

Aus dem Lehrstuhl "Spezielle Zoologie"
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

eingereicht über das Institut für
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der freien Universität Berlin

**AUSWIRKUNGEN VON
VEKTORSPEZIFISCHEN FAKTOREN
AUF DIE TRANSKUTANE INFEKTION
MIT TRYPANOSOMA CRUZI (CHAGAS 1909)
(BZW. DEN INFEKTIONSVERLAUF)
IN DER MAUS
UND DIE INTERAKTION VON
MURINEN LANGERHANSZELLEN
MIT DEM FLAGELLATEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Barbara Heide
Tierärztin aus Düsseldorf

Berlin 1999
Journal-Nr.: 2306

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. A. Schaub

Tag der Promotion: 17.09.1999

"Es ist das Eigne zu bemerken, daß der Mensch sich
mit dem einfachen Erkennbaren nicht begnügt,
sondern auf die verwickelteren Probleme losgeht,
die er vielleicht nie erfassen wird.

Jenes einfache Faßliche ist durchaus anwendbar und nützlich
und kann uns ein ganzes Leben durch beschäftigen,
wenn es uns genügt und belebt."

(Goethe, Maximen und Reflexionen)

INHALTSVERZEICHNIS

		<u>Seite</u>
1	EINLEITUNG.....	1
2	ALLGEMEINE LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	<u>Chagaskrankheit</u>	3
2.1.1	Bedeutung und Verbreitung	3
2.1.2	Die Krankheit	4
2.1.3	Therapie und Prophylaxe	6
2.2	<u>Erreger: Trypanosoma cruzi</u>	7
2.2.1	Entwicklungszyklus	9
2.2.2	Taxonomische Zuordnung	11
2.2.3	Verhalten verschiedener Trypanosoma cruzi-Stämme	12
2.3	<u>Vektoren</u>	15
2.3.1	Wanzenarten und Lebensräume	15
2.3.2	Lebenszyklus	18
2.3.3	Nahrungsaufnahme und Kotabgabe	18
2.3.3.1	Nahrungsaufnahme	18
2.3.3.2	Saugakt der Wanze	19
2.3.3.3	Bedeutung des Insektspeichels bei der Blutmahlzeit	20
2.3.3.4	Bedeutung des Insektspeichels für die Übertragung von Parasiten	21
2.3.3.5	Abgabe von Fäzes	22
2.3.4	Infektion der Wanzen und Epidemiologie	24
2.4	<u>Sylvatische Reservoirwirte und Labortiere</u>	26
2.4.1	Wildreservoirire	26
2.4.2	Haustiere als Reservoirire	27
2.4.3	Sonderstellung der Vögel	28
2.4.4	Tiere im Laborversuch	29

TEIL I:	Auswirkungen von vektorspezifischen Faktoren auf die transkutane Übertragung von <i>Trypanosoma cruzi</i> (bzw. den Infektionsverlauf) in der Maus	
3	LITERATURÜBERSICHT ZU TEIL I	32
3.1	<u>Übertragung von <i>Trypanosoma cruzi</i> auf den Säugetierwirt</u>	32
3.1.1	Orale Infektion	32
3.1.2	Infektion über Haut und Schleimhäute	32
3.1.3	Andere Übertragungswege	33
3.2	<u>Verschiedene Infektionsmodi im Experiment</u>	34
3.2.1	Auswirkung wirtstierabhängiger Faktoren	34
3.2.1.1	Auswirkung von Geschlecht und Alter des Wirtes	34
3.2.1.2	Auswirkung von Sekundärinfektionen des Wirtes	34
3.2.2	Auswirkung der Verwendung verschiedener Flagellatenstadien	35
3.2.3	Einfluß verschiedener Infektionsrouten auf den Infektionsverlauf	36
3.2.4	Infektionsdosis als Einflußfaktor	37
3.3	<u>Methoden und Techniken</u>	38
3.3.1	Hämatologische Untersuchung	38
3.3.2	Andere Diagnostikmethoden	39
3.3.3	Isolierung von Flagellaten aus der Wanze, Blut und Kulturmedien	40
4	MATERIAL UND METHODEN (TEIL I)	42
4.1	<u>Erreger: Stämme und Passagierung</u>	42
4.2	<u>Wanzen: Stämme, Aufzucht und Infektion</u>	43
4.3	<u>Symbionten</u>	44
4.4	<u>Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen</u>	44
4.5	<u>Gewinnung von <i>Trypanosoma cruzi</i> aus Wanzenkot und -urin</u>	46
4.6	<u>Differenzierung der <i>Trypanosoma cruzi</i>-Stadien nach Form und Verhalten</u>	47
4.7	<u>Komplement-Lysis-Test</u>	48
4.8	<u>Isolierung von Trypomastigoten aus Wanzenfäzes mit DEAE-Zellulose</u>	49
4.9	<u>Intradermale Infektion</u>	51

