

Teil I:

**Auswirkungen von vektorspezifischen Faktoren auf
die transkutane Infektion mit *Trypanosoma cruzi*
(bzw. den Infektionsverlauf) in der Maus**

3 LITERATURÜBERSICHT ZU TEIL I

3.1 Übertragung von Trypanosoma cruzi auf den Säugetierwirt

3.1.1 Orale Infektion

Die wahrscheinlich häufigste Übertragungsart des Erregers auf Reservoirwirte und Haustiere ist der orale Weg. Insektivore infizieren sich leicht, indem sie befallene Wanzen fressen (Yaeger 1971), Carnivore beim Fressen eines infizierten Beutetieres (Marsden 1967b). Die Infektion etabliert sich dabei nicht oder kaum über die Maul-, sondern in den Magenschleimhäuten (Hoft et al. 1996). Die Möglichkeit der oralen Infektion besteht für Tiere auch, wenn sie sich den Wanzenkot aus dem Fell lecken, der nach der Blutmahlzeit der Insekten anfällt (Schweigmann et al. 1995).

Für den Menschen besteht die Gefahr der oralen Aufnahme nur bei frisch mit Wanzenkot kontaminierter Nahrung (herabfallende Fäzes von in Wänden und Dach versteckten Wanzen