Ausschlusskriterien sind:

- a) vorangehende Verabreichung von Blutprodukten,
- b) Vorhandensein von Antikörpern oder Symptomen von *CMV*, *T. pallidum*, und *HIV*, c) klinische Symptome oder Hinweise auf andere Erkrankungen in der Eingangsuntersuchung bei Erstvorstellung, die vom ärztlichen Personal durchgeführt wurde. Die Behandlung der Mutter gegen *T. cruzi* oder eine akute Infektion mit *T. gondii* in der Schwangerschaft führten ebenfalls zum Ausschluss. Die Kinder wurden entsprechend der in Kapitel 2.1. geschilderten Procedere anamnestisch und klinisch untersucht, was wie beschrieben dokumentiert wurde.

2.1.1.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe

Die Einschlusskriterien für die kongenitale Toxoplasmose Gruppe sind:

- a) Alter \leq 1 Jahr,
- b) pathologische IgG und zweimalig IgM Antikörper Titer auf *T. gondii* im mütterlichen Blut in der Schwangerschaft (Erhebung aus Mutterpass) in Verbindung mit IgG, IgM oder IgA Antikörpern im ersten Lebensjahr des Kindes, nach den Kriterien zur Festlegung einer kongenitalen Toxoplasmose Infektion des Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des "Hospital Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires (beschrieben von Altcheh und dem „Consenso argentino de toxoplasmosis congénita“) [Altcheh *et al.* 1997; Durlach *et al.* 2008].
- c) Wohnort in Buenos Aires.
- d) Behandlung in den vorangehenden 5 Jahren vor Beginn der Studie.

2 Material und Methoden

Ausschlusskriterien sind:

- a) Symptome oder Hinweise auf andere infektiöse Erkrankungen in der Eingangsuntersuchung bei Erstvorstellung die vom ärztlichen Personal durchgeführt wurde
- b) Behandlung der mütterlichen Toxoplasmose in der Schwangerschaft, und
- c) Antikörper gegen *T. cruzi*, *T. pallidum*, *CMV*, und *HIV*. Die Kinder wurden entsprechend der in Kapitel 2.1. geschilderten Procedure anamnestisch und klinisch untersucht.

2.1.1.1.3. Ein- und Ausschlusskriterien der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus gesunden Neugeborenen. Diese wurden basierend auf einem negativen Screening für *T. cruzi*, *T. gondii*, *CMV*, *T. pallidum*, und *HIV* eingeschlossen. Die Neugeborenen zeigten keine Symptome oder Hinweise auf eine weitere Erkrankung bei der Geburt. Die Kinder wurden entsprechend der in Kapitel 2.1. geschilderten Procedure anamnestisch und klinisch untersucht. Die Mütter waren seronegativ auf *T. gondii* und *CMV* in der Schwangerschaft. Die Kontrollgruppe wurde weiter in 2 Untergruppen unterteilt: Kontrolle 1 besteht aus gesunden Neugeborenen *T. cruzi* infizierter Mütter, die in der Schwangerschaft negativ auf *T. gondii* getestet wurden. Die Kontrollgruppe 2 besteht aus gesunden Neugeborenen von Müttern, die in der Schwangerschaft sowohl auf *T. cruzi*, als auch auf *T. gondii* negativ getestet wurden.

2.2. Methoden

Das Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des “Hospital Ricardo Gutiérrez” in Buenos Aires, Argentinien benutzt standardisierte Arbeitsverfahren zur Behandlung und Diagnostik in Kindern mit kongenital übertragenen parasitären Infektionen.

2.2.1. Diagnostik der Chagas-Infektion

Sowohl indirekte, als auch direkte Nachweise werden zur Diagnostik der kongenitalen Chagas-Infektion benutzt. Serologische Tests beinhalten den ELISA und die Hämagglutination (indirekt und direkt). Die PCR wird als direkte Methode zum Nachweis des Parasiten im peripheren Blut gebraucht, ebenso der Mikrohämatokrit und die Xenodiagnose.

2 Material und Methoden

2.2.1.1. Indirekte Methoden

2.2.1.1.1. ELISA Test zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen *T. cruzi*

Der ELISA Test wurde unter Gebrauch gelöster *T. cruzi* Antikörper nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Chagatest, Wiener Lab, Rosario, Argentina). Kurzgefasst wurden die Seren 1:100 verdünnt und auf *T. cruzi* Antigen beschichtete Mikrotiter Platten aufgebracht. Ein monoklonaler anti-humaner IgG Antikörper wurde als zweiter Antikörper gebraucht. Hydrogenperoxidtetramethylbenzidin wurde für die Entwicklung eingesetzt, die Reaktion wurde mit H₂SO₄ gestoppt. Der Wechsel in der optischen Densität wird in einem Mikrotiter Platten Ausleser bei 495 nm gemessen (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Shanghai, China). Dabei wurde Präsenz oder Absenz der Antikörper an dem Cut-off Wert gemessen (Cut off \pm 10%). Die Sensitivität wird mit 100% angegeben, die Spezifität mit 94.7% [Oelemann *et al.* 1998].

2.2.1.1.2. Indirekter Hämagglutinationstest zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen *T. cruzi*

Zum Nachweis von IgG Antikörpern wurde der “HAI Chagas test” (Polychaco, Buenos Aires, Argentina) nach den Anweisungen des Herstellers benutzt. Der Test basiert auf der Agglutination der Blutfragmente, die gegen *T. cruzi* IgG in Präsenz humaner Seren sensibilisiert sind [Streitger *et al.* 1995]. Der positive Cut-off ist $> 1:16$. Die Sensitivität des indirekten HAI ist 100%, die Spezifität 96.5% (Angaben des Herstellers).

2.2.1.2. Direkter Nachweis von *T. cruzi*

2.2.1.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von *T. cruzi*

5 ml Vollblut wurden für die PCR benötigt. Die Prozedur erfolgt entsprechend eines beschriebenen Protokolls [Britto *et al.* 1999]. Kurzgefasst wird das Blut in 6M Guanidiniumhydrochlorid/200 mM EDTA Puffer verdünnt und 15 Minuten erhitzt. Die DNA wird aus 100 μ l der Lösung mit Ethanol und Zentrifugation extrahiert. Die Amplifikation erfolgte mit Oligonukleotid Primern zur Erweiterung der hypervariablen Region der kDNA [Solari *et al.* 2001; Duffy *et al.* 2009]. Die PCR Prozedur war auf das 330 bp Fragment des *T. cruzi* kinetoplastids (kDNA) Genom 14A angelegt. Die erste Lösung verwendete 2 μ l 25 mM MgCl₂, 5 μ l 2.5 mM Deoxynucleotid-

2 Material und Methoden

triphosphat (dNTP) (Promega, WI, USA), 1.5 µL 50 µM der Primer 121 [5'-AAATAATGT ACGG G(T/G)GAGATGCATGA-3'] und 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') und 1.2 µL 10× Taq DNA Polymerasebuffer (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA). Die zweite Lösung verwendete 4 µL 25 mM MgCl₂, 3.8 µL 10× Taq DNA Polymerasebuffer, 1.25 Einheiten Taq DNA Polymerase (Gibco-BRL) und 5 µL Parasiten DNA. Die Amplifikation erfolgte in einem MJR PTC-100 Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) wie folgend: 3 Minuten Denaturierung bei 94°C; fünf Zyklen bei 64°C für 40 Sekunden, 72°C für 1 Minute, 94°C für 40 Sekunden; fünf Zyklen bei 63°C für 40 Sekunden, 72°C für 1 Minute und 94°C für 40 Sekunden; 27 Zyklen bei 62°C für 40 Sekunden, 72°C für 1 Minute und 94°C für 40 Sekunden; mit finalen Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Die PCR Produkte werden per Elektrophorese auf 2% Agarosegel analysiert und mit Ethidiumbromid Bedampfung visualisiert [Duffy *et al.* 2009].

Die PCR wurde erfolgreich im Follow-up infizierter Patienten unter anti-parasitärer Behandlung verwandt [Solari *et al.* 2001]. Die Sensitivität schwankt zwischen 96% bis 100% im Vergleich zu serologischen Tests [Avila *et al.* 1993; Altcheh *et al.* 2005; Duffy *et al.* 2009].

2.2.1.2.2. Mikrohämatokrit Test zum Nachweis von *T. cruzi*

Die Standardprozedur zur Diagnostik der kongenitalen Chagas-Infektion in Neugeborenen unter 6 Monaten, ist das kombinierte Testen des maternalen Serums auf Präsenz spezifischer IgG Antikörper und das Testen des Blut des Neugeborenen mit der Mikrohämatokrit Methode [Freilij *et al.* 1995]. Kurzgefasst wird das Patientenblut in einer Kapillare für 10 Minuten bei 8000-10000 rpm zentrifugiert (Rolco SRL 2036, Buenos Aires, Argentina). Die Kapillare wird manuell an der Stelle zwischen Sediment und Serum gebrochen (buffy coat). Diese Fraktion wird unter dem Mikroskop unter 25-facher Vergrößerung betrachtet. Im Falle der akuten Infektion mit hoher Parasitämie wird *T. cruzi* in Form eines um sich drehenden Parasiten gefunden. Die Spezifität ist 100%, die Sensitivität nahezu 90% [Freilij *et al.* 1983].

2.2.1.2.3. Xenodiagnose zum Nachweis von *T. cruzi*

Nicht- infizierte *Triatoma infestans* werden unter einem Kästchen auf der Haut der Patienten platziert, dort lässt man sie 30 Minuten Blut saugen. Der Stuhl der Triatomen wird 30 und 60 Tage später mikroskopisch auf *T. cruzi* untersucht [Pifano, 1954]. Diese Technik hat eine Spezifität von 100 %, eine Sensitivität zwischen 49 und 69% [Pifano, 1954; Avila *et al.* 1993].

2 Material und Methoden

2.2.1.3. Behandlung der kongenitalen Chagas-Infektion

Die Behandlung der kongenitalen *T. cruzi* Infektion erfolgte und erfolgt im Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des “Hospital Ricardo Gutiérrez“ mit Nifurtimox (Lampit®) (10-15 mg/kg/d) oder Benznidazol (Rochagan®) (5-8 mg/ kg/d) für 3 Monate [Freilij et al. 1995]. Nach der Behandlung erfolgte ein monatliches serologisches Follow-up für 3 Monate, um die erfolgreiche Behandlung zu sichern [Suárez et al. 2005; Altcheh et al. 2005].

2.2.2. Diagnostik zum Nachweis von *T. gondii*

2.2.2.1. ELISA Test zum Nachweis von anti-*T. gondii* IgG

Der Vidas Toxo IgG ELISA (BioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Er kombiniert einen zweistufigen Enzym-Immunoassay nach Sandwich Methode mit einem endständigen Fluoreszenz Schritt [Alvarado-Esquivel et al. 2002]. Alle Schritte des Essays werden automatisch vom Instrument durchgeführt. Die Resultate werden in IU/ml ausgewertet unter Hinzunahme des WHO Toxoplasmose IgG Referenzserum. Referenzbereiche sind: negativ $< 1:16$; positiv $\geq 1:16$. Die Sensitivität ist 99.65%, die Spezifität 98% (Angaben des Herstellers).

2.2.2.2. Hämagglutinationstest zum Nachweis von anti-*T. gondii* IgG

Es wurde ein indirekter Hämagglutinationstest (IHA) durchgeführt (Hematoxo, Biolab Diagnostica S.A., São Paulo, Brasil). Die Seren werden hierzu in 2 Schritten von 1:64 zu 1:2,048 nach Angaben des Herstellers verdünnt. Alle positiven Seren im IHA werden dann erneut nach Imprägnation mit 2-Mercaptoethanol getestet, um damit die Präsenz der IgG Antikörper nachzuweisen [Moyer et al. 1987; Kahi et al. 1999]. Die Sensitivität ist 99%, die Spezifität 99.92% (Angaben des Herstellers).

2.2.2.3. ELISA Test zum Nachweis von anti-*T. gondii* IgM

Ein kommerzieller automatischer ELISA Fluoreszenz Test zum Nachweis von IgM Antikörpern wurde durchgeführt (BioMérieux, Marcy-l’Etoile, France). Positive und negative Referenzseren (IgM spezifisch auf *T. gondii*) wurden eingeschlossen. Der Referenzbereich ist: negativ < 0.55 ,

2 Material und Methoden

positiv ≥ 0.65 . Die Sensitivität des Tests ist 93.5%, die Spezifität 99.3% (Angaben des Herstellers) [Alvarado-Esquivel *et al.* 2002].

2.2.2.4. ELISA Test zum Nachweis von anti-*T. gondii* IgA

Ein kommerzieller automatischer ELISA Fluoreszenz Test zum Nachweis von IgA Antikörpern wurde durchgeführt (PLATELIA™ Toxo IgA TMB, 92430 Marnes-la-Coquette, France). Positive und negative Referenzseren (IgA spezifisch auf *T. gondii*) wurden eingeschlossen. Der Referenzbereich ist: negativ < 0.8 , positiv ≥ 1 . Die Sensitivität des Tests ist 92%, die Spezifität 98.5% (Angaben des Herstellers).

2.2.2.5. Behandlung der kongenitalen *T. gondii* Infektion

Die Behandlung der kongenitalen *T. gondii* Infektion erfolgte im Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des „Hospital Ricardo Gutiérrez“ mit Pyrimethamin (1 mg/kg/Tag für 6 Monate) und Sulfadiazin (100 mg/kg/Tag für 6 Monate) [Altcheh *et al.* 1997]. Im Falle einer aktiven Retinochoroiditis erfolgte eine zusätzliche bedarfsgemäße Behandlung mit Kortikosteroiden durch die kinderoftalmologische Abteilung des „Hospital Ricardo Gutiérrez“.

2.2.3. Gewinnung und Aufbewahrung der Seren

Zytokine sind von kurzer Halbwertszeit und anfällig gegenüber exogenen Einflüssen und unsachgemäßer Lagerung [de Jager *et al.* 2009].

Deswegen gab es im Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des „Hospital Ricardo Gutiérrez“ in Buenos Aires, Argentinien, ein standardisiertes Verfahren zur Gewinnung und Aufbewahrung der Proben: Die Blutproben wurde vom ärztlichen Personal mit einer Serum Monovette (Saarstedt®), mit einer heparinisierten Monovetten (Saarstedt®) und einer EDTA Monovette (Saarstedt®) über eine periphere Vene entnommen. Die heparinisierte Monovette diente der Bestimmung der Laborparameter CRP, Bilirubin (direkt und indirekt), ALAT, und die EDTA Monovette des Differentialblutbildes über das Zentrallabor des Hospitals. Die verbliebene Serum Monovette wurde anschließend bei 4 Grad Celsius und 400 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene und in Eppendorf-Küvetten verteilte Serum wurde schockgefroren und bei - 28 Grad Celsius bis zur weiteren Testung aufbewahrt. Im Falle des direkten Nachwei-

2 Material und Methoden

ses von *T. cruzi* per Mikrohematokrit erfolgte vor dem Versand der EDTA Monovette das Abtrennen von Vollblut für die Kapillare.

Die Temperatur der Gefriertruhen wurde an allen Wochentagen morgendlich kontrolliert und protokolliert. Bei den von uns verwendeten Proben traten keine Störungen der Kühlkette auf. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurden Patienten retrospektiv nur 5 Jahre eingeschlossen (Kapitel 2.1.1.1.).

2.2.4. Quantifizierung von IFN- γ , IL-18 und IL- 10 im Serum

2.2.4.1. Quantifizierung von IL- 18 im Serum

Ein kommerzieller quantitativer humaner IL-18-ELISA Kit (MBL, Naka Nagoya, Japan) wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dieser Test benutzt zwei monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des humanen IL-18. Kurzgefasst werden die Seren, die Standardverdünnungen (humanes IL-18, Konzentrationen zwischen 25.6 und 1000 pg/ml) und die Kontrollen auf die mit anti-humanen IL-18 beschichtete Mikrotiter Platte aufgetragen und mit anti- humanen monoklonalen IL-18 Antikörpern beschichtet. Nach dem Waschen wird ein anti- humaner Peroxidase- konjugierter IL-18 Antikörper hinzugefügt. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe des Chromogen Substrats für weitere 60 Minuten. Der Wechsel in der optischen Dichte wird in einem Mikrotiter Platten Leser bei 450 nm gemessen (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Shanghai, China). Die Konzentration des humanen IL-18 wird über eine Dosis- Antwort Kurve basierend auf Standardreferenzen berechnet. Das vom Hersteller angegebene Detektionslimit ist 12.5 pg/ml (Angaben des Herstellers).

2.2.4.2. Quantifizierung von IFN- γ im Serum

Ein kommerzieller quantitativer humaner IFN- γ ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) wird entsprechend der Herstellerangaben verwandt. Kurzgefasst wird ein polyklonaler Antikörper, spezifisch auf humanes IFN- γ auf eine Mikrotiter Platte aufgebracht. Die logarithmische Verdünnung des Standards und die Proben in einer Verdünnung von 50 bis 200 μ l werden hinzugefügt. Nach dem Waschen wird ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper auf humanes IFN- γ hinzugefügt. Nach einem weiteren Waschvorgang wird die Substratlösung hinzugegeben. Der Wechsel in der optischen Densität wird in einem Mikrotiter Platten Leser bei 450 nm gemessen (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Shanghai, China). Die Konzentration des huma-

2 Material und Methoden

nen IFN- γ wird über eine Dosis- Response Kurve basierend auf Standardreferenzen berechnet. Das vom Hersteller angegebene Detektionslimit ist 8 pg/ml (Angaben des Herstellers).

2.2.4.3. Quantifizierung von IL- 10 im Serum

Der humane IL-10 ELISA (Bio Source, Camarillo, USA) benutzt einen monoklonalen Antikörper spezifisch auf humanes IL-10, das auf eine Mikrotiter Platte aufgebracht wurde. Die Proben werden zusammen mit den Standards und Kontrollen inkubiert. Nach dem Waschen werden enzymgebundene polyklonale Antikörper auf humanes IL-10 hinzugefügt. Ein Streptavidin-peroxidase enzymgebundener sekundärer Antikörper wird hinzugefügt. Nach einem weiteren Waschvorgang wird die Substratlösung hinzugegeben. Der Wechsel in der optischen Dichte wird in einem Mikrotiter Platten Leser bei 450 nm gemessen (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Shanghai, China). Die Konzentration des humanen IL-10 wird über eine Dosis- Response Kurve basierend auf Standardreferenzen berechnet. Das vom Hersteller angegebene Detektionslimit ist 1 pg/ml (Angaben des Herstellers).