4.10	<u>Vermessung der Mundwerkzeuge der Wanzen</u>	52
4.11	<u>Salivarektomie an lebenden Wanzen</u>	53
4.12	<u>Auftropfversuche</u>	54
4.13	<u>Parasitämiebestimmung</u>	56
4.14	<u>Überprüfung resistenter Tiere</u>	57
4.15	<u>Bearbeitung der Datenreihen für die Darstellung der Parasitämiediagramme</u>	58
4.16	<u>Darstellung der Parasitämieverläufe</u>	60
5	ERGEBNISSE (TEIL I)	63
5.1	<u>Experimentelle Trypanosoma cruzi-Infektion bei Mäusen</u>	63
5.1.1	Klinischer Verlauf der Trypanosoma cruzi-Infektion.....	63
5.1.2	Sekundärinfektionen.....	65
5.1.3	Parasitologische Befunde	65
5.1.4	Beobachtungen zu Infektionsverläufen bei verschiedenen Geschlechtern.....	67
5.2	<u>Beobachtungen zu den verwendeten Trypanosomen</u>	75
5.2.1	Entwicklung von Trypanosoma cruzi nach Infektion mit zwei Stämmen und mit Trypomastigoten unterschiedlicher Herkunft	75
5.2.2	Entwicklung von Trypanosoma cruzi in der Maus nach Aufreinigung bzw. ohne Aufreinigung aus Wanzenfäzes	77
5.3	<u>Beobachtungen und Daten zu den verwendeten Vektoren</u>	80
5.3.1	Verhalten der beiden Wanzenarten	80
5.3.2	Stichparameter von den Mundwerkzeugen der Wanzen und von der Maushaut.....	81
5.4	<u>Variation der Erreger-Eintrittspforte in der Haut</u>	84
5.5	<u>Infektionsdosis bei der "natürlichen Infektion" durch den Stichkanal der Wanze</u>	88
5.5.1	Dosisversuche mit Balb/c nu/nu Mäusen	88
5.5.2	Dosisversuche mit C57 Bl/6 Mäusen	95
5.5.3	Präpatenztabelle zu den Dosisversuchen	99
5.6	<u>Beeinflussung der Erregerübertragung durch Begleitfaktoren</u>	101
5.6.1	Einflußfaktor Wanzenkot und -urin	101
5.6.2	Einflußfaktor Symbionten	106
5.6.3	Einflußfaktor Wanzenspeichel	108