2.3. Statistisches Vorgehen

Die statistische Analyse wurde mit SPSS durchgeführt (Version 13 und 14). Die Patientendaten werden hierzu den Vorgaben von SPSS kodiert. Für die Beschreibung der Verteilung und quantitativer Werte werden folgende Tests durchgeführt:

1. der arrhythmische Mittelwert und Median,
2. die Standardabweichung und Quartilen zur Charakterisierung der Verteilung,
3. 95% Konfidenzintervall für Mittelwerte,
4. für die graphische Beschreibung benutzten wir Histogramme zur Beschreibung der Verteilung in den Gruppen; Box Plots zur Darstellung von Median, Quartile, Minimum und Maximum mit der Interpretation als Error Bar, welche die 5% Konfidenzintervall des Mittelwertes ausdrücken [Benjamini, 1988; Sachs, 2004].

Qualitative Beschreibungen werden in Tabellen wiedergegeben. In der Beschreibung von Gruppen mit verschiedenen N werden relative Quantitäten und Prozentwerte benutzt.

Qualitative Variablen werden mit Kreuztabellen und χ^2 -Test verglichen. H_0 beschreibt dieselbe Verteilung in den Gruppen. Ist der kalkulierte χ^2 Wert zu hoch und in dieser Konsequenz der p-Wert zu klein, muss die Hypothese abgelehnt werden, es gibt dann keine signifikanten Unterschiede. Ein p-Wert ≤ 0.05 wird als signifikant angesehen [Sachs, 2004].

2 Material und Methoden

Mittelwerte werden mit dem Student T-Test verglichen. Im Falle der Inhomogenität der Varianzen werden die Mittelwerte mit dem T-Test von Welch verglichen.

Im Vergleich von pre-/post Medikation benutzten wir den Paar T-Test für kombinierte Proben. Ein p-Wert ≤ 0.05 wird als signifikant angesehen.

Im Vergleich der Zytokinwerte testen wir mit dem Spearmans Rho Test [Billeter, 1972]. Ein p-Wert ≤ 0.05 wird als signifikant angesehen, ein Scatterplot mit Sq- Wert zur graphischen Illustration wird durchgeführt, eine linear verlaufende ausgeglichene Linie beschreibt eine hohe Korrelation (Höchste Korrelation = 0.5) [Sachs, 2004].

In allen anderen Fällen wird der nicht- parametrische Mann-Whitney U und Wilcoxon-Test genutzt. Ein p-Wert ≤ 0.05 wird als signifikant angesehen. Es erfolgte die Berechnung unter Beratung eines Statistikers.

2.4. Ethische Aspekte

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission CEI am 02.09.2003 (Comité de ética en investigación) – (auf Basis des Gesetz N° 24.724, del 27 de noviembre de 1996, Argentina) des “Hospital Ricardo Gutiérrez“ als Lehrkrankenhaus der „Universidad Nacional de Buenos Aires“, auf Basis des Antrag vom 27.08.2003, eingereicht vom Leiter der Ambulanz Prof. Dr. J. Freilij, genehmigt.

Bei Aufnahme in die Ambulanz wurde von allen sich mit ihren Kindern vorstellenden Eltern die schriftliche Erlaubnis eingeholt, die erhobenen Daten zu weiteren Studienzwecken zu verwenden. Dies umfasste auch die weitere wissenschaftliche Verwendung der gewonnen Proben. Auf die Möglichkeit diese Einwilligung zu widerrufen wurde hingewiesen. Alle Untersuchungen und Befragungen wurden unter Achtung der Intimsphäre der Kinder und Wahrung der Schweigepflicht durchgeführt. Erhobene Daten wurden vertraulich behandelt und zum Zeitpunkt der statistischen Erfassung (Initialen, Geburtsdatum) unter Vergabe einer Randomnummer anonymisiert (siehe Tabelle 5).

3 Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Patienten

Insgesamt werden 57 Patienten aus dem Patientengut des Archivs der Klinik und des Labors für Kongenitale und Parasitäre Erkrankungen im Kinderkrankenhaus “Hospital Ricardo Gutiérrez”, Buenos Aires, Argentinien nach den in Kapitel 2.1.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien retrospektiv eingeschlossen. Alle Patienten wurden in den 5 Jahren vor Beginn unserer Studie dort behandelt, die Dokumentation wie in Kapitel 2.1. aufgeführt zeigte sich komplett. Die kongenitale Chagas Gruppe besteht aus 18 Neugeborenen mit nachgewiesener kongenitaler Chagas Infektion. Die kongenitale Toxoplasmose Gruppe besteht aus 19 Neugeborenen mit nachgewiesener kongenitaler Toxoplasmose. Die Kontrollgruppe besteht aus 20 gesunden nicht infizierten Neugeborenen, 10 davon mit Chagas positiven Müttern während der Schwangerschaft (Kontrolle 1), und 10 von nicht-infizierten Müttern (Kontrolle 2).

Tabelle 2: Das Alter, Gestationsalter, Alter, Geburtsgewicht, Gewicht und Alter der Mutter der Neugeborenen (Chagas, Toxoplasmose und Kontrolle)

		Alter in Tagen	Alter in Monaten	Gesta- tionsalter+	Geburts- gewicht#	Gewicht ##	Alter der Mutter *
Kongenitale Chagas (N=18)	MW	56.8 (±29.3)	2.9 (±2.1)	37.6 (±1.8)	3000 (±769.1)	5231 (±2118)	29.83 (±9.6)
	Median	60	2.5	37	3010	4975	32.5
Kongenitale Toxoplasmo- se (N=19)	MW	177.4 (±108.7)	6.5 (±3.5)	38.41 (±2.5)	2968.23 (±550.8)	6858 (±2041)	26.2 (±4.5)
	Median	165	7	39	2930	6800	25.5
Kontrolle (N=20)	MW	41.9 (±63.3)	2.9 (±3.5)	37.8 (±3.5)	3270 (±593.3)	6544 (±1817)	28.1 (±4.3)
	Median	19	2	38	3375	6700	28

#Geburtsgewicht in g; *Alter der Mutter bei Geburt; +Gestationsalter in SSW; #in g; ##Gewicht bei Erstvorstellung in g; ±: Standardabweichung; MW: Mittelwert

3 Ergebnisse

Tabelle 2 vergleicht Alter (in Tagen und Monaten), Gestationsalter, Geburtsgewicht und das Alter der Mutter zur Zeit der Geburt der Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose und der Kontrollgruppe. Neugeborene mit kongenitaler Chagas-Infektion und die Kontrollgruppe zeigen keinen signifikanten Altersunterschied. Das mittlere Alter der kongenitalen Toxoplasmose (Gruppe 2) ist signifikant höher im Vergleich zu den anderen Gruppen (Chagas vs. Toxoplasmose: $p=0.003$, Toxoplasmose vs. Kontrolle: $p=0.003$, Mann Whitney U Test). Das mittlere Gewicht zur Beginn der Behandlung war: Chagas: 5230.7 g (Median: 4975 g; ± 2188.2), Toxoplasmose: 6858.4 g (Median: 6800 g; ± 2040.9) und Kontrolle: 6544.3 g (Median: 6700 g; ± 1817.1). Es gab keine signifikanten Unterschiede beim Geburtsgewicht. Genauso gab es keine Unterschiede in der Verteilung des Geschlechts. Diese war (männlich/weiblich): Kongenitale Chagas: 10/8 (55.6%/44.4%), Kongenitale Toxoplasmose: 8/11 (42.1%/57.9%), Kontrollen: 10/10 (50%/50%). Wir dokumentierten die Klinik per APGAR Index bei Geburt, Größe und Kopfumfang; dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.1. Klinik, serologische Diagnostik und direkter Nachweis von *T. cruzi* in der kongenitalen Chagas Gruppe

Alle Mütter kommen aus endemischen Regionen wie Bolivien und die argentinischen Provinzen Catamarca, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Santa Fé, Mendoza, Salta und Misiones. Während der Schwangerschaft wurde keine dieser Mütter gegen *T. cruzi* behandelt. Es wurden spezifische Antikörper nachgewiesen, keine hatte aber Symptome der Erkrankung. Alle hatten IgG Antikörper gegen *T. cruzi* nach Testung mit ELISA und HA. 15 von 18 kongenitalen Chagas Patienten hatten vorangehend zur ersten Medikation einen positiven Mikrohämatokrit. In 5 dieser Fälle wurde *T. cruzi* ebenso per PCR nachgewiesen, in 3 Fällen wurde *T. cruzi* mit PCR ohne Mikrohämatokrit nachgewiesen. Der Nachweis per Xenodiagnose erfolgte zusätzlich in 2 Fällen (extern). Co-Infektion mit *T. gondii* wurde in allen Fällen durch das negative mütterliches und kindliches Screening (IgG ELISA) gewährleistet. Kongenitale Lues wurde durch mütterliches Screening ausgeschlossen. Nur 2 Neugeborene wurden außerhalb Buenos Aires geboren, "Corrientes" und "Neuquen" sind aber keine endemischen Regionen, so dass in diesen Fällen die vektorielle Infektion ebenfalls ausgeschlossen ist. Von 18 Patienten waren 9 asymptomatisch und 9 symptomatisch (Tabelle 3). Nach Diagnostik und Beginn der Behandlung wurden die IgG Werte der Patienten 6 bis 7-mal in monatlichen Abständen gemessen (Abb. 6 und 7).

3 Ergebnisse

Tabelle 3: Klinische Symptome von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas (N=18)

	Frequenz	%
Asymptomatisch	9	50
Kardiomyopathie	2	11.1
Hepatosplenomegalie	5	27.8
Kardiomyopathie + Hepatosplenomegalie	2	11.1

Der mittlere IgG Antikörper Titer gegen *T. cruzi* in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, gemessen mit ELISA und HA Tests einmal im Monat, ist innerhalb der Behandlung von 60 Tagen stark rückläufig und am Ende in beiden Tests bei allen Patienten nicht mehr nachweisbar (Abb. 6 und 7).

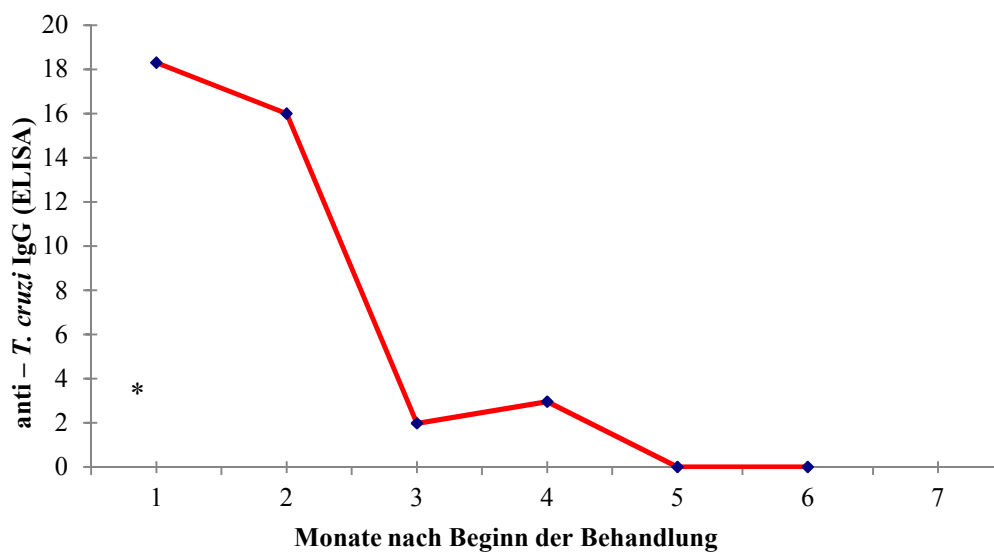


Abbildung 6: Anti - *T. cruzi* IgG Konzentrationen (Mittlere pg/ml) getestet mit ELISA während der Behandlung bei Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion.

***: Beginn der Behandlung. N = 18.**

3 Ergebnisse

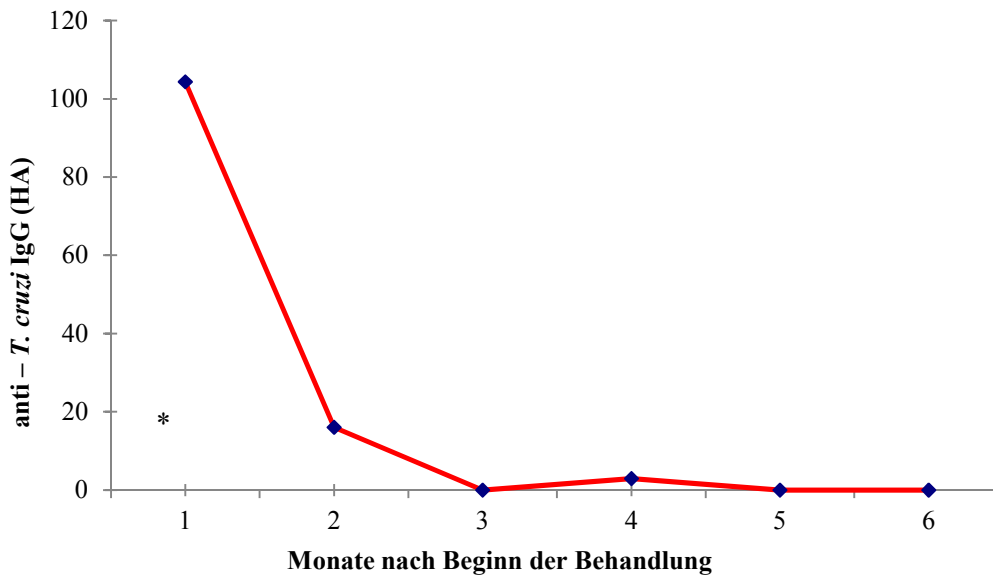


Abbildung 7: Anti – *T. cruzi* IgG Konzentrationen (Mittlere pg/ml) getestet mit HA während der Behandlung bei Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion.

***: Beginn der Behandlung. N = 18.**

3.1.2. Klinik und serologische Diagnostik in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe

11 weibliche und 8 männliche Patienten bis 12 Monate werden eingeschlossen. 50% haben Symptome der kongenitalen Toxoplasmose (Tabelle 4). 6 Patienten waren nach der Geburt mikrozephalisch. Mehrere Patienten zeigen pathologische Symptome im rechten (n= 8) oder linken Auge (n= 9). 8 von 17 Patienten zeigen pathologische Veränderungen in der Computertomographie, in 6 Fällen Kalzifikationen, in 2 Fällen Veränderungen des Ventrikelsystems (Tabelle 4). IgM Antikörper wurden in 13 Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose nachgewiesen und sind nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar. Bei den 5 Neugeborenen in denen der IgM Nachweis nicht gelang (2 Patienten) oder durchgeführt wurde (3 Patienten) wurde der Nachweis von spezifischen IgA zur Sicherung der kongenitalen *T. gondii* Infektion angeführt.

In 10 von 15 Fällen ist der IgA Test vor der Behandlung positiv. Bei 4 Patienten zeigten sich IgG, IgM und IgA in der Erstuntersuchung positiv. So war nach den lokalen Richtlinien (beschrieben von Altcheh und Durlach) bei den 19 einbezogenen Patienten die kongenitale *T. gondii* Übertragung gesichert [Moscatelli *et al.* 2006].

3 Ergebnisse

Tabelle 4: Klinik und radiologische Veränderungen bei Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose (n=19)

	Frequenz	%
Asymptomatisch	9	47.4
Ikterus	1	5.3
Neurologische Symptome	5	26.4
Konvulsionen	1	5.3
Anomalitäten des Ventrikelsystems	2	10.5
Ikterus und Anämie	1	5.3

IgG Antikörper konnten in allen Patienten nachgewiesen werden. Der mittlere IgG Antikörper Titer bei Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose ist 452.71 pg/ml (ELISA), und 20563.76 pg/ml (HA). Abb. 8 und 9 zeigen die Antikörperkonzentrationen in einer Zeit von 6 Monaten.

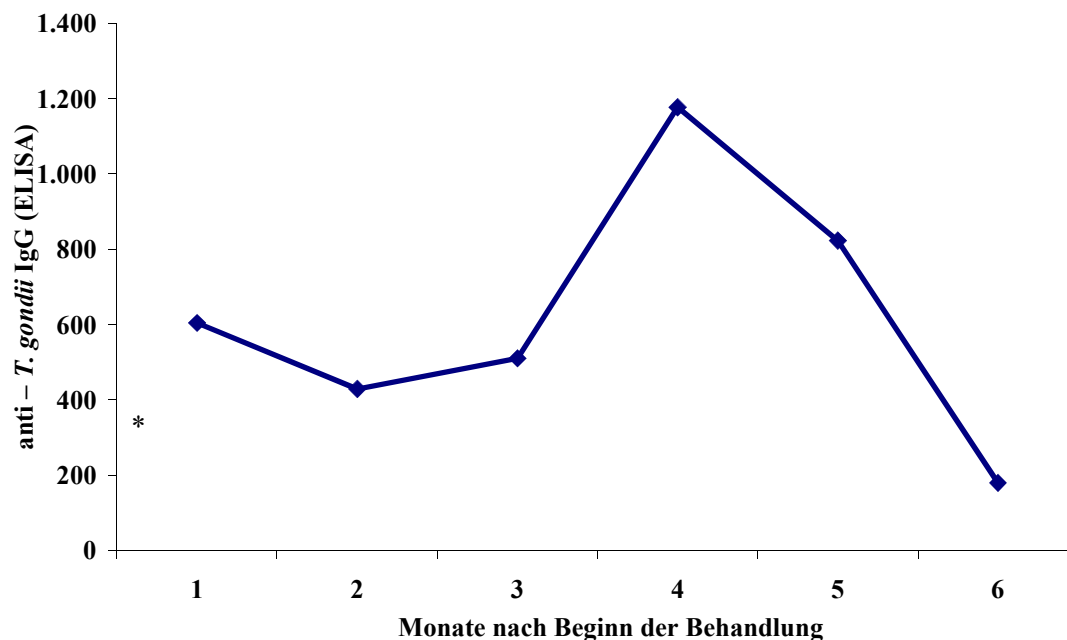


Abbildung 8: IgG Konzentrationen (Mittlere pg/ml) getestet mit ELISA während der Behandlung in Neugeborenen mit Kongenitaler Toxoplasmose *: Beginn der Behandlung, N=19.

3 Ergebnisse

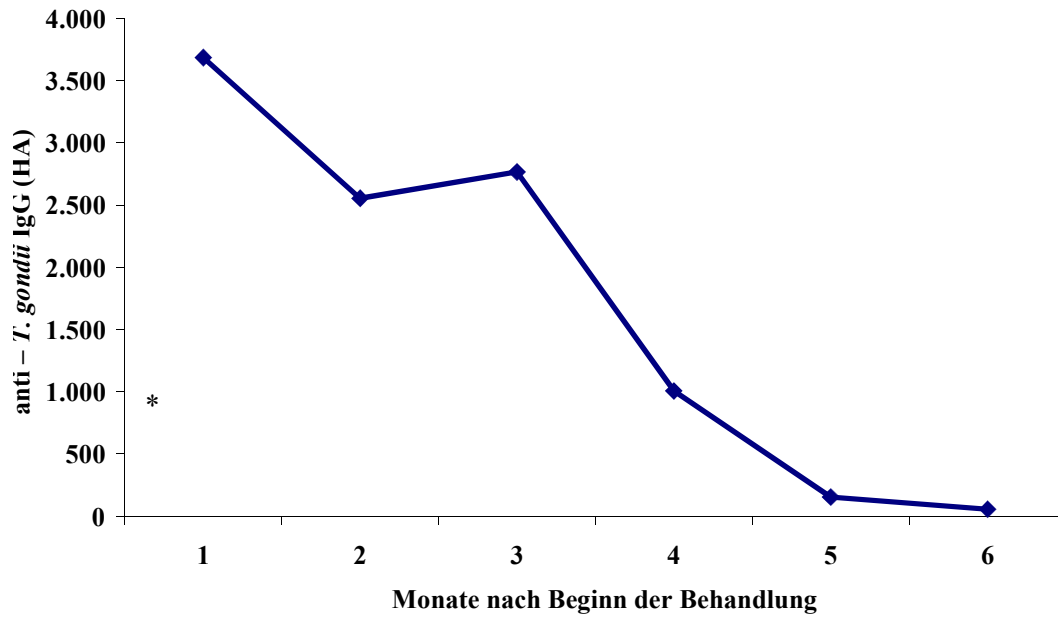


Abbildung 9: IgG Konzentrationen (Mittlere pg/ml) getestet mit HA während der Behandlung in Neugeborenen mit Kongenitaler Toxoplasmose *: Beginn der Behandlung, N=19.

3.1.3. Kontrollgruppe

Neugeborenen in der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht signifikant in Alter, Geburtsgewicht und Gestationsalter von der kongenitalen Chagas Gruppe. Keiner hat Hinweise einer anderen Infektion, sie waren negativ getestet auf CMV, *T. cruzi*, *T. gondii* und *T. pallidum*. Alle Mütter waren negativ im serologischen Screening auf *T. gondii* und CMV in der Schwangerschaft. Zehn Mütter waren seropositiv auf *T. cruzi* ohne Symptome einer Chagas-Infektion oder anderen Erkrankungen, zehn waren negativ.

3 Ergebnisse

3.2. Konzentrationen von IL-18, IL-10 und IFN- γ im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose, kongenitaler Chagas-Infektion und Kontrollgruppe

Tabelle 5 zeigt die individuellen Resultate von IL-18, IFN- γ und IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Resultate von IL-18, IFN- γ und IL-10 Konzentrationen (Nr. 11 – 28 = kongenitale Chagas; 49 – 60 = kongenitale Toxoplasmose; 71 – 90 Kontrolle)

Random Nr.	IL-18 pre-med (pg/ml)	IFN- γ pre-med (pg/ml)	IL-10 pre-med (pg/ml)	IL-18 post-med (pg/ml)	IFN- γ post-med (pg/ml)	IL-10 post-med (pg/ml)
11	73.93	0	0.57	11.23	0	
12	50.69	0	1	99.56	0	0
13	198.55	10.52	1.53	26.05	0	1.19
14	33.53	0	0.18	35.74	.	
15	264.78	21.58	0.61	.	.	
16	24.74	0	0.07	17.31	0	1.2
17	85.26	0	0.48	65.64	18.68	0
18	8.21	4.74	0.31	35.74	4.74	0
19	131.32	9.47	0.17	31.32	0	0.34
20	59.75	13.03	0.85	335.13	0	1.39
21	22.11	3.31	1	.	.	
22	76.38	0	0.07	53.71	0	0
23	1.1	0		10.37	0	0.34
24	176.26	7.1	0.34	75.15	0	0.99
25	45.86	0	1.09	47.18	0	0.23
26	66.48	0	0.94	11.23	0	0.39
27	11.23	0	0.49	38.39	0	0.25
46	233.87	9	0.1			
47	114.95	3.79	0			
48	73.11	0	0.46			

3 Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 5:

Random Nr.	IL-18 pre-med (pg/ml)	IFN-γ pre- med (pg/ml)	IL-10 pre- med (pg/ml)
52	119.71	13.03	2.22
53	79.23	15.54	1.13
54	55.44	25.08	1.34
55	89.26	14.29	0.16
56	89.26	4.74	0.21
57	231.36	10.52	0
58	114.16	7.1	0.19
45	34.86	0	0.35
44	77.60	0	0
59	80.45	9	0
60	56.30	0	0.35
71	61.44	13.66	0
72	68.57	0	0
73	73.52	18.05	0
74	122.1	40.94	0
75	120.5	2.37	
76	32.65	40.94	0.75
77	69.83	54.84	0.25
78	1000	17.43	0.61
79	120.5	8.53	
80	197.49	13.03	0.05
81	370.04	10.52	0.02
83	135.42		
84	152.57	8.53	0.61
85	214.63	10.52	0.31
86	72.3	12.41	0.63
87	99.95		0
88	146.63		0.68
89	376.59		0
90	83.66		0.54

3 Ergebnisse

3.2.1. Konzentrationen von IL-18

Die mittlere Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 in der Kontrollgruppe ist 182.69 ± 80.35 pg/ml und signifikant ($p=0,005$) höher im Vergleich zur kongenitalen Chagas Gruppe (74.79 ± 73.19 pg/ml) vor Medikation. Die mittleren IL-18 Konzentrationen in der kongenitalen Chagas Gruppe sind signifikant ($p=0.025$) niedriger (74.79 ± 73.19 pg/ml) vor Medikation im Vergleich zur kongenitalen Toxoplasmose Gruppe (116.75 ± 73.65 pg/ml). Die IL-18 Konzentrationen in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe (116.75 ± 73.65 pg/ml) sind im Trend geringer zur Kontrolle (182.69 ± 213.21 pg/ml) (Abb. 10).

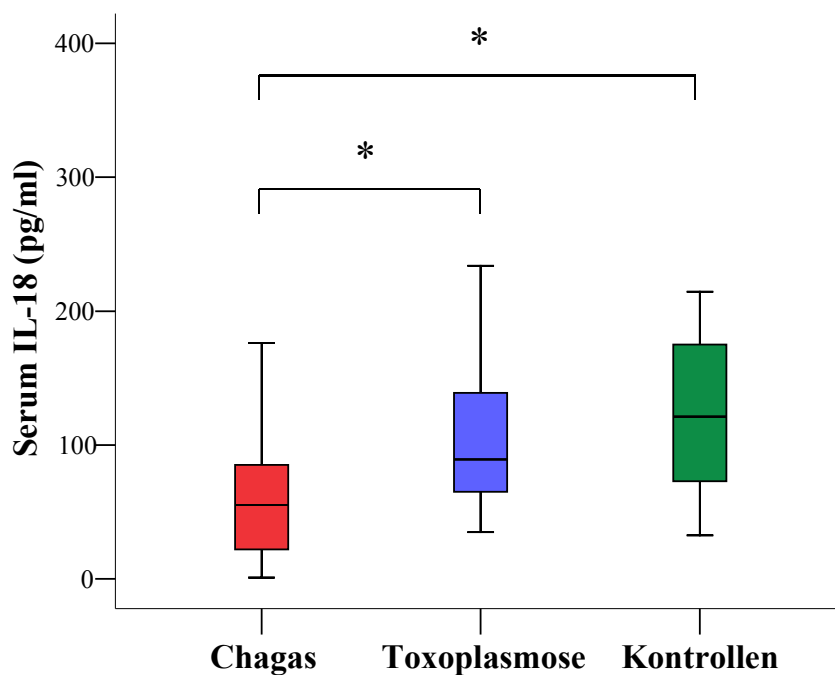


Abbildung 10: Serumkonzentrationen von IL-18 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen. $*p \leq 0.05$; Mann-Whitney U Test für 2 unabhängige Proben

3.2.2. Konzentrationen von IFN- γ

Die mittlere Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ ist 3.875 ± 6.18 pg/ml und somit signifikant ($p=0.044$) niedriger in der kongenitalen Chagas Gruppe vor Medikation im Vergleich zur kongenitalen Toxoplasmose Gruppe (9.24 ± 12.23 pg/ml). Die mittlere IFN- γ Konzentration ist 3.875 ± 6.18 pg/ml und signifikant niedriger ($p=0.001$) in der kongenitalen Chagas Gruppe vor Medikation verglichen zur Kontrollgruppe (19.11 pg/ml, ± 16.06), und ist

3 Ergebnisse

ebenfalls signifikant niedriger ($p=0.027$) in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe (9.24 pg/ml , ± 12.23) verglichen zu den Kontrollen (Abb. 11).

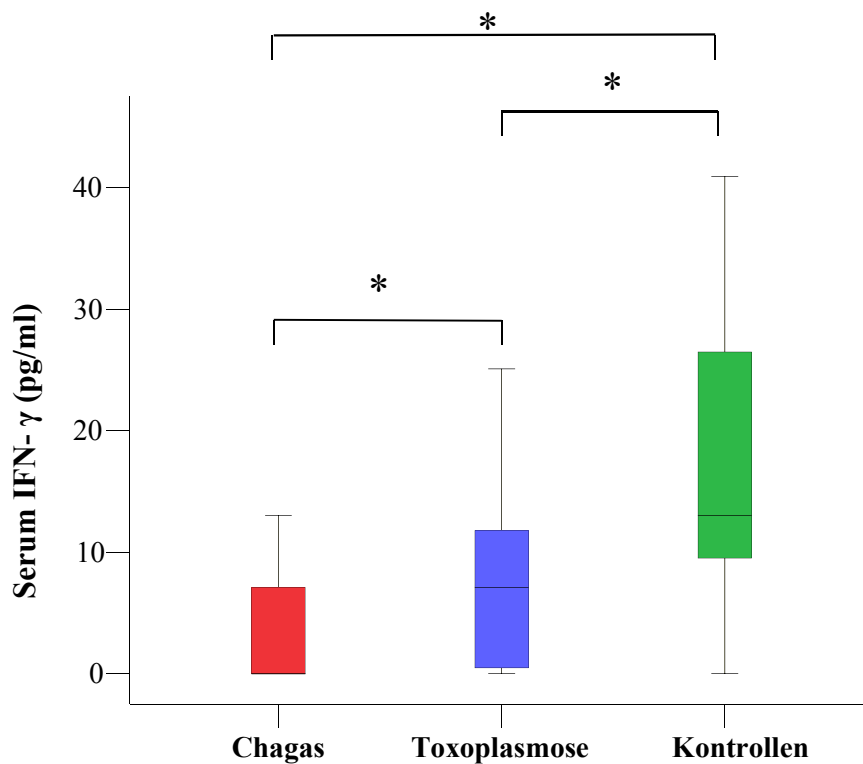


Abbildung 11: Serumkonzentrationen von IFN- γ in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen. * $p \leq 0.05$; Mann-Whitney U Test für 2 unabhängige Proben

3.2.3. Konzentrationen von IL-10

Die mittlere Konzentration des gegenregulatorischen Zytokins IL-10 ist $0.60 \pm 0.41 \text{ pg/ml}$ in der kongenitalen Chagas Gruppe vor Medikation und signifikant höher ($p=0.012$) im Vergleich zu den Kontrollen ($0.26 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$) und erreicht höhere Werte im Vergleich zur kongenitalen Toxoplasmose ohne Signifikanz (0.52 ± 0.63) (Abb. 12).

3 Ergebnisse

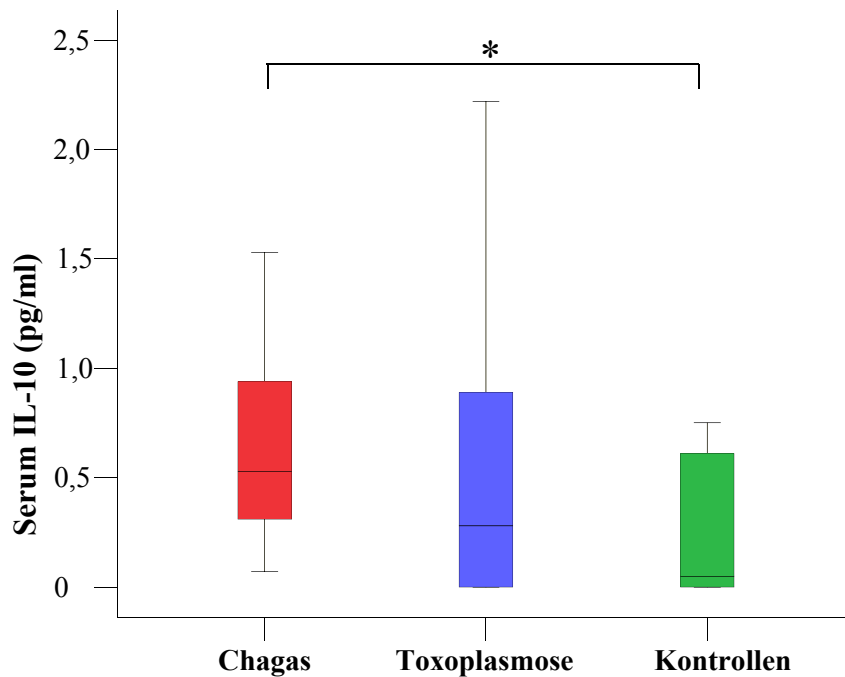


Abbildung 12: Serumkonzentrationen von IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen. * $p \leq 0.05$; Mann-Whitney U Test für 2 unabhängige Proben

3.3. Serumkonzentrationen von IL-18, IFN- γ und IL-10 vor- vs. nach Behandlung in der kongenitalen Chagas Gruppe

Wir maßen die Zytokinkonzentrationen im Serum in der kongenitalen Chagas Gruppe vor und nach Behandlung von drei Monaten.

IL-18: IL-18 Konzentrationen sind vor Behandlung erhöht (Mittelwert: 74.79 pg/ml, \pm 73.19) im Vergleich zu den Konzentrationen nach der Behandlung (Mittelwert: 59.58 pg/ml, \pm 80.35), Zwei-Stichproben-t-Test: n.s.

IFN- γ : IFN- γ Konzentrationen sind vor Behandlung erhöht (Mittelwert: 3.87 pg/ml, \pm 6.18) im Vergleich zu den Konzentrationen nach der Behandlung (Mittelwert: 1.67 pg/ml, \pm 5.06), Zwei-Stichproben-t-Test: n.s.

IL-10: IL-10 Konzentrationen sind vor Behandlung erhöht (Mittelwert: 0.6 pg/ml, \pm 0.41) im Vergleich zu den Konzentrationen nach der Behandlung (Mittelwert: 0.49 pg/ml, \pm 0.51), Zwei-Stichproben-t-Test: n.s.

3 Ergebnisse

3.4. Korrelation zwischen IL-18, IFN- γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose oder kongenitaler Chagas-Infektion

3.4.1. Korrelation zwischen IL-18, IFN- γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion

Der Scatterplot IL-18 vs. IFN- γ für die kongenitale Chagas Gruppe beschreibt eine ausbalancierte Tendenzlinie mit einem linearen R Sq von 0.603 (Abb. 13). Der Scatterplot IL-10 vs. IFN- γ beschreibt dagegen eine geneigte Tendenzlinie nach IL-10 mit einem linearen R Sq von 0.03 (Abb. 14).

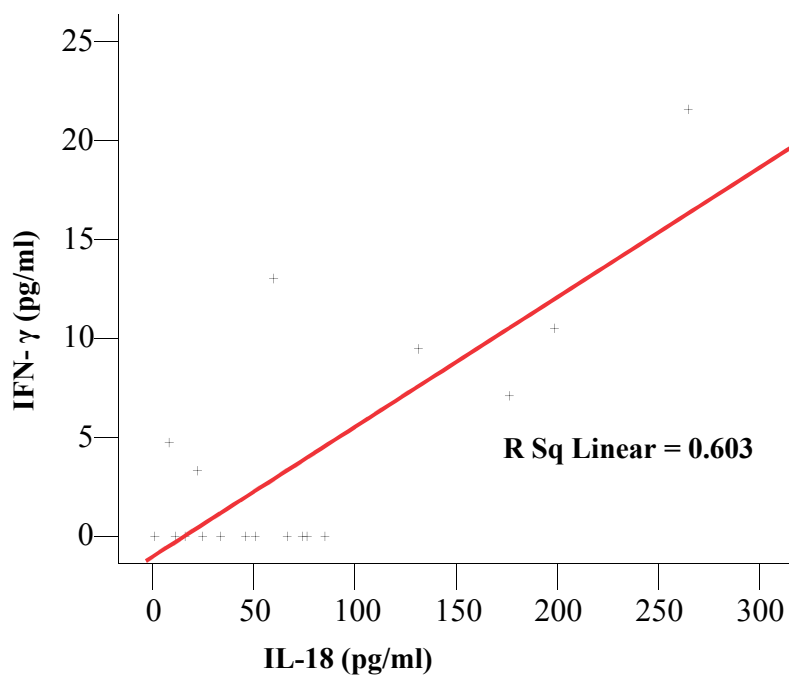


Abbildung 13: Korrelation (Scatterplot) von IL-18 versus IFN- γ für die kongenitale Chagas Gruppe, Spearmans Rho Korrelationskoeffizient: 0.48; p=0.044

3 Ergebnisse

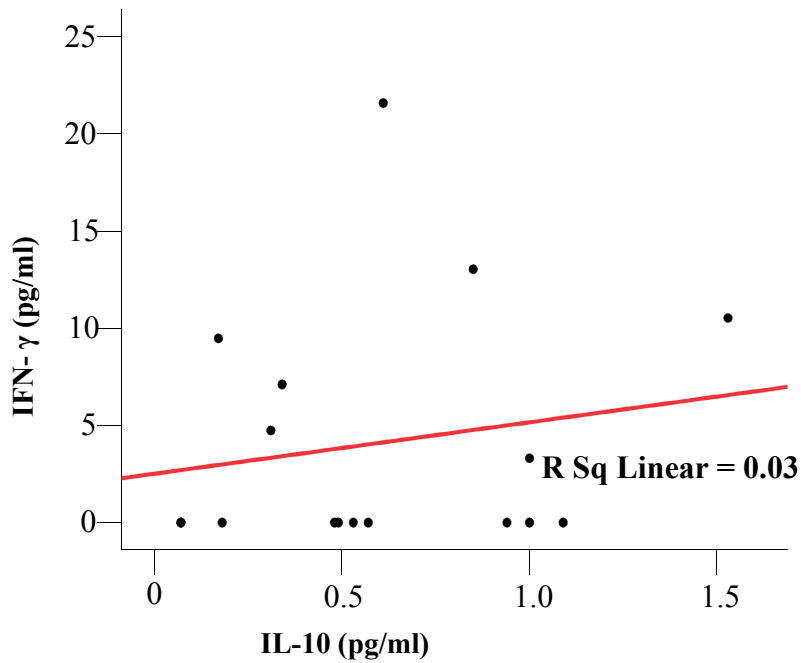


Abbildung 14: Korrelation (Scatterplot) von IFN- γ versus IL-10 für die kongenitale Chagas Gruppe, Spearmans Rho Korrelationskoeffizient: 0.17

3.4.2. Korrelation zwischen IL-18, IFN- γ und IL-10 im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose

Der Scatterplot IL-18 vs. IFN- γ für die kongenitale Toxoplasmose Gruppe beschreibt eine nach IL-18 geneigte Tendenzlinie mit einem linearen R Sq von 0.062 (Abb. 15). Der Scatterplot IL-10 vs. IFN- γ beschreibt eine ausgeglichene Tendenzlinie mit linearen R Sq von 0.29 (Abb. 16).