6	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE VON TEIL I	117
6.1	<u>"Natürliche Infektion durch den Stichkanal": Ein Modell</u>	117
6.2	<u>Die Maus: Ein geeignetes Tiermodell?</u>	119
6.2.1	Klinik	120
6.2.2	Sekundärinfektionen	122
6.2.3	Geschlecht und Alter der Säugetierwirte	122
6.2.4	Beurteilung der Parasitämiebestimmungs- und -nachweismethoden	123
6.3	<u>Einflüsse des Erregers auf die Infektion</u>	125
6.3.1	Generelle Entwicklung des Erregers in Mäusen	125
6.3.2	Infektionsverläufe nach Infektion mit unterschiedlichen Trypanosoma cruzi-Stämmen	126
6.3.3	Infektionsverläufe nach Verwendung von Flagellaten aus unterschiedlichen Passagierungen	129
6.3.4	Auswirkung verschiedener bzw. unterschiedlich behandelter Flagellatenstadien im Inokulum	131
6.4	<u>Beurteilung der verwendeten Vektoren</u>	133
6.5	<u>Modifikationen der dermalen Infektion</u>	135
6.6	<u>Dosisversuche</u>	136
6.7	<u>Begleitende Faktoren</u>	138
6.7.1	Beeinflussung der Infektion mit Trypanosoma cruzi durch Wanzenfäzes	139
6.7.2	Symbionten als Einflußfaktor	140
6.7.3	Beeinflussung der Infektion durch Wanzenspeichel	141
6.7.4	Ist bei der Chagaskrankheit eine Immunisierung gegen den Überträger möglich?	144
6.8	<u>Standardisierung</u>	144

TEIL II:	Die Interaktion von murinen Langerhanszellen mit <i>Trypanosoma cruzi</i>	
7	LITERATURÜBERSICHT ZU TEIL II	148
7.1	<u>Das Immunsystem der Haut bei der Maus</u>	148
7.2	<u>Histologie und Funktion von Langerhanszellen: Ein kurzer Überblick</u>	150
7.2.1	Herkunft und Histologie	150
7.2.2	Funktion und Wanderung der Langerhanszellen	151
7.3	<u>Bedeutung von Langerhanszellen bei der Infektion mit Leishmanien</u>	153
7.4	<u>Zelluläre Reaktionen an der Eintrittspforte von <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	154
8	MATERIAL UND METHODEN (TEIL II)	155
8.1	<u>In-situ-Infektion der Mausohren</u>	155
8.2	<u>Färbung von Langerhanszellen in uninfizierten und infizierten "Epidermal Sheets"</u>	157
8.3	<u>In-vitro-Infektion von Langerhanszellen mit <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	159
8.3.1	Gewinnung von Langerhanszellen aus der murinen Rückenhaut	160
8.3.2	Prüfung der Zellvitalität mit Trypanblau	162
8.3.3	Inkubation der Einzelzellsuspension mit <i>Trypanosoma cruzi</i>	162
8.3.4	Färbung und Beurteilung der Zellen nach der Inkubation	162
8.4	<u>In-vivo-Infektion von Langerhanszellen mit <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	163
8.4.1	Gewinnung von aus der Haut ausgewanderten Langerhanszellen	164
8.4.2	Färbung der Zellen	164
8.5	<u>Fluoreszenzmikroskopie und Fotografie</u>	166
9	ERGEBNISSE VON TEIL II UND DEREN BESPRECHUNG ..	167
9.1	<u>Langerhanszellen in uninfizierten und infizierten "Epidermal Sheets"</u>	167
9.2	<u>Befall von in-vitro-infizierten Langerhanszellen mit <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	168

9.3	<u>Befall von in-vivo-infizierten Langerhanszellen mit Trypanosoma cruzi</u>	169
9.4	<u>Zusammenfassende Besprechung der Versuche I-III</u>	177
10	ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNG	180
11	ZUSAMMENFASSUNG	181
12	SUMMARY	183
13	LITERATURVERZEICHNIS	185
14	ANHANG	201
14.1	Medien, Färbungen, Rezepte	201
14.2	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen zu Teil II	204

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Barbara Heide, geboren am 01.02.1969, daß ich diese Dissertation auf der Grundlage der im Text angegebenen Hilfen und Hilfsmittel selbständig verfaßt habe und daß diese Arbeit in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden ist.

Lechenich, den 20.05.1999

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. E. Schein** danke ich dafür, daß er die offizielle Betreuung meiner Arbeit übernommen hat.

Herrn **Prof. Dr. Günter Schaub** danke ich für die Überlassung des Themas, der Wanzen und der T. cruzi-Stämme, für die zuverlässige Betreuung (großzügig und mit viel Humor) und dafür, daß er mir schon während meiner Arbeit freistellte, nebenbei in einer Kleintierpraxis zu arbeiten und so einen Einstieg in mein jetziges Berufsleben zu bekommen.