3 Ergebnisse

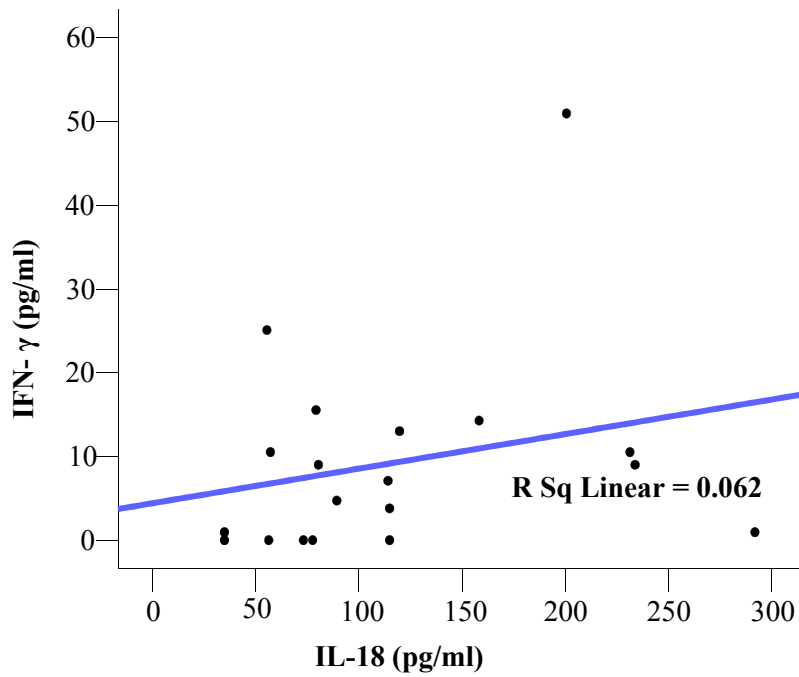


Abbildung 15: Korrelation (Scatterplot) von IL-18 vs. IFN- γ für die kongenitale Toxoplasmose Gruppe, Spearmans Rho Korrelationskoeffizient: 0.31

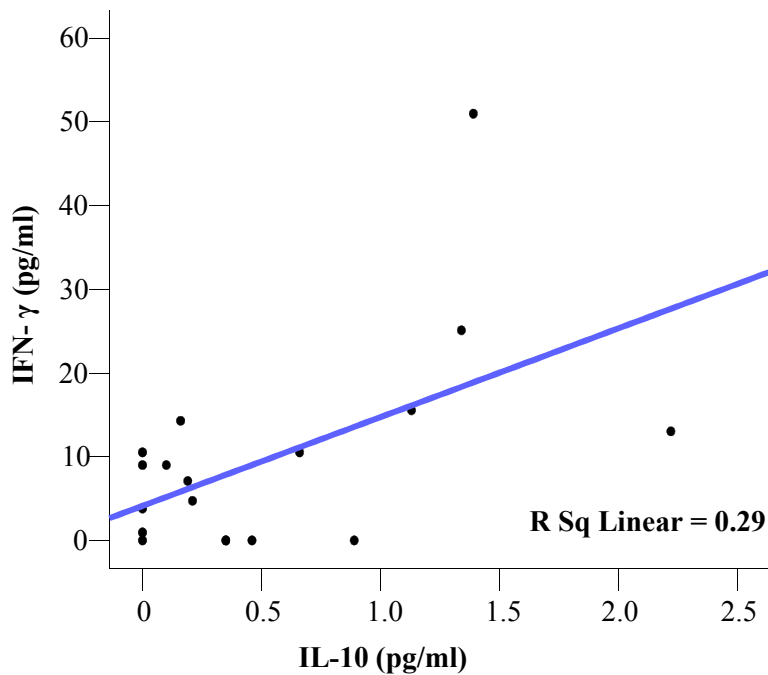


Abbildung 16: Korrelation (Scatterplot) von IFN- γ vs. IL-10 für die kongenitale Toxoplasmose Gruppe, Spearmans Rho Korrelationskoeffizient: 0.53; $p=0.021$

3 Ergebnisse

3.5. Korrelation der Zytokinkonzentrationen mit der Klinik

Die kongenitale Chagas Gruppe und Toxoplasmose Gruppe wurden in Patienten mit und ohne klinische Symptome der Erkrankung unterteilt. Hierbei zeigt sich nur eine Signifikanz bei Vergleich der symptomatischen zu den nicht-symptomatischen Toxoplasmose Patienten.

Tabelle 6: Konzentrationen von IL-18, IFN- γ und IL-10 in symptomatischen/ asymptomatischen Patienten

		IL-18	IFN- γ	IL-10
Chagas	Symptomatisch (N=8)	80.28 \pm 42.24	6.22 \pm 4.03	0.52 \pm 0.32
	Asymptomatisch (N=10)	70.4 \pm 56.77	2 \pm 4.22	0.66 \pm 0.47
	P-Wert	n.s.	n.s.	n.s.
Toxoplasmose	Symptomatisch (N=15)	134.25 \pm 72.98	10.93 \pm 13.12	0.56 \pm 0.67
	Asymptomatisch (N=4)	51.12 \pm 20.54	2.87 \pm 5.12	0.34 \pm 0.33
	P-Wert	0.041*	n.s.	n.s.

Alle Werte in pg/ml; \pm : Standardabweichung; * Die Korrelation ist signifikant bei 0.05; n.s.: nicht signifikant, Mann-Whitney U Test für 2 unabhängige Proben

3.6. Zytokinkonzentrationen in Seren von gesunden Neugeborenen von Chagas positiven Müttern im Vergleich zu Neugeborenen von nicht-infizierten Müttern

Die Kontrollgruppe wurde unterteilt in Neugeborene von *T. cruzi* positiven Müttern ohne Symptome (Kontrolle 1) und von nicht-infizierten Müttern (Kontrolle 2).

Für IL-18 zeigt Kontrolle 1 erhöhte Werte (186.66 \pm 91.55 pg/ml) im Vergleich zu Kontrolle 2 (178.72 \pm 34.81 pg/ml), Mann-Whitney U Test: p: n.s. Für IFN- γ zeigt Kontrolle 1 erhöhte Werte (20.78 \pm 5.8 pg/ml) im Vergleich zu Kontrolle 2 (15.38 \pm 4.94 pg/ml), Mann-Whitney U test: p: n.s. Für IL-10 zeigt Kontrolle 1 erniedrigte Werte (0.21 \pm 0.11 pg/ml) im Vergleich zu Kontrolle 2 (0.31 \pm 0.10 pg/ml), Mann-Whitney U Test: p: n.s.

Zusammenfassend zeigt sich in den Konzentrationen von IL-18, IFN- γ und IL-10 kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen.

4. Diskussion

Ziel der Studie ist die Bestimmung der pro- und gegenregulatorischen Zytokine im Serum von Neugeborenen mit kongenitaler *T. cruzi* und *T. gondii* Infektion, welche sich in einer nicht-endemischen Region zur Diagnostik und Behandlung vorstellten. Vorangehende Daten betreffend dieses Themas wurden meist über aktivierte Vollblutzellen [Vekemans *et al.* 2000; Hermann *et al.* 2002; Hermann *et al.* 2004] und periphere mononukleäre Blutzellen bestimmt [Samudio *et al.* 1998]. Verschiedene Studien in Neugeborenen Rattenserum identifizieren pro-inflammatorische Zytokine, speziell IFN- γ , als Schlüsselzytokine zur Resistenz gegen *T. cruzi* [Torrice *et al.* 1991; D'Avila *et al.* 1996; Didoli *et al.* 2000].

Diese Studie fokussiert sich dabei auf Seren von kongenital infizierten Neugeborenen in Verbindung mit klinischen Daten der Patienten. Wichtig ist der Zusammenhang der klinischen Daten mit der Konzentration der Zytokine im Serum. Die Evaluierung von Zytokinen in Neugeborenen- oder Kinderseren wird von einigen Autoren als kontrovers angesehen, die Serumprobe sei eventuell zu anfällig, um exakte Resultate zu erhalten, aber in Bezug darauf wurden in den letzten Jahren mehrere Artikel veröffentlicht, die keine Probleme bei der Verwendung dieses Materials berichten [Enwonwu *et al.* 2005; Letesjö *et al.* 2005; Cuna *et al.* 2009].

Der Einschluss der kongenital infizierten Chagas Patienten erfolgte basierend auf Anamnese und Seropositivität (IgG) der Mutter, sowie serologischen Tests wie IgG ELISA und HA. Da die IgG Antikörper gegen *T. cruzi* die Plazenta passieren, ist der IgG Nachweis bei Neugeborenen kein Beweis für eine Infektion, so dass hier direkte Nachweismethoden nötig sind [Reyes *et al.* 1990; Altcheh *et al.* 2005]. Die Diagnose ist gesichert wenn zwei indirekte Nachweise und ein direkter Nachweis positiv sind [Freilij *et al.* 1995]. 15 von 18 kongenitalen Chagas Patienten hatten vorangehend zur ersten Medikation einen positiven Mikrohämatokrit. In 5 dieser Fälle wurde *T. cruzi* ebenso per PCR nachgewiesen, in 3 Fällen wurde *T. cruzi* mit PCR ohne Mikrohämatokrit nachgewiesen, zweimal zusätzlich per Xenodiagnose, somit lagen bei den von uns eingeschlossenen Patienten zwei positive serologische Nachweise und ein direkter Nachweis (Mikrohämatokrit, PCR) vor, was die kongenitale Infektion sicherte [Freilij *et al.* 1995].

Der Einschluss der kongenitalen Toxoplasmose Patienten erfolgte basierend auf Anamnese und Seropositivität der Mutter in der Schwangerschaft, sowie serologischen Tests wie IgG und IgM postnatal bei Vorstellung in der Ambulanz. Im Falle der kongenitalen Toxoplasmose wurden alle Mütter im serologischen Screening während der Schwangerschaft positiv (IgG, 2 x IgM) getestet; die kongenitale Infektion wurde über IgG ELISA, IgG HA und IgM ELISA oder IgA ELISA Antikörpernachweis sichergestellt. Nach dem „Consenso Argentino de toxoplasmosis

4 Diskussion

congénita“, - aktualisiert 2008-, sichern die persistierenden IgG Antikörper im ELISA-Test und ein positiver IgM ELISA und/oder ein positiver IgA ELISA und mindestens zweimal positiven IgM in der Schwangerschaft die konnatale Infektion mit *T. gondii* [Altcheh *et al.* 1997; Durlach *et al.* 2008].

Zur kritischen Betrachtung unserer Ergebnisse ist hier auf die Schwierigkeiten in der Diagnosestellung der konnatalen Toxoplasmose einzugehen. Die Diagnosestellung der kongenitalen *T. gondii* wird immer wieder kontrovers diskutiert. Dies zum einen, da sie im Gegensatz zur kongenitalen Chagas Infektion zumindest nicht hauptsächlich auf einem direkten Erregernachweis beruht. Da die IgG Antikörper gegen *T. gondii* die Plazenta passieren, ist der IgG Nachweis bei Neugeborenen allein kein Beweis für eine Infektion [Groß *et al.* 2001; Montoya *et al.* 2004].

Der Nachweis von *T. gondii* spezifischen IgM bei der Schwangeren darf ohne weitere Abklärung nicht als Beweis für Infektion gewertet werden, da *T. gondii* IgM-Antikörper lange Zeit (bis zu mehreren Jahren) persistieren können und zu falsch positiven Ergebnissen führen können [Liesenfeld *et al.* 1997; Groß *et al.* 1998]. Eine Möglichkeit ist hier die Durchführung eines IgG Aviditätstestes. Dieser unterscheidet zwischen einer erst erworbenen und einer vorangehenden Infektion [Montoya *et al.* 2004]. Der IgG-Aviditätstest war bis zum Zeitpunkt unserer Studie aber in Argentinien nicht umgehend verfügbar, bzw. für das Labor nicht verfügbar und wurde deswegen bei keinem der Mütter dieser Studie durchgeführt. Ebenfalls bestand keine Möglichkeit der Durchführung einer PCR, mittlerweile ist dies der Fall. Ebenso stellte die argentinische Gesundheitsinfrastruktur zu diesem Zeitpunkt nur selten die Möglichkeit der Beginn einer Therapie in-utero, in unserem Patientengut war dies bei keinem der Fall, und wurde als Ausschlusskriterium gewertet, um einen Einfluss auf die Zytokinproduktion des Neugeborenen auszuschließen. Es ist somit zusammenzufassen, dass die Festlegung der Diagnose einer kongenitalen *T. gondii* Infektion entsprechend dem „Consenso Argentino de toxoplasmosis congénita“, - aktualisiert 2008-, erfolgte. Dies ist aber unter dem Kompromiss der Nutzung der dortigen Möglichkeiten zu sehen, aber entspricht nicht im vollen Umfang den hier mittlerweile üblichen Standards der Referenzzentren und Referenzlabore. Es ist festzuhalten, dass ein negatives IgM oder IgA des Neugeborenen aber eine kongenitale Infektion nicht ausschließt [Altcheh *et al.* 2006].

4.1. Klinische Daten in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose

Die Erfassung der Daten erfolgte bei der zum ersten Vorstellungstermin durchgeführten Anamnese, klinischen Untersuchung und den Anschlussuntersuchungen wie in Kapitel 2.1. dargestellt.

4 Diskussion

Die kongenitale Chagas-Infektion, kongenitale Toxoplasmose und Kontrollen bilden homogene Gruppen in Bezug auf Gestationsalter, Geburtsgewicht, Alter der Mutter bei Geburt, Geschlecht, und APGAR Index bei Geburt. Aufgrund der Pathologie der Erkrankung stellen sich Patienten mit kongenitaler Toxoplasmose erst im zweiten Lebenshalbjahr zur Diagnostik vor, weswegen diese bei Beginn der Behandlung signifikant älter sind im Vergleich zur Chagas Gruppe und Kontrollgruppe; dieses wurde bereits vorangehend in den Einschlusskriterien festgelegt. Alle Mütter der Chagas Gruppe kommen aus Endemiegebieten, wie in anderen Studien bereits definiert [Pinto Dias *et al.* 2002], wurden in der Schwangerschaft positiv auf die Infektion getestet und zu keinem Zeitpunkt behandelt. Die kongenitale Infektion war bei allen auch gesichert, da alle Kinder in nicht-endemischen Gebieten wohnten und nie in ein Endemiegebiet gereist waren. Von den 18 eingeschlossenen kongenitalen Chagas Patienten unserer Studie, entwickelten 50% keine Symptome der Krankheit; diese Anzahl unterscheidet sich nicht von der in den unten genannten Studien, man muss hier aber die geringe Patientenzahl unserer Studie in Betracht ziehen. Freilij beschreibt, dass 64.8% der Patienten nach der kongenitalen Infektion mit *T. cruzi* asymptomatisch bleiben [Freilij *et al.* 1995]. Altcheh berichtet über die häufigsten Symptome bei 168 Neugeborenen, diese waren: Hepatosplenomegalie (27.9%), Hepatitis (11.4%), Sepsis (5.13%), Meningoenzephalitis (2.3%), Myokarditis (2.3%) und Anämie (1.1%) [Altcheh *et al.* 2005]. Die Häufigkeit kardialer Symptome in unserer Studie, welche den Beginn kardialer Symptome darstellen (insgesamt 22.2%), ist höher als die Zahlen von anderen Autoren, während es bei der Hepatosplenomegalie (27.8%) eher eine weitgehende Übereinstimmung gibt (3.1.1.). Die Seronegativierungsverläufe (3.1.1., Abb. 6 und 7) in den ELISA IgG und HA IgG sind denen einer Studie von Altcheh vergleichbar [Altcheh *et al.* 2005].

Zusammenfassend stimmen die von uns erhobenen Daten weitgehend mit denen vorangehender Studien überein, obwohl hier die im Verhältnis geringe Anzahl von 18 Patienten in Betracht gezogen werden muss.

47.5% der eingeschlossenen kongenitalen Toxoplasmose Patienten bleiben asymptomatisch, Anomalien der Hirnventrikel, Konvulsionen und andere neurologische Symptome werden in 8 Fällen beobachtet (42.2%), Ikterus in einem Fall, und Ikterus kombiniert mit Anämie in einem weiteren Patienten (3.1.2.; Tabelle 4).

Es gibt sehr wenige Berichte betreffend der klinischen Symptome bei kongenitaler Toxoplasmose. Über einen Zeitraum von fünf Jahren beobachtete Sáfaci im Santa Casa de São Paulo Hospital, Brasilien 43 Kinder mit kongenitaler Toxoplasmose. Der Autor findet dabei eine Prävalenz subklinischer Infektion bei Geburt von 88%. Von diesen 43 Kindern entwickeln 22 (51%) neurologische Symptome, 41 (95%) zeigen Veränderungen des Augenhintergrundes; von diesen haben

4 Diskussion

36 (88%) bilaterale Veränderungen. In einer weiteren Studie von Sáfadi entwickeln drei der Kinder, die anfangs einen normalen Augenbefund hatten viele Jahre später eine Chorioretinitis trotz der Behandlung im ersten Lebensjahr. Fünf weitere Kinder, bei denen die Diagnose verspätet gestellt wurde und die deswegen nicht im ersten Lebensjahr behandelt wurden, zeigen eine Reaktivierung okularer Läsionen [Sáfadi *et al.* 2003]. Di Carlo berichtet über das Follow-up von 14 Kindern mit kongenitaler Toxoplasmose; vier Kinder zeigen Zeichen der Infektion und 2 Kinder haben Toxoplasmose-spezifische Anomalien nach der Geburt [Di Carlo *et al.* 2007]. Carral führte klinische und serologische Kontrollen in 94 Neugeborenen von Müttern, welche sich in der Schwangerschaft infizierten durch, und findet dabei fünf Fälle von kongenitaler Toxoplasmose mit fetalen Schäden, vier Fälle mit Chorioretinitis und einen Fall von Mikrozephalie [Carral *et al.* 2008]. Vutova untersuchte Augenmanifestationen in 38 Kindern, das häufigste Symptom ist hier die Chorioretinitis (92%), in 71% assoziiert mit anderen okularen Läsionen; die zweithäufigste Symptomatik ist Mikrophtalmie und Strabismus. Der inflammatorische Prozess schließt hier auch das vordere Segment des Auges ein: Iridozyklitis, Katarakt und Glaukom können die Folgen sein. Andere seltenere Symptome sind Hydrozephalus, Verkalkungen im Gehirn, Parese, Epilepsie und verminderter Visus [Vutova *et al.* 2002].

Unsere Daten stimmen hier weitgehend mit den oben zitierten Studien speziell von Sáfadi überein; obwohl wir weniger Patienten einschlossen. Die Anzahl der Patienten in den Studien von Di Carlo und Carral [Di Carlo *et al.* 2007; Carral *et al.* 2008] scheint aber zu niedrig, um sie mit unseren Daten zu vergleichen. Die Häufigkeit okularer Symptome stimmt in etwa mit den Zahlen von Vutova [Vutova *et al.* 2002] überein, aber in unserer Studie werden die genauen Augenveränderungen im Vergleich zu dieser Publikation nicht erfasst (wir reduzierten uns in der Erfassung auf Augenhintergrundveränderungen Ja/Nein), da die ophthalmologische Behandlung abseits der Behandlung der parasitologischen Ambulanz durchgeführt wurde.

Die Verläufe der serologischen Follow-ups der IgG ELISA und IgG HA bestimmten Antikörper (3.1.1.; Abb. 8 und 9) sind denen von Altcheh 2006 publizierten in 11 Patienten ähnlich, bei denen die Kinder betreff des spezifischen IgG in 5.8 Monaten nach Beginn der Behandlung seronegativierten [Altcheh *et al.* 2006]. In dieser Studie kommt es aber zu einem allmählicheren Abfall und nicht zu einem vorübergehenden Anstieg. Der Verlauf der mittleren IgG ELISA Konzentrationen zeigt in unseren Patienten zunächst einen Anstieg mit einem Höhepunkt bei 4 Monaten nach Beginn der Behandlung. Da der IgG Anstieg dem IgM zeitlich nachfolgt [Altcheh *et al.* 1997; Altcheh *et al.* 2006], ist dies mit ein Beleg der konnatalen Toxoplasmose in unseren Patienten, da die IgG Antikörper hier in den ersten Lebensmonaten ansteigen [Groß *et al.* 2001]. Wie vorangehend erwähnt ist die Bestimmung der IgG HA zur Diagnostik der kongenitalen Toxo-

4 Diskussion

plasmose aber nur eingeschränkt empfohlen [Durlach *et al.* 2008], da seine Positivierung verzögert auftritt, und dann unter der Behandlung wenig Aussagekraft besitzt.

Zusammenfassend stimmen unsere erhobenen klinischen Daten weitgehend mit denen früherer Studien überein, aber auch hier muss die geringe Anzahl von 19 Patienten bei der Beurteilung in Betracht gezogen werden.

4.2. Zytokinverhalten in Seren Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose

4.2.1. Unterschiede im Zytokinverhalten in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion im Vergleich zu kongenitaler Toxoplasmose und Kontrolle

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen waren die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-18 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose niedriger, signifikant für IL-18 bei kongenitaler Chagas-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen und für Chagas vs. Toxoplasmose, aber nicht für Toxoplasmose vs. Kontrolle.

IFN- γ in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose war im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt (3.2.).

Interessant ist, dass diese erniedrigten Konzentrationen von Th1 Zytokinen mit Erhöhungen des regulatorischen Zytokins IL-10 im Vergleich zu den Kontrollen in beiden Infektionen, signifikant in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, assoziiert waren.

Diese Resultate lassen vermuten, dass in der Infektion mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose die Parasiten-induzierte Th1 Immunantwort von regulatorischen Mechanismen beeinflusst wird. Kritisch zu sehen ist aber in unseren Resultaten, dass dies nur durch den quantitativen Nachweis von IFN- γ , IL-18 und IL-10 in Seren retrospektiv erfolgt. Weitere Parameter wie aktivierte Zellpopulation, Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen konnten in unserem Patientengut deswegen nicht ermittelt werden, weshalb wir hier unsere Studie mit anderen Studien respektive der kongenitalen Chagas und kongenitalen Toxoplasmose verglichen werden muss. Diese Studien zeigen vergleichbare Ergebnisse.

In Müttern mit Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion wurde bereits über eine verminderte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen und *T. cruzi*-spezifischer Suppression der IFN- γ Antwort berichtet [Hermann *et al.* 2004]. NK-Zellen sind vermindert und zeigen eine defekte IFN- γ Produktion nach *in vitro* Aktivierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

4 Diskussion

Vekemans fand eine hochregulierte Kapazität in nicht- infizierten Neugeborenenzellen, pro- und anti-inflammatorische Zytokine zu produzieren, wenn deren Mütter mit *T. cruzi* infiziert sind. Die Zytokinantwort in dieser Studie wird hier in mit LPS-PHA oder Parasitlysat vorangehend stimuliert. Die mütterliche in-utero Modulation verursacht eine Verminderung der neonatalen T-Zell vermittelten Immunantwort im Vergleich zu nicht-infizierten Neugeborenen. Es zeigt sich eine erhöhte Kapazität in nicht-infizierten Neugeborenenzellen von *T. cruzi*-positiven Müttern, pro- aber auch anti-inflammatorische Zytokine zu produzieren im Vergleich zu Neugeborenenzellen nicht-infizierter Mütter, die geringere Mengen von beiden produzieren [Vekemans *et al.* 2000]. Truyens demonstrierte, dass die mütterliche *T. cruzi* Infektion in utero, sowohl die angeborene, als auch adaptive Immunantwort in umbilikalen Nabelschnurblutzellen triggert [Truyens *et al.* 2005]. Basierend auf demselben Studienmodell beeinflussen die mütterliche Infektion mit *T. cruzi* und die kongenitale Chagas Erkrankung die Immunantwort auf BCG, Hepatitis B, Diphtherie und Tetanus Vakzine in der Neonatalperiode nicht, die immunologische Unreife bei der neonatalen *T. cruzi* Infektion beschränkt sich hierbei nicht auf die Entwicklung der Parasitenspezifischen Immunantwort, sondern tendiert auch zu einer Th1 Immunantwort gegen die Vakzinantigene [Dauby *et al.*, 2009]. In einer Studie, die Seren nicht infizierter Neugeborener und ihren infizierten Müttern verwendet, werden IFN- γ , TNF- α , IL-10, und TGF- β in chronisch infizierten Müttern mit erhöhter Parasitämie und ihren nicht-infizierten Neugeborenen im peripheren Blut, Nabelschnurblut und plazentaren Blut bestimmt, und mit denen mit geringer Parasitenlast verglichen. Die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α sind hier höher in Seren bei Müttern mit erhöhter Parasitämie und ihren Neugeborenen, als bei denen mit geringer Parasitenlast; während die IL-10 und TGF- β Werte in beiden Gruppen unverändert sind. Dies legt nahe, dass die erhöhte Parasitenlast der Mutter die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine costimuliert [Cuna *et al.* 2009]. Da es sich hier um nicht-infizierte Neugeborene handelt stehen diese Ergebnisse nicht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, auch hier waren die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-18 dieser erhöht, des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Mütter in unserer Studie mangels Symptomatik, weswegen sie ja nicht behandelt wurden mussten, in der Schwangerschaft eine geringe Parasitenlast aufweisen.

T. gondii übertragende Mütter haben verminderte CD8⁺ T-Zell Funktionen und geringere Mengen an maternalen CD4⁺ und NK-Zellen [Hohlfeld *et al.* 1990; Nigro *et al.* 1999]. In Neugeborenen mit kongenitaler Toxoplasmose ist die relative prozentuale Anzahl von CD25 signifikant erniedrigt, im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen [Kahi *et al.* 1999; Fatoohi *et al.* 2003]. In diesen Studien wird CD25 – die Alpha- Kette der IL-2 Rezeptoren – als Marker der T-Zell Aktivierung zur Diagnose der kongenitalen Toxoplasmose gebraucht.

4 Diskussion

Man weiß heute, dass T-regulatorische Zellen (T-reg) hauptsächlich für die IL-10 Sekretion zuständig sind, die das CD25+ Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren [Jonuleit *et al.* 2002]. Es liegt deswegen nahe anzunehmen, dass die vermehrte Expression des IL-2 Rezeptors CD25 in diesen Studien auf eine vermehrte Anzahl von T-reg Zellen hinweisen, welche unsere erhöhten IL-10 Konzentrationen in Neugeborenen erklären könnten. Neuere Studien weisen nun auf IL-10 produzierende T-reg Zellen als verantwortlich für die Herstellung einer toleranten Umgebung in der Schwangerschaft hin, um somit den Abort zu verhindern [Guleria *et al.* 2007].

Die IL-10 Produktion von T-reg Zellen ist während der Schwangerschaft bei Mäusen deutlich erhöht [Zenclussen, 2005]. Sie scheinen in der Schwangerschaft in einer spezifischen Weise gegen väterliche Antigene zu handeln, was erklärt, dass das mütterliche Immunsystem sich der Anwesenheit dieser bewusst ist, sie aber nicht abstößt [Zenclussen, 2006]. Erhöhungen von IL-10 nach der Übertragung protektiver T-regs in der Schwangerschaft in Mäusen weisen darauf hin, dass diese über die Sekretion von IL-10 handeln [Guleria *et al.* 2007]. T-regs produzieren inhibitorische Moleküle die Funktionen Antigen-präsentierender Zellen unterdrücken. Diese Polarisierung der Immunantwort hin zu Th2/T-reg in der Schwangerschaft scheint sich in der Neugeborenenperiode partiell fortzusetzen [Levy, 2007]. In einer Studie mit erwachsenen Mäusen zeigte Kotner, dass T-regs aber nicht unbedingt zur Umgehung der Immunantwort bei der akuten oder chronischen Form der *T. cruzi* Infektion nötig sind. Die *in vivo* anti-CD25+ Antikörper vermittelte Depletion von T-reg Zellen in Mäusen während der Infektion mit einem letalen oder einem nicht letalen Stamm, führt weder zu einer Verbesserung, noch zu einer Verschlechterung des Outcome in der Immunantwort [Kotner *et al.* 2007]. In der plazentar übertragenen Malaria, führt die Exposition des Feten gegen Malaria Antikörper zu einer Erhöhung Malaria spezifischer FOXP3(+) T-regs und erhöhten Werten der unspezifischen FOXP3(+) CD4(+) T-regs, zusammen einer Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α bei den Neugeborenen bei denen die Infektion postnatal ausheilte [Flanagan *et al.* 2010].

Ähnliche Veränderungen wurden vorangehend in der Immunantwort in Neugeborenen bei anderen Infektionen wie *HIV* [Kuhn *et al.* 2001; Kuhn *et al.* 2002], *RSV* [Tsutsumi *et al.* 1996], *HSV* [Burchett *et al.* 1992], *Streptokokken* [La Pine *et al.* 2003] und *P. falciparum* [Fievet *et al.* 1996] (Tabelle 2) berichtet.

In Nabelschnurblut *HIV* infizierter Neugeborenen zeigt sich IFN- γ erniedrigt aber IL-10 erhöht im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen [Kuhn *et al.* 2001]. *HSV*-infizierte Neugeborene zeigen signifikant erniedrigte *HSV*-spezifische Lymphozytenproliferation und IFN- γ Produktion [Burchett *et al.* 1992]. La Pine berichtete, dass neonatale mononukleäre Zellen eine deutlich

4 Diskussion

geringere Sekretion der Th1- Zytokine IFN- γ , IL-12 und IL-18 zeigen, was zur höheren Anfälligkeit gegen die Streptokokken Infektion beiträgt [La Pine *et al.* 2003].

Die Intensität der veränderten Abwehrlage scheint bei kongenitalen Infektionen mit der Schwere der Krankheit zu korrelieren, da es im Falle des *HSV* Infektion invers mit der IFN- γ Produktion im Zusammenhang steht [Burchett *et al.* 1992].

IL-18 erhöht die IFN- γ Produktion in T-Zellen in Zusammenhang mit IL-12. In *T. gondii* infizierten Mäusen trägt die IL-18 Sekretion zur Dünndarm Th1-Immunopathologie bei [Vossenkamper *et al.* 2004].

Die Konzentrationen des hauptsächlichen regulatorischen Zytokins IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose sind bis heute wenig erforscht. Die bei uns beobachtete Erhöhung könnte auf die erhöhte Anzahl von T-regs hinweisen, die daraufhin den Rückgang der Th1 Zytokine verursacht.

Es existieren mehrere Erklärungen für diesen Shift hin zu einer gegenregulatorischen Immunantwort:

1. da die Th1 Antwort auf die Infektion mit *T. gondii* oder *T. cruzi* potentiell schadhaft für den Wirt ist, ist die erhöhte IL-10 Produktion ein Abwehrmechanismus, um eine verstärkte schädigende Immunpathologie zu vermeiden [Suzuki *et al.* 2000; Vossenkamper *et al.* 2004; Ronet *et al.* 2005; Araujo *et al.* 2007]. In Menschen mit *T. cruzi* Infektion führt die IL-10 Produktion durch T-regs zu einer kontrollierten Entwicklung der Krankheit in der Latenzphase, aber nicht der mit kardialen Symptomen verlaufenden chronischen Form der Erkrankung [Araujo *et al.* 2007]. Die CD4+ T-Zell Subpopulation wurde als verantwortlich für die Koproduktion von IFN- γ und IL-10 bei *T. gondii* Infektion identifiziert [Jankovic *et al.* 2007].
2. die Verlagerung zu einer gegenregulatorischen Immunantwort könnte vom Parasiten selbst verursacht sein, um auf diesen Weg die Th1 Immunantwort, welche die Parasitenreplikation blockiert, zu unterwandern (Molekulares Mimikri). Sowohl *T. cruzi* als auch *T. gondii* enthalten Moleküle die Wege der Immunantwort untergraben [Denkers *et al.* 2005].
3. die Schwangerschaft führt das Immunsystem zu einer erhöhten Toleranz, T-reg Zellen funktionieren hier zum Schutze des Feten vor der eigenen Immunantwort [Velilla *et al.* 2006; Guleria *et al.* 2007]. Dieser Umstand setzt sich in die Neugeborenenperiode fort.

Zusammenfassend führte in unserer Studie die Analyse der Zytokine in Neugeborenen mit kongenitaler *T. cruzi* oder *T. gondii* Infektion zu einer verminderten Th1 Zytokinproduktion mit einer Erhöhung von IL-10, am ehesten verursacht durch die Regulierung von T-reg Zellen.

Oben angeführte Studien mit aktivierten Zellpopulation, Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen zeigen vergleichbare Resultate. Hier erfolgt die Bestimmung unter klinischen

4 Diskussion

Bedingungen. Es muss betont werden, dass das Zusammenspiel der Zytokine komplex ist, und die Bestimmung von IL-18 und IFN- γ als Marker der pro-inflammatorischen und IL-10 T-Zell als Marker der gegenregulatorischen vermittelten Immunantwort in ihrer Aussagekraft dadurch eingeschränkt ist. Hier erfolgte die Festlegung auf 3 Schlüsselzytokine, diese werden in Zusammenhang mit der vorliegenden Literatur gewertet, können aber nicht beanspruchen den gesamten komplexen Zusammenhang der Immunantwort wiederzugeben.

Weitere Studien müssen deswegen die genauen zugrunde liegenden Mechanismen dieser Verlagerung von einer pro-inflammatorischen hin zu einer gegenregulatorischen Immunantwort noch genauer überprüfen.

4.2.2. Zytokinverhalten in Seren Neugeborener mit kongenitaler Chagas-Infektion vor und nach Behandlung

Die Bewertung der Zytokinkonzentrationen vor und nach Beendigung der Behandlung ist entscheidend in der Bewertung, ob diese nützlich als diagnostischer Marker der Infektion sind. Die Menge der Zytokine wurde in den Neugeborenen mit kongenitaler *T. cruzi* Infektion und Standardtherapie (Nifurtimox (Lampit[®]) oder Benznidazol (Rochagan[®])) erneut nach 3 Monaten Behandlung bestimmt. Die Konzentrationen, sowohl der pro-, als auch gegenregulatorischen Zytokine waren hierbei nur tendenziell erniedrigt.