Herrn **Prof. Dr. Falkenberg** von der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum und seiner Arbeitsgruppe (insbesondere Ralf Schröder und Marcus Peters) danke ich für die Überlassung verschiedener Antikörper und die Möglichkeit, einige meiner histologischen Untersuchungen unter Anleitung in ihrem Labor ausführen zu dürfen.

Herrn **Dr. Mossmann** und seiner Arbeitsgruppe vom MPI Freiburg danke ich für die Überlassung von Nackt- und C57/Black 6-Mäusen und auch für verschiedene Antikörper und einen Teil meiner histologischen Ausrüstung.

Frau **Dr. Bacherach-Buhles** und Karin Scholz vom St. Joseph-Krankenhaus in Bochum danke ich für Ihre Unterstützung bei meinen ersten histologischen Gehversuchen.

Dr. Torsten Kleffmann danke ich dafür, daß er bei vielen großen und kleinen Problemen (chemischer, technischer und mathematischer Art) immer für mich da war und mir eine Menge Zeit geopfert hat.

Dr. Jürgen Schmidt danke ich für seine Ideen und Hilfe bei verschiedensten Nachweisverfahren und für viele lange und fruchtbare Gespräche, aus denen eine ganze Reihe meiner Gedankenansätze geboren wurden.

Dr. Christoph Hölscher danke ich für die geduldige Einarbeitung in viele für meine Arbeit grundlegende Techniken (sowohl in Bochum als auch in Freiburg) und für seine Unterstützung in meinem Kampf mit der Histologie, den Antikörpern und den Langerhanszellen.

Dr. Stefan Eichler danke ich für die Bereitstellung der Symbionten für meine Wanzen, für die Literaturrecherchen im Computer und für seine unerschütterliche gute Laune, die auch in den frustrierendsten Momenten fast immer ansteckend war.

Juliane Schuster danke ich vor allem für ihre Mitwirkung und ihren seelischen Beistand in den langen Nächten im Cruzi-Labor.

Sylvia Eßmann und **Ruth Eckert** danke ich – wie auch dem Rest der Arbeitsgruppe – für Hilfe bei den vielen Kleinigkeiten, die Tag für Tag anfielen.

Stefan Köhler danke ich für die Bereitstellung und Entwicklung des Fotomaterials, die gute Betreuung am Axiophot und für seine erfolgreiche Auseinandersetzung mit einem Wanzenrüssel. ...

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mir mit moralischer und finanzieller Unterstützung alle Schritte meiner Ausbildung bis hin zu dieser Dissertation ermöglicht haben.

Schließlich danke ich **Andreas Waldeck**, der alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit erlebt und erlitten hat, für seinen Beistand am Computer und vor allem dafür, daß er alle meine Abstürze immer wieder geduldig und liebevoll abgefangen (oder sie immerhin ertragen) hat.

Lebenslauf

Geburtsdatum	1.2.1969
Geburtsort	Düsseldorf
Eltern	Prof. Dr. Gerhard Heide, Universitätsprofessor Gerda Heide, Studienrätin
Geschwister	ein Bruder

Ausbildung

1975 - 1988	Bavier-Schule u. Städt. Gymnasium Erkrath
06.1988	Allg. Hochschulreife
10.1988 - 01.1995	Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
01.1995	Approbation als Tierärztin
03.1995 – 10.1995	Studium am Lateinamerika-Institut, FU Berlin
ab 11.1995	Doktorarbeit in der parasitologischen Abteilung der Ruhr-Universität Bochum
12.1995 – 06.1998	Teilzeitassistentin in einer Kleintierpraxis, Herne
ab 06.1996	Betreuende Tierärztin für die Labortiere der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum
10.1997 - 12.1997	Forschungsaufenthalt in der Fundacao Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasilien
ab 07.1998	Tierärztin an der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere Dr. Lagemann, Erftstadt