Es existiert nur sehr wenig Literatur über das Zytokinverhalten während der Behandlung der Chagas-Infektion, sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern. In erwachsenen Menschen führte die Anwendung von Benznidazol bei *T. cruzi* Infektion zu inversen Zytokinbalancen in der Latenzphase, als auch in der chronischen kardialen Form der Erkrankung. Änderungen in der Anzahl der IL-10 produzierenden CD4⁺ Zellen und Monozyten führen Patienten in der Latenzphase zu einer inflammatorischen Immunantwort, Patienten in der chronischen kardialen Phase entwickelten ein reguläres Zytokinprofil [Vitelli-Avelar *et al.* 2008]. Sathler-Avelar berichtete über das Zytokinverhalten in sechs Schulkindern vor Behandlung mit Benznidazol und einem Jahr später im Vergleich zu gesunden Schulkindern. Die *in vitro* Stimulation mit *T. cruzi* Antigenen führt das Zytokinverhalten der behandelten Kinder zu einem Immunprofil mit höheren Werten von IFN- γ , TNF- α , IL-4 und NK-Zellen, leicht erhöhten IFN- γ , TNF- α , IL-10 und CD4⁺ T-Zellen, zusätzlich zu einer erhöhten Anzahl von TNF- α /IL-4⁺ und CD19⁺ Lymphozyten. Eine Verlagerung hin zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort ist somit kennzeichnend für Kinder, die mit Benznidazol behandelt wurden [Sathler-Avelar *et al.* 2006].

4 Diskussion

In Studien mit Mäusen führt die Behandlung mit Benznidazol oder Nifurtimox zu geringeren Konzentrationen von, sowohl pro-, als auch anti-inflammatorischen Zytokinen nach Behandlung [Piaggio *et al.* 2001]. Studien in Menschen und experimentelle Modelle legen eine Beteiligung des Immunsystems an der effizienten Behandlung gegen Protozoen nahe. Ein immunmodulierender Effekt wurde für Benznidazol nachgewiesen [Revelli *et al.* 1999], wobei die NO, IL-6 und IL-10 Sekretion in Ratten, welche mit diesem Medikament behandelt wurden vermindert war. Die Rolle von IFN- γ und IL-12 in der Aktivität von Benznidazol in den frühen Stadien der experimentellen Chagas Erkrankung wurde von Michailowsky untersucht. Die Behandlung von *T. cruzi*-infizierten Mäusen mit anti-Zytokin monoklonalen Antikörpern hat keinen Effekt, wenn die optimale Dosis von Benznidazol appliziert wurde. Bei suboptimaler Dosierung erhöht dies aber die Mortalität der Mäuse signifikant. Die simultane Behandlung mit der suboptimalen Dosierung und IL-12 erhöht aber die Effizienz der Behandlung und verringert die Mortalität [Michailowsky *et al.* 1998]. Dies lässt sich am ehesten durch den Rückgang der Infektion begründen, welche dann eine normale pro-inflammatorische Reaktion hervorruft erklären, wie bereits in anderen Studien erwähnt [Meyer zum Büschenfelde *et al.* 1997, Antúnez *et al.* 2000]. Die verminderte Antigenstimulation führt dabei zu einer geringeren Antigenaktivierung und somit auch zu einer geringeren Zytokin und CD4+ Zell Aktivierung.

Es liegt uns keine Literatur über das Zytokinverhalten während der Behandlung von Chagas in Neugeborenen vor.

Zusammenfassend ist eine Festlegung auf einen Zusammenhang unserer Ergebnisse mit einer Modulation des Immunsystems durch die Medikation nicht möglich. Unsere Daten zeigen nicht, ob die untersuchten Zytokine als diagnostischer Marker dienen. Vielleicht würde hier eine erneute Untersuchung mit einer größeren Patientenzahl weitere Erkenntnisse schaffen.

4.2.3. Zytokinverhalten in Seren gesunder Neugeborener von *T. cruzi* positiven Müttern im Vergleich zu Neugeborenen gesunder Mütter

Die Kontrollgruppe wurde in 10 gesunde Neugeborene von *T. cruzi* positiven Müttern ohne Symptome in der Schwangerschaft (Kontrolle 1), und 10 von gesunden nicht-infizierten Müttern (Kontrolle 2) unterteilt (2.1.1.).

Es konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Bei IL-18 waren die Konzentrationen der Kontrolle 1 tendenziell etwas höher im Vergleich zu Kontrolle 2; bei IFN- γ waren die Konzentrationen der Kontrolle 1 ebenfalls tendenziell etwas höher im Vergleich zu Kontrolle 2; bei IL-10 waren die Konzentrationen der Kontrolle 1 niedriger im Vergleich zu Kontrolle 2.

4 Diskussion

Es gibt nur sehr wenig Literatur zur Immunantwort bei der Übertragung von *T. cruzi*.

Hermann untersuchte die Parasitenzahlen und die folgende Immunantwort von *T. cruzi*-infizierten Schwangeren, die den Parasiten auf ihr Kind übertrugen mit denen, die ihn nicht übertrugen. Die übertragenden Mütter haben öfter eine positive Hämokultur auf *T. cruzi* als nicht-übertragende, dies in Verbindung mit verminderter Produktion von Parasiten-spezifischen IFN- γ . Im Gegensatz hierzu ist die Produktion von IL-2, IL-4, IL-10 und TGF- β ähnlich im Vergleich beider Gruppen nach der Stimulation mit *T. cruzi* Lysat. Die Flow-zytometrische Analyse zeigte, dass T-Zellen und Monozyten der übertragenden Mütter sich weniger aktiviert zeigen, als die der übertragenden Mütter [Hermann *et al.* 2004]. Torrico verglich hämatologische und parasitologische Daten von bolivianischen *T. cruzi* infizierten Müttern mit klinischen und biologischen Daten von ihren infizierten und nicht-infizierten Neugeborenen. Neugeborene mit kongenitaler Infektion haben häufiger niedrige APGAR Werte, geringeres Geburtsgewicht, häufiger Frühgeburtlichkeit, RDS und eine höhere Mortalität als Neugeborene ohne kongenitale Infektion [Torrico *et al.* 2005]. Die Möglichkeit der mütterlichen in-utero Modulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort nicht infizierter Neugeborener von *T. cruzi*-infizierten Müttern, wird über die Kapazität ihrer Vollblutzellen Zytokine nach Stimulation durch *T. cruzi* Lysat oder LPS-PHA bestimmt [Vekemans *et al.* 2000]. Diese Neugeborenen produzieren nur geringfügig IFN- γ und IL-4 nach spezifischer Stimulation, während ihre Mütter mit hoher Produktion von IFN- γ , IL-2, und IL-4 antworten. Die Infektion in den Müttern ist ebenfalls assoziiert mit: einer Hyperaktivierung mütterlicher Zellen wie Zellen von ihren nicht- infizierten Neugeborenen. Des Weiteren ist die Infektion in den Müttern mit der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie auch mit IL-10 verbunden. Die *T. cruzi* Infektion der Mutter verursacht somit Veränderungen in der Zytokinantwort des gesunden Neugeborenen. Dieser mütterliche Einfluss auf das Immunsystem des Neugeborenen mag dazu beitragen, die Häufigkeit und Schwere der kongenitalen Infektion zu begrenzen [Vekemans *et al.* 2000]. In der bereits erwähnten Studie von Cuna, die Seren nicht infizierter Neugeborener und ihren infizierten Müttern verwendet, werden IFN- γ , TNF- α , IL-10, und TGF- β 1 in chronisch infizierten Müttern mit erhöhter Parasitämie und ihren nicht-infizierten Neugeborenen im peripheren Blut, Nabelschnurblut und plazentaren Blut bestimmt, und mit denen mit geringer Parasitenlast verglichen. Die pro-inflammatorischen IFN- γ und TNF- α sind hier höher bei Müttern mit erhöhter Parasitämie und ihren Neugeborenen als bei denen mit geringer Parasitenlast, während die IL-10 und TGF- β 1 Werte in beiden Gruppen unverändert sind. Dies legt nahe, dass die erhöhte Parasitenlast der Mutter die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine anregt [Cuna *et al.* 2009]. Da es sich hier um nicht-infizierte Neugeborene handelt, stehen diese Ergebnisse nicht im Gegensatz zu unseren, auch in unseren Er-

4 Diskussion

gebnissen waren die pro-inflammatorischen IFN- γ und IL-18 dieser erhöht, des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Mütter in unserer Studie eine geringe Parasitenlast aufweisen.

Ein Unterschied zwischen beiden Untergruppen kann in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Die Literatur zeigt, dass die mütterliche *T. cruzi* Infektion in die Immunantwort des Neugeborenen eingreift und Veränderungen in dieser hervorruft, die dem Schutze des Nachwuchses dienen. Weitere Studien mit höheren Patientenzahlen bringen hier eventuell weitere Erkenntnisse.

4.3. Korrelation von IL-18, IFN- γ und IL-10 in Seren von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose

Es ist bekannt, dass IL-18 in Zusammenarbeit mit IL-12 die IFN- γ Produktion anregt, aber auch unabhängig von IL-12 [Yoshimoto *et al.* 1998]. IFN- γ verzögert die IL-10 Produktion [Chomarat *et al.* 1993]. Im Gegenzug verhindert IL-10 die IFN- γ Produktion humaner Lymphozyten über die Suppression der IL-12 Synthese [d'Andrea *et al.* 1993].

Wir zeichneten deswegen Scatterplots, um folgendes zu vergleichen: die individuellen Serumkonzentrationen von IL-18 gegen IFN- γ (IL-18/IFN- γ), IL-10 gegen IFN- γ Konzentrationen (IL-10/IFN- γ), beides für kongenitale Chagas-Infektion (3.4.1.) und kongenitale Toxoplasmose (3.4.2.), und berechneten die Korrelation nach Spearmans Rho.

Bei IL-18/IFN- γ bei kongenitaler Chagas-Infektion sahen wir eine annähernd lineare Verteilung in der Tendenzlinie des Scatterplots, der RSq-Wert war 0.603 (Abb. 12) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.48, und signifikanten P-Wert (0.044). Dies beschreibt eine signifikante Korrelation für die Annahme, dass erhöhte IL-18 Werte mit erhöhten IFN- γ einhergingen. Im IL-10/IFN- γ Scatterplot bei kongenitaler Chagas-Infektion beobachteten wir dagegen eine geneigte Tendenzlinie hin zu IL-10 mit einem RSq Wert von 0.03 (Abb. 13) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.17 und einem nicht signifikanten P-Wert. Dies beschreibt, dass hohe IFN- γ Werte invers mit niedrigen IL-10 Werten verbunden sind.

Bei IL-18/IFN- γ in kongenitaler Toxoplasmose beobachteten wir eine geneigte Tendenzlinie hin zu IL-18 mit einem RSq Wert von 0.062 (Abb. 14), mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.31, und nicht signifikanten P-Wert. Im IL-10/IFN- γ Scatterplot sahen wir erneut eine lineare Verteilung in der Tendenzlinie des Scatterplot, der RSq Wert war 0.29 (Abb. 15) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.53, und signifikanten P-Wert (0.021). Dies beschreibt, dass erhöhte IL-10 Werte im individuellen Patienten mit erhöhten IFN- γ Werten assoziiert waren.

4 Diskussion

Es existiert keine Literatur in Bezug auf den Zusammenhang der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas oder kongenitaler Toxoplasmose, aber es gibt auch wenig Literatur über andere Infektionen oder gesunde Individuen.

Härtel veröffentlichte eine Studie in gesunden Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen. Eine Korrelation zwischen IL-4 und IL-10 ist hier der Fall; die Werte der IL-5 und IL-10 Sekretion zeigen sich individuell reguliert auf einem bestimmten Niveau in Neugeborenen und früher Kindheit [Härtel *et al.* 2005]. Ein signifikanter Zusammenhang wird zwischen IL-10 in CD4+ Zellen und IFN- γ in CD8+ Zellen in normalen gesunden Kindern zwischen 0 und 18 Jahren gefunden [Hoffmann *et al.* 2005]. In einer weiteren Studie in Kindern mit *P. falciparum* Infektion zeigt die Korrelation zwischen IL-12 und IL-18 einen progressiven Zusammenhang, während IL-18 sich in höheren Werten als IL-12 stabil zeigt. Hier zeigt sich eine inverse Korrelation zwischen IL-12 und TGF- β , bei denen die TGF- β Titer stabil blieben [Malaguarnera *et al.* 2002].

In Erwachsenen beobachtet D'Avila in der Latenzphase der Chagas-Infektion eine hoch positive Korrelation zwischen IL-10 und IFN- γ Werten im Serum, während Patienten mit kardialer Manifestation keine Korrelation zeigen, was auf eine unkontrollierte inflammatorische Immunantwort in kardialen Patienten hinweist [D'Avila *et al.* 2009].

Eine strenge Korrelation wird zwischen der Eliminierung der Parasiten und einer erhöhten *Leishmania*-spezifischen IFN- γ /IL-10 Ratio in Mäusen gefunden [Silvestre *et al.* 2007]. In einer Studie von Guedes ist die chronisch kardiale Form der Krankheit mit hohen IFN- γ und TNF- α Werten und geringem IL-10 in der akuten Phase der Chagas-Infektion in Mäusen assoziiert [Guedes *et al.* 2009]. IL-18 aktiviert IFN- γ potenter als IL-12, offensichtlich über einen separaten Pfad sowie über Co-Induktion [Okamura *et al.* 1995; Romagnani, 2006], somit kann eine Korrelation zwischen IL-18 und IFN- γ erwartet werden. Auf der anderen Seite können beide Th1 Antworten durch adaptive T-reg Zellen über kontaktabhängige Mechanismen und die Produktion von IL-10 unterdrückt werden [Romagnani, 2006], so dass eine Korrelation von IFN- γ und IL-10 erwartet werden kann. Bei IFN- γ vs. IL-18 in der kongenitalen Chagas Gruppe ist diese Korrelation offensichtlich nachgewiesen, ebenso mit einem signifikanten Ergebnis bei IFN- γ vs. IL-10 für die kongenitale Toxoplasmose.

Diese Kurven und statistischen Ergebnisse müssen aber erneut unter dem Aspekt der geringen Anzahl von Patienten in dieser Studie gesehen werden. Scatterplots und Korrelationskoeffizienten sind umso verwundbarer, desto weniger Patienten eingeschlossen sind; eine höhere Anzahl an Patienten könnte wahrscheinlich signifikantere Ergebnisse für IFN- γ vs. IL-10 für kongenitale Chagas und für IFN- γ vs. IL-18 für kongenitale Toxoplasmose liefern. Der Zusammenhang in Bezug auf die von uns getesteten Zytokine konnte aber zumindest partiell nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.4. Die Korrelation zwischen Zytokinwerten und der Klinik der Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose

Neugeborene mit symptomatischer kongenitaler Toxoplasmose hatten signifikant erhöhte IL-18 Werte im Vergleich zu asymptomatischen Neugeborenen; lediglich tendenziell höhere IL-18 und IFN- γ Werte konnten für symptomatische kongenitale Chagas Patienten, und tendenziell höhere IFN- γ Werte für symptomatische kongenitale Toxoplasmose Patienten beobachtet werden. Tendenzuell erniedrigte Werte von IL-10 konnten für symptomatische kongenitale Chagas Patienten, aber tendenziell höhere Werte an IL-10 für symptomatische kongenitale Toxoplasmose Patienten im Vergleich zu asymptomatischen Neugeborenen beobachtet werden (3.5; Tabelle 6).

Hierzu konnte nur wenig Literatur gefunden werden. Laucella beschreibt IFN- γ als intensiv involviertes protektives Lymphokin gegen *T. cruzi*. Durch IFN- γ aktivierte Makrophagen setzen reaktive Sauerstoffmetaboliten und NO frei. IL-4, IL-10 und TGF- β sind hierbei in der Lage, diese intrazelluläre Kontrolle der IFN- γ -aktivierten Makrophagen herunterzuregulieren [Laucella *et al.* 1996]. In Neugeborenen mit kongenitaler Chagas Infektion beschreibt Torrico eine höhere Inzidenz von Neugeborenen mit niedrigen APGAR Werten, geringeres Geburtsgewicht, häufigere Frühgeburtslichkeit, RDS und höherer Mortalität in Vergleich zu Patienten mit höherer Antikörperantwort, im Vergleich zu nicht-infizierten Neugeborenen von infizierten Müttern [Torrico *et al.* 2004].

IFN- γ wird in höheren Konzentrationen in Kindern mit stabiler Toxoplasmose gebildet als in Kindern die eine serologische Reaktivierung zeigen, während Kinder mit serologischer Reaktivierung eine höhere Sekretion von IL-4 aufzeigen als die mit stabiler Toxoplasmose [Kahi *et al.* 1999]. In der Infektion mit RSV zeigt sich bei Kindern unter einem Jahr, dass Kinder mit rezidivierenden Hustenepisoden eine signifikante Erniedrigung der IFN- γ Werte haben, im Vergleich zu Kindern mit nur einer Hustenepisode [Kandelaki *et al.* 2005]. Didoli zeigte, dass die Gabe von IFN- γ an schwangere Ratten einen partiellen Schutz auf deren Nachwuchs in der weiteren Infektion mit *T. cruzi* aufbauten [Didoli *et al.* 2000]. IL-18 erhöht die IFN- γ Produktion durch T- Zellen in Zusammenhang mit IL-12. In *T. gondii* infizierten Mäusen trägt IL-18 zur Th1 Immunpathologie entscheidend bei [Vossenkamper *et al.* 2004]. Erhöhte IL-18 Konzentrationen in symptomatischen kongenitalen Toxoplasmose Patienten korreliert mit den bekannten immunpathologischen Wegen. Die angeborene Abwehr gegen *T. gondii* ist abhängig von der Fähigkeit von IL-12, NK-Zellen zu aktivieren, die IFN- γ produzieren [Cai *et al.* 2000].

4 Diskussion

Verabreichung von IL-18 an *T. gondii* infizierte Mäuse resultiert in einer erhöhten Produktion von IFN- γ , reduzierten Parasitenlast und verminderten Mortalität [Cai *et al.* 2000].

Der Zusammenhang von klinischen Symptomen oder deren Auftreten mit einer erhöhten pro-inflammatorischen Immunantwort kann in unserer Studie nur partiell gezeigt werden.

Möglicherweise könnten auch hier weitere Studien in höheren Patientenzahlen diese Erwartung erfüllen.

4.5. Schlussfolgerung

Die Veränderungen der Immunantwort von Neugeborenen und Kindern wurden in der Vergangenheit in mehreren Studien untersucht, dabei wurden wichtige Unterschiede zur Immunantwort des Erwachsenen festgestellt, aber die Neugeborenen sind zu einer kompetenten Immunantwort fähig. Die meisten dieser Studien beruhen auf Werten aus aktiviertem Nabelschnurblut oder Mäusemodellen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-18 und IFN- γ bei der kongenitalen Chagas-Infektion signifikant zu gesunden Kontrollen erniedrigt sind, aber die gegenregulatorischen IL-10 Werte deutlich erhöht. In der kongenitalen Chagas Gruppe sind die Werte der pro-inflammatorischen Zytokine IL-18 und IFN- γ signifikant niedriger als in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe. Im Falle der Patienten mit kongenitaler Toxoplasmose sind die IFN- γ Werte im Vergleich zur Kontrolle deutlich erniedrigt. Wir sahen einen tendenziellen Unterschied mit niedrigeren IL-18 Werten in der kongenitalen Toxoplasmose Gruppe im Vergleich zur Kontrolle, mit erhöhten Mengen an IL-10. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der aktuellen Literatur mit Vollblutzellen oder Mausmodellen überein; das Serum der Neugeborenen resultierte hier brauchbar zur Zytokinbestimmung in Neugeborenen. Allerdings ist hier Vorsicht in der Interpretation geboten, da, wie bereits vorangehend erwähnt, Zytokine anfällig und von geringer Halbwertszeit sind. Andere Studien unter experimentellen Bedingungen kommen aber zu vergleichbaren Resultaten. Des Weiteren werden hier nur zwei Schlüsselzytokine der pro-inflammatorischen (IFN- γ und IL-18) Immunantwort und ein Schlüsselzytokin der gegenregulatorischen (IL-10) Immunantwort betrachtet. Eine weitere Betrachtung des Patientenkollektivs mit weiteren Zytokinen, aktivierte Zellpopulation, Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen würden hier die Konsistenz der Ergebnisse verstärken.

Wir sahen eine starke Korrelation und Signifikanz zwischen den Werten von IL-18 und IFN- γ für die kongenitale Chagas-Infektion, und zwischen IFN- γ und IL-10 für die kongenitale Toxoplasmose. Auch dies deckt sich mit vorliegender aktueller Literatur, die den Synergismus dieser

4 Diskussion

Zytokine beschreibt. Hier kann aber nicht von einem statistisch konsistenten Nachweis gesprochen werden.

Seren von kongenital *T. cruzi* infizierten Neugeborenen stehen seltenst für Studien zur Verfügung, und waren zum Beginn dieser Studie nur im Ambulanzzentrum und Labor für kongenitale Erkrankungen des "Hospital Ricardo Gutiérrez" in Buenos Aires, Argentinien vorhanden.

Zu einem statistisch aussagekräftigeren Ergebnis in Bezug auf die vorliegende Klinik und deren Zusammenspiel mit den Zytokinwerten bedarf es aber einer höheren Fallzahl und der eventuellen Messung weiterer pro- und anti-inflammatorischen Zytokine, aktivierter Zellpopulation und Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen. Die vorliegende Arbeit zeigt die Notwendigkeit weiterer Studien auf.

5. Zusammenfassung

Die Infektion mit *T. cruzi* oder *T. gondii* in der Schwangerschaft kann zur kongenitalen Chagas-Infektion oder kongenitalen Toxoplasmose führen. In Erwachsenen führt die Erkrankung zur Th1 Immunantwort mit erhöhter Produktion von IL-12, IL-18 und IFN- γ .

Die Schwangerschaft induziert eine vorübergehende Depression der mütterlichen Zellvermittelten Immunität, um das Abstoßen des Fetus zu verhindern, und die neonatalen Immunzellen haben dabei eine limitierte Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen, was zur erhöhten Anfälligkeit gegen kongenitale Infektionen beiträgt. Die Unterdrückung der mütterlichen Immunantwort gegen die Infektion mit *T. cruzi* und *T. gondii* verhindert hierbei aber auch eine Zerstörung des Gewebes. Da die Immunantwort in infizierten Neugeborenen nicht detailliert erforscht wurde, bestimmten wir die pro-inflammatorischen Zytokine IL-18 und IFN- γ und das gegenregulatorische IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion und kongenitaler Toxoplasmose.

Die Studie wurde mit Seren von kongenital infizierten Neugeborenen durchgeführt, - unter Einschluss klinischer Daten, um diese mit der Konzentration der Zytokine in den Seren zu verbinden. Die Seren wurden aus Neugeborenen ausgesucht, die zwischen den Jahren 1998 und 2003 im „Hospital Ricardo Gutiérrez“ in Buenos Aires, Argentinien behandelt wurden.

Seren von 18 Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, von 19 mit kongenitaler Toxoplasmose und von 20 nicht-infizierten gesunden Neugeborenen wurden eingeschlossen. Einschlusskriterien für kongenitale Chagas-Infektion war: Alter \leq 6 Monaten, positive Serologie der Mutter, direkter Nachweis von *T. cruzi* im Neugeborenen und keine Behandlung der Mutter in der Schwangerschaft. Einschlusskriterien für kongenitale Toxoplasmose waren: Alter \leq 12 Monaten, Nachweis einer kongenitalen Infektion – aufgrund des späteren Auftreten von Symptomen erfolgt bei diesen Kindern erst eine spätere Vorstellung – und das Vorliegen von positiven IgG, IgM, und/oder IgA Tests im ersten Lebensjahr. Für die Kontrollgruppe wurden Neugeborene \leq 6 Monaten frei von Zeichen einer Infektion oder einer anderen Erkrankung ausgesucht, von Müttern, die seropositiv auf *T. cruzi* oder seronegativ auf *T. cruzi* oder *T. gondii* waren.

Kommerzielle ELISA wurden für die Bestimmung von IL-18, IFN- γ und IL-10 gebraucht.

Alter und Geschlecht unterschieden sich nicht zwischen den infizierten Neugeborenen und den Kontrollen. 50% der Kinder mit kongenitaler Chagas-Infektion zeigten Zeichen einer Infektion. Neugeborene mit kongenitaler Chagas-Infektion zeigten signifikant verminderte IFN- γ und IL-18 Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen. Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen von IL-10 bei kongenitaler Chagas-Infektion signifikant im Vergleich zu den

5 Zusammenfassung

Kontrollen erhöht. Die Konzentrationen der Zytokine in den Kontrollgruppen unterschieden sich nicht von Neugeborenen deren Mütter seronegativ/seropositiv auf *T. cruzi* in der Schwangerschaft waren. Wir beobachteten keine Unterschiede in den Konzentrationen der Zytokine vor und nach Behandlung. Ein umgekehrtes Verhältnis wurde ebenfalls bei kongenitaler Toxoplasmose beobachtet. Die Konzentrationen von IFN- γ und IL-18 waren vermindert, IL-10 erhöht. Die Erniedrigung der pro-inflammatorischen Zytokine und die Erhöhung von IL-10 waren in der Chagas Gruppe ausgeprägter im Vergleich zur Toxoplasmose Gruppe. In der Kontrollgruppe hatten Neugeborene von seronegativen Müttern keine Unterschiede in ihren Zytokinkonzentrationen zu nicht-infizierten Neugeborenen von *T. cruzi* positiven Müttern. Wir sahen eine starke Korrelation zwischen IL-18 und IFN- γ für die kongenitale Chagas-Infektion und zwischen IFN- γ und IL-10 bei kongenitaler Toxoplasmose. In Müttern von Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion wurde bereits über eine verminderte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und *T. cruzi*-spezifischer Suppression IFN- γ vermittelter Immunantwort berichtet.

Die mütterliche *T. cruzi* Infektion beeinflusst die Immunantwort des Neugeborenen pro- und anti-inflammatorisch durch Zirkulation von Antikörpern von der Mutter auf den Fetus.

IL-10 wurde bis dato in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion oder kongenitaler Toxoplasmose nicht quantifiziert. Der beobachtete Anstieg mag durch eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen bedingt sein und auf diesem Wege den Rückgang in der Sekretion der Th1 Zytokine verursachen. Es gibt mehrere Erklärungen für diesen Shift: 1. da die Th1 Immunantwort auf die *T. gondii* und *T. cruzi* Infektion potentiell ein Risiko für den Wirt darstellt, könnte die vermehrte IL-10 Produktion ein Weg sein diese zerstörende Immunpathologie zu umgehen; 2. dieser Shift könnte vom Parasiten selbst verursacht sein, um die Th1 Immunantwort zu umgehen; 3. das Immunsystem wird in der Schwangerschaft zur Toleranz modelliert, um somit den Feten vor diesem selbst zu schützen. Diese Mechanismen wirken wohl nach Geburt zunächst bei dem Neugeborenen durch die vorangehende plazentare Modulation weiter.

Einen signifikanten Unterschied in der Zytokinproduktion vor- und nach Behandlung konnten wir nicht nachweisen. Die Werte von pro- und gegenregulatorischen Zytokinen korrelierten aber gegenseitig in unseren Ergebnissen.

Zusammenfassend zeigte die Analyse von kongenital mit *T. cruzi* oder *T. gondii* infizierten Neugeborenen eine geringere Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine mit einer Erhöhung von IL-10. Dies zeigt sich übereinstimmend mit der gesichteten Literatur. Weitere Studien sollten die dahinter liegenden Mechanismen weiter erkunden und so zu einer verbesserten Kontrolle und Behandlung dieser Erkrankungen beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al.** Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 2001;17(1):99-107.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL.** *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 1996;84(2):231-44.
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM.** The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (T-reg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148(1):32-46.
- Alexander J, Scharton-Kersten TM, Yap G, Roberts CW, Liew FY, Sher A.** Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997;352(1359):1355-9.
- Altcheh J, Freilij H.** Toxoplasmosis. En: Meneghello. Tratado de Pediatría Meneghello. 5.^a ed. Buenos Aires: Panamericana; 1997. p. 1077-980.
- Altcheh J, Biancardi M, Lapena A, Ballering G, Freilij H.** [Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:41-5.
- Altcheh J, Diaz NS, Pepe CM, Martin V, Nigro M, Freilij H, et al.** Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56(2):161-5.
- Alvarado-Esquivel C, Sethi S, Janitschke K, Hahn H, Liesenfeld O.** Comparison of two commercially available avidity tests for toxoplasma-specific IgG antibodies. *Arch Med Res* 2002;33(6):520-3.
- Antunez MI, Cardoni RL.** IL-12 and IFN- γ production and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 2000;71(2):103-9.

6 Literaturverzeichnis

- Antunez MI, Cardoni RL.** Early IFN- γ production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 2001;79(3):189-96.
- Antunez MI, Cardoni RL.** *Trypanosoma cruzi*: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection. *Exp Parasitol* 2004;106(3-4):85-94.
- Araujo Z, Heremans H, Stordeur P, Wissing M, Goldman M, Castes M, et al.** IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 gene expression in BCG-Leishmania vaccination of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Vaccine* 2000;18(17):1822-9.
- Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al.** Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 2007;12:2797-806.
- Arcavi M, Orfus G, Griemberg G.** Incidence of Chagas infection in pregnant women and newborn infants in a non-endemic area. *Medicina (B Aires)* 1993;53(3):217-22.
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al.** Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993;31(9):2421-6.
- Azogue E, La Fuente C, Darras C.** Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;79(2):176-80.
- Azogue E, Darras C.** Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;24(2):105-9.
- Belkaid Y, Rouse BT.** Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005;6(4):353-60.
- Benjamini Y.** Opening the box of a boxplot. *Am Stat* 1988;42(4):257-262.

6 Literaturverzeichnis

- Bern C, Martin CL, Gilman RH.** Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011;75:19-47.
- Billeter E.** Grundlagen der Erforschenden Statistik. Statistische Testtheorie. Wien-New York: Springer Verlag; 1972.
- Billot C, Torrido F, Carlier Y.** Estudio de costo/beneficio de un programma de control de enfermedad de Chagas congénita en Bolivia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005;38(2):108-133.
- Bittencourt AL.** American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: *Parasitic infections of the newborn.* Oxford: Oxford Medical Publications; 1988. p. 62-86.
- Bittencourt AL.** [Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992;34(5):403-8.
- Blanco SB, Segura EL, Gurtler RE.** [Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina]. *Medicina (B Aires)* 1999;59 Suppl 2:138-42.
- Blejer JL, Saguier MC, Salamone HJ.** Antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Buenos Aires, Argentina. *Int J Infect Dis* 2001;5(2):89-93.
- Brener Z.** Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 1973;27:347-82.
- Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V, Fernandes O.** Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (B Aires)* 1999;59 Suppl 2:176-8.
- Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, et al.** IFN- γ and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Immunol* 2005;174(3):1738-45.

6 Literaturverzeichnis

- Burchett SK, Corey L, Mohan KM, Westall J, Ashley R, Wilson CB.** Diminished IFN- γ and lymphocyte proliferation in neonatal and postpartum primary *herpes simplex virus* infection. *J Infect Dis* 1992;165(5):813-8.
- Cai G, Kastelein R, Hunter CA.** Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2000;68(12):6932-8.
- Canals M, Cattan APE.** [Dynamics of Chagas infection transmission in Chile: model and simulation]. *Rev Med Chil* 1992;120(12):1359-65.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS.** Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by IFN- γ and IL-10: role of NK cells. *Infect Immun* 1996;64(1):128-34.
- Cardoni RL, Garcia MM, De Rissio AM.** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2004;90(1):65-72.
- Carlier Y, Rivera M, Truyens C, Goldman M, Lambert P, Flament J, et al.** Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1987:2496-2501.
- Carlier Y, Torrico F.** Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:105-7.
- Carral L, Kaufer F, Durlach R, Freuler C, Olejnik P, Nadal M, et al.** [Multicenter study on the prevention of congenital toxoplasmosis in Buenos Aires]. *Medicina (B Aires)* 2008;68(6):417-22.
- Chomarot P, Risoan MC, Banchereau J, Miossec P.** IFN- γ inhibits IL-10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993;177(2):523-7.
- Clark R, Kupper T.** Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005;125(4):629-37.

6 Literaturverzeichnis

- Cuna WR, Choque AG, Passera R, Rodriguez C.** Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J Parasitol* 2009; 95(4): 891-4
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G.** Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178(3):1041-8.
- D'Avila HO, Revelli SS, Didoli G, Bernabo J, Wietzerbin J, Falcoff E, et al.** Protection of young rats from acute *Trypanosoma cruzi* infection by IFN- γ given to their mothers during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54(6):660-4.
- D'Avila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvao LM.** Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(1):100-5.
- Dauby N, Alonso-Vega C, Suarez E, Flores A, Hermann E, Córdova M, et al.** Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 22;3(12):e571.
- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PRZ, Silva Gomes JA, Sathler-Avelar R, et al.** Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(5): e992.
- de Jager W, Bourcier K, Prakken BJ, Seyfert-Margolis V.** Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol* 2009; 28;10:52.
- Denkers EY, Butcher BA.** Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol* 2005;21(1):35-41.
- Di Carlo P, Casuccio A, La Chiusa S, Mazzola A, Pampinella D, Romano A, et al.** Diagnosis of congenital toxoplasmosis: pre- and post-natal evaluation in Sicilian (Italy) epidemiological area. Preliminary data. *Parassitologia* 2007;49(1-2):39-41.

6 Literaturverzeichnis

- Didoli GL, D'avila HO, Feldman S, di Masso R, Revelli SS, Bottasso OA.** Protected *Trypanosoma cruzi* infection in rats born to mothers receiving IFN- γ during gestation is associated with a decreased intramacrophage parasite growth and preferential synthesis of specific IgG2b antibodies. *Int J Immunopharmacol* 2000;22(1):45-55.
- dos Santos RR, Laus JL, Mengel JO, Savino W.** Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti heart autoreactivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1990; 85(3): 367-369.
- dos Santos PV, Roff  E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, et al.** Prevalence of CD8(+) alpha beta T-cells in *Trypanosoma cruzi* elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 2001;3(12):971-84.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al.** Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 April; 3(4): e419.
- Durlach R, Kaufer L, Carral L, Freuler C, Ceriotto M, Rodriguez M, et al.** [Argentine Consensus of Congenital Toxoplasmosis]. *Medicina (BsAs)* 2008; 68: 75-87.
- Enwonwu CO, Phillips RS, Savage KO.** Inflammatory cytokine profile and circulating cortisol levels in malnourished children with necrotizing ulcerative gingivitis. *Eur Cytokine Netw* 2005;16(3):240-8.
- Fatoohi AF, Cozon GJ, Wallon M, Kahi S, Gay-Andrieu F, Greenland T, et al.** Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22(3):181-4.
- Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran JY, et al.** Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol* 1996;18(10):483-90.

6 Literaturverzeichnis

- Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al.** The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol* 2010;40(4):1062-72
- Freilij H, Müller L, González-Cappa S.** Direct micro method for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1983;18(2):327-330.
- Freilij H, J. Storino, R.** Chagas congénito. In: Storino, editor. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: CV Mosby Co.-Doyma; 1994. p. 267–278.
- Freilij H, Altcheh J.** Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 1995;21(3):551-5.
- Freilij H, Altcheh J, Muchnik G.** Perinatal human immunodeficiency virus infection and congenital Chagas' disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14(2):161-2.
- Friedman S, Ford-Jones LE, Toi A, Ryan G, Blaser S, Chitayat D.** Congenital toxoplasmosis: prenatal diagnosis, treatment and postnatal outcome. *Prenat Diagn* 1999;19(4):330-3.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A.** IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol* 1992;148(6):1792-6.
- Geis K, Dietl J.** Die Rolle der Zytokine an der fetomaternalen Grenze. *Zentralbl Gynäk* 2002;123:609-618.
- Gómes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E.** Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(2):205-10.
- Gross U, Montag-Lessing T.** Toxoplasmose in der Schwangerschaft: "IgM did more harm than good". *Hyg Mikrobiol* 1998;2: 25-27
- Groß U, Roos T, Friese K.** Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dt Ärztebl* 2001; 98:3293–3300

6 Literaturverzeichnis

Groß U. Prävalenz und Public-Health-Aspekte der Toxoplasmose. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2004, 47:692-697.

Guedes PM, Veloso VM, Afonso LC, Caliani MV, Carneiro CM, Diniz LF, et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α and low IL-10 production during the acute infection phase. Vet Immunol Immunopathol 2009.

Guleria I, Sayegh MH. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. J Immunol 2007;178(6):3345-51.

Gürtler R, Segura E, Cohen J. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. Emerg Infect Dis 2003;9(1):29-32.

Härtel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. Clin Exp Immunol 2005;142(3):446-53.

Hatcher FM, Kuhn RE. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural killer cells. Science 1982; 15;218(4569):295-6.

Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Even J, Rodriguez P, Berthe A, et al. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. Blood 2002;100(6):2153-8.

Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, Torrico F, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- γ in response to parasite antigens. J Infect Dis 2004;189(7):1274-81.

Hohlfeld P, Forestier F, Marion S, Thulliez P, Marcon P, Daffos F. *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy: T lymphocyte subpopulations in mothers and fetuses. Pediatr Infect Dis J 1990;9(12):878-81.

6 Literaturverzeichnis

- Hoffmann F, Albert MH, Arenz S, Bidlingmaier C, Berkowicz N, Sedlaczek S, et al.** Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults. *Eur Cytokine Netw* 2005;16(4):283-8.
- Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS.** Production of IFN- γ by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by IL-10, IL-12 and TNF- α . *Infect Immun* 1994;62(7):2818-24.
- Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al.** *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol* 2003;133(3):414-21.
- Janeway CA, Travers P, Walport M et al.** *Immunologie* 2009.7 Auflage. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al.** Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007;204(2):273-83.
- Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH.** Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196(2):255-60.
- Kahi S, Cozon GJ, Pinon JM, Greenland T, Wallon M, Al Kurdi M, et al.** A switch towards Th2 during serological rebound in children with congenital toxoplasmosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117(3):524-8.
- Kandelaki ET, Nemsadze KP, Chkhaidze IG, Kherkheulidze MN, Kamkamidze GK.** [IFN- γ during respiratory-syncytial induced obstructive respiratory syndrome in infection in children under one year of age]. *Georgian Med News* 2005(129):69-73.
- Kotner J, Tarleton R.** Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 2007;75(2):861-9.

6 Literaturverzeichnis

- Kuhn L, Coutsooudis A, Moodley D, Mngqundaniso N, Trabattoni D, Shearer GM, et al.** IFN- γ and IL-10 production among *HIV*-1-infected and uninfected infants of *HIV*-1-infected mothers. *Pediatr Res* 2001;50(3):412-6.
- Kuhn L, Meddows-Taylor S, Gray G, Tiemessen C.** *Human immunodeficiency virus (HIV)*-specific cellular immune responses in newborns exposed to *HIV* in utero. *Clin Infect Dis* 2002;34(2):267-76.
- Kumar S, Tarleton RL.** Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 2001;166(7):4596-603.
- La Pine TR, Joyner JL, Augustine NH, Kwak SD, Hill HR.** Defective production of IL-18 and IL-12 by cord blood mononuclear cells influences the T helper-1 IFN- γ response to group *B-Streptococci*. *Pediatr Res* 2003;54(2):276-81.
- Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH.** [Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection]. *Rev Argent Microbiol* 1996;28(2):99-109.
- Lettesjö H, Hansson T, Bergqvist A, Grönlund J, Dannaeus A.** Enhanced IL-18 levels in the peripheral blood of children with coeliac disease. *Clin Exp Immun* 2005; 139:138–143
- Levy O.** Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):379-90.
- Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, et al.** False-positive results in Immunglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing : the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol* 1997 ;35 :174-178
- Lorca HM, Bahamonde M, García A, Tassara R, E EU, Contreras M, et al.** Infección materna y transmisión transplacentaria del *Trypanosoma cruzi* en Chile. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(2):46-48.
- López-Antuano F, Rangel-Flores H, Ramos C.** Diagnosis of Chagas disease. *Rev Latinoam Microbiol* 2000;42:121-129.

6 Literaturverzeichnis

- Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, et al.** Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect* 2008;10(14-15):1558-66.
- Malaguarnera L, Pignatelli S, Simporte J, Malaguarnera M, Musumeci S.** Plasma levels of interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18) and transforming growth factor beta (TGF- β) in *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw* 2002;13(4):425-30.
- Marinho CR, Nunez-Apaza LN, Martins-Santos R, Bastos KR, Bombeiro AL, Bucci DZ, et al.** IFN- γ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand J Immunol* 2007;66(2-3):297-308.
- Meng X, Sawamura D, Tamai K, Hanada K, Ishida H, Hashimoto I.** Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating IL-10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. *J Clin Invest* 1998;101(6):1462-7.
- Meyer Zum Buschenfelde C, Cramer S, Trumpfheller C, Fleischer B, Frosch S.** *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with IFN- γ production. *Clin Exp Immunol* 1997;110(3):378-85.
- Meyer zum Buschenfelde C, Cramer S, Fleischer B, Frosch S.** Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice does not necessarily correlate with production of IFN- γ in vivo. *Med Microbiol Immunol* 1998;187(2):107-13.
- Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, et al.** IL-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(10):2549-56.
- Mjihdi A, Truyens C, Detournay O, Carlier Y.** Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2004;107(1-2):58-64.

6 Literaturverzeichnis

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425):1965-76.

Morato MJ, Colley DG, Powell MR. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(1):123-5.

Morein B, Abusugra I, Blomqvist G. Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87(3-4):207-13.

Moscatelli G, Altchek J, Biancardi M, Lapeña A, Ballering G, Freilij H. Toxoplasmosis aguda: datos clínicos y de laboratorio en 11 pacientes. *An Pediatr (Barc)* 2006; 65(6):551-5

Moya P, Basso B, Moretti E. [Congenital Chagas disease in Cordoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:33-40.

Moyer NP, Hudson JD, Hausler WJ, Jr. Evaluation of MUREX SUDS Toxo test. *J Clin Microbiol* 1987;25(11):2049-53.

Müller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, et al. IL-12-independent IFN- γ production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol* 2001;167(6):3346-53.

Nathan CF, Tsunawaki S. Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase. *Ciba Found Symp* 1986;118:211-30.

Nigro G, Piazzè J, Paesano R, Mango T, Provvedi S, Capuano O, et al. Low levels of natural killer cells in pregnant women transmitting *Toxoplasma gondii*. *Prenat Diagn* 1999;19(5):401-4.

Oelemann WM, Teixeira MD, Verissimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, et al. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2423-7.

6 Literaturverzeichnis

- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori, et al.** Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995;2;378(6552):88-91
- Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, Gascon J.** Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 Aug;8(8):945-56.
- Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso OA, Revelli SS.** Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 2001;87(7):539-47.
- Pifano F.** Parasitological diagnosis of Chagas' disease in the chronic phase; comparative study between the large drop test, xenodiagnosis, hemoculture and experimental inoculations in sensitive animals. *Gac Med Caracas* 1954;25(11):629-37.
- Pinto Dias J, Silveira AC, Schofield CJ.** The impact of Chagas disease control in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(5):603-612.
- Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K.** Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 2003;252:92-8; Discussion 98-105, 106-14.
- Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Papagianni B, Moira E, Sarandakou A, et al.** Age-related differentiations of Th1/Th2 cytokines in newborn infants. *Mediators Inflamm* 2004;13(2):89-92.
- Ragupathy R.** Th1 type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol today* 1997;18:478-482.
- Ragupathy R.** Pregnancy: Success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001;13:219-227.
- Raymond J, Poissonier M, Thulliez P, Forestier F, Daffos F, Lebon P.** Presence of IFN- γ in human acute and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1990:1434-7.

6 Literaturverzeichnis

- Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O.** Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 1999;118(2):271-7.
- Reyes MB, Lorca M, Munoz P, Frasch AC.** Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(7):2846-50.
- Romagnani S.** Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006;36(11):1357-66.
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK.** IL-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
- Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, et al.** NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2005;175(2):899-908.
- Rottenberg M, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Orn A.** Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 1988;28(5):573-82.
- Russomando G, Almiron M, Candia N, Franco L, Sanchez Z, de Guillen I.** [Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:49-54.
- Sachs L.** Angewandte Statistik. In: Angewandte Statistik. 11 ed. Kiel: Springer-Verlag GmbH; 2004. p. 383-394.
- Sacks G, Sargent I, Redman C.** An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999;20(3):114-8.
- Saeftel M, Fleischer B, Hoerauf A.** Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2001;69(4):2252-9.

6 Literaturverzeichnis

- Sáfadi MA, Berezin EN, Farhat CK, Carvalho ES.** Clinical presentation and follow up of children with congenital toxoplasmosis in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003;7(5):325-31.
- Samudio M, Montenegro-James S, Cabral M, Martinez J, Rojas de Arias A, James MA.** Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(1):119-21.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, et al.** Benzimidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol* 2006;64(5):554-63.
- Schnapp AR, Eickhoff CS, Scharfstein J, Hoft DF.** Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 2002;4(8):805-13.
- Schofield CJ, Dias JC.** The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 1999;42:1-27.
- Shi M, Pan W, Tabel H.** Experimental African trypanosomiasis: IFN- γ mediates early mortality. *Eur J Immunol* 2003;33(1):108-18.
- Silvestre R, Cordeiro-Da-Silva A, Santarem N, Vergnes B, Sereno D, Ouaiissi A.** SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN- γ /IL-10 pattern that correlates with protection. *J Immunol* 2007;179(5):3161-70.
- Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R.** Modulation of chagasic cardiomyopathy by IL-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol* 2001;159(2):703-9.
- Solari A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, et al.** Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(4):515-9.

6 Literaturverzeichnis

Speer PS, Gahr M, et al. Pädiatrie 2009.2 Auflage. Springer Berlin Heidelberg.

Streiger M, Fabbro D, Barco Md, Beltramino R, Bovero N. [Congenital Chagas' disease in the city of Santa Fé: Diagnosis and treatment]. *Medicina (B Aires)* 1995;55(2):125-132.

Strittmatter HJ, Blecken SR. [Secretion and regulation of cytokines during pregnancy and gestosis]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2007;211(2):69-75.

Suárez E, Alonso-Vega C, Torrico F, Cordova M. [Integral treatment of congenital Chagas disease: the Bolivian experience]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:21-3.

Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, et al. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000;164(10):5375-82.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001; 1;31(5-6):550-4

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 2002;18(6):262-5.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000 November; 30(12-13): 1217–1258

Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kien T. Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parassitologia* 1997;39(4):279-83.

Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991;146(10):3626-32.

6 Literaturverzeichnis

- Torricon F, Alonso-Vega C, Suárez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, et al.** Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70(2):201-9.
- Torricon F, Castro M, Solano M, Rodriguez P, Torrico MC, Truyens C, et al.** [Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnancy development and in the newborn infant]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:73-6.
- Truyens C, Hermann E, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Vekemans J, Torrico F, et al.** [Immune responses of non-infected neonates of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:96-100.
- Tsutsumi H, Matsuda K, Sone S, Takeuchi R, Chiba S.** Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;106(3):442-6.
- Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA, Orn A.** Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived IFN- γ display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 2000;121(3):499-505.
- Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, et al.** Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2000;68(9):5430-4.
- Velarde CN.** [Chagas disease in Peru: congenital transmission]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38 Suppl 2:55-7.
- Velilla PA, Rugeles MT, Chougnnet CA.** Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* 2006;121(3):251-9.
- Vissoci-Reiche E, Morimoto H, Farias GN, Hisatsugo K, Gómez AF, Rodrigues G, et al.** Prevalencia de tripanossomíase americana, rubiola, hepatite B, hepatite C, e da infeccao pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermedio de testes sorológicos,

6 Literaturverzeichnis

em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitario Regional Norte do Paraná. Rev Soc Bras Med Trop 2000;33(6):519-527.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. Scand J Immunol 2008;68(5):516-25.

Vossenkamper A, Struck D, Alvarado-Esquivel C, Went T, Takeda K, Akira S, et al. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. Eur J Immunol 2004;34(11):3197-207.

Vutova K, Peicheva Z, Popova A, Markova V, Mincheva N, Todorov T. Congenital toxoplasmosis: eye manifestations in infants and children. Ann Trop Paediatr 2002;22:213-8.

Ward LS, Guariento ME, Gilberto A, Fernandes GA, Maciel RMB. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(3):285-289.

Weinke T. Krankheit und Sozialstruktur: Untersuchungen über mögliche Zusammenhänge anhand einer epidemiologisch-klinischen Studie in einem ländlichen Bezirk Boliviens: Inaugural Dissertation (Freie Universität Berlin); 1983.

WHO. Control of Chagas disease. Global health histories seminars: Chagas disease. 2002
<http://apps.who.int/tdr/svc/news-events/events/tdr/chagas-disease>

Wilson CB, Remington JS. Toxoplasmosis. In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Edited by Feigin RD, Cherry JD. 3 edn. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1992: 2057-2069.

Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. Cell Mol Immunol 2007;4(4):269-75.

6 Literaturverzeichnis

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production. *J Immunol* 1998;161(7):3400-7.

Zenclussen AC. CD4(+) CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol* 2005;65(2):101-10.

Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28(1):31-9.

7 Abkürzungen

7. Abkürzungen

±	Standardabweichung
>	größer
≤	kleiner/gleich
(+)/(-)	positiv/negativ
χ^2	Chi - Quadrat
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
CD-4+	CD-4+ T-Zelle
CD-8+	CD-8+ T-Zelle
DC	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
HIV	Humaner Immunodefizienz Virus
HSV	Herpes simplex virus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IGIF	IFN- γ - induzierender Faktor
IgM	Immunglobulin M
IHA	Indirekte Hämagglutimation
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1- β (beta)
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-15	Interleukin 15
IL-17	Interleukin 17
IL-18	Interleukin 18
IFN- γ	Interferon- γ (gamma)
kDa	Kilo Dalton

7 Abkürzungen

LPS-PHA	Lipopolysaccharide-plus-phytohemagglutinin
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK	Natural killer cell (Natürliche Killerzelle)
NO	Nitric oxide (Stickstoffoxid)
n.s.	nicht signifikant
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
RDS	Respiratory distress syndrome
rpm	rounds per minute
<i>RSV</i>	<i>Respiratory syncytial virus</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. congolese</i>	<i>Trypanosoma congolese</i>
Th17	Th 17 Zellen
TGF- α	Transforming growth factor- α (alpha)
TGF- β	Transforming growth factor- β (beta)
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Factor- α (alpha)
TNF- β	Tumor Nekrose Factor- β (beta)
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
T-reg	T regulatory cells (T regulatorische Zellen)
vs.	versus
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

8 Abbildungen

8. Abbildungen

- Abbildung 1; Seite 1:** WHO Technical Report Series 811 Geneva; 1996
- Abbildung 2; Seite 2:** *T. cruzi* (Life cycle) – aus Centers of Disease Control and Prevention, 2011(<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)
(Mit freundlicher Genehmigung)
- Abbildung 3; Seite 2:** *Triatoma infestans* – aus Bastien J W; Chagas' Disease in the Americas; The University of Utah Press; 1998
- Abbildung 4; Seite 7:** T-Zell vermittelte Immunität der *T. Cruzi* Infektion (Eigenes Schema)
- Abbildung 5; Seite 19:** Organigramm der Ein- und Ausschlusskriterien und diagnostischen Vorgehen bei Patienten mit kongenitaler Chagas oder Toxoplasmose und Kontrollen
- Abbildung 6; Seite 31:** IgG kongenitale Chagas ELISA Follow-up
- Abbildung 7; Seite 32:** IgG kongenitale Chagas HA Follow-up
- Abbildung 8; Seite 33:** IgG kongenitale Toxoplasmose ELISA Follow-up
- Abbildung 9; Seite 34:** IgG kongenitale Toxoplasmose HA Follow-up
- Abbildung 10; Seite 37:** Serumkonzentrationen von IL-18 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen
- Abbildung 11; Seite 38:** Serumkonzentrationen von IFN- γ in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen
- Abbildung 12; Seite 39:** Serumkonzentrationen von IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas-Infektion, kongenitaler Toxoplasmose und Kontrollen
- Abbildung 13; Seite 40:** Korrelation (Scatterplot) von IL-18 versus IFN- γ für kongenitale Chagas
- Abbildung 14; Seite 41:** Korrelation (Scatterplot) von IFN- γ versus IL-10 für kongenitale Chagas
- Abbildung 15; Seite 42:** Korrelation (Scatterplot) von IL-18 versus IFN- γ für kongenitale Toxoplasmose
- Abbildung 16; Seite 42:** Korrelation (Scatterplot) von IFN- γ versus IL-10 für kongenitale Toxoplasmose

9 Lebenslauf

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichungen

A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. Shubar HM, Patino Mayer J, Hopfenmüller W, Liesenfeld O. J Antimicrob Chemother. 2008 May;61(5):1110-9

Laparoscopic Approach to Ovarian Mass in Children and Adolescents: Already a Standard in Therapy. Patino Mayer J, Bettolli M, Kolberg-Schwerdt A, Lempe, M, Schlesinger F, Hayek I, Schaarschmidt K; J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2009 Apr;19: 111-115

Congenital infections with *Trypanosoma cruzi* or *Toxoplasma gondii* are associated with decreased serum concentrations of interferon- γ and interleukin-18 but increased concentrations of interleukin-10. Patino Mayer J, Biancardi M, Altcheh J, Freilij H, Weinke T, Liesenfeld O. Ann Trop Med Parasitol. 2010 Sep;104(6):485-92

Fallbericht: L1-Cam assoziierter Hydrocephalus (CRASH): pränatale und postnatale Befunde bei einem Säugling mit einem 8-jährigen Bruder mit gleichem Syndrom. Patino Mayer J, Harps E, Mansouri G, Chaui R, Schaarschmidt K, Schweigerer L. Medical Science GMS Publishing House; 2011. Doc11ndgkjPO-12

Der perityphlitische Abszess: Operativ versus konservativ. Patino Mayer J, Jaeschke U, Schaarschmidt K. Pädiatrische Praxis 2011; 77; 465-477

10 Danksagung

10. Danksagung

Ich danke aufrichtig meinen Referenten und Lektoren Prof. Dr. Oliver Liesenfeld und Prof. Dr. Weinke, deren Anleitung, Geduld und Unterstützung mich von Anfang bis Ende in diesem Projekt unterstützt haben. Weiterhin schulde ich meinen Dank den Mitgliedern des Labors für Kongenitale Erkrankungen des “Hospital Ricardo Gutiérrez” in Buenos Aires, speziell Hector Freilij, Jaime Altcheh und Miguel Biancardi, für die Hilfe, die Geduld, das Wissen und den persönliche und logistische Unterstützung. Ich danke Professor Dr. Dr. Klaus Schaarschmidt und PD Dr. Georg Schwabe für Ihre guten Ratschläge und Unterstützung. Am Ende nochmal besonderen Dank an meine Ehefrau Carolina und meine Familie.

Erklärung

Ich, Jan Patiño Mayer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle der pro- und anti- inflammatorischen Zytokine IL-18, IFN- γ und IL-10 in Neugeborenen mit kongenitaler Chagas Krankheit“ selbst verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 10.10.2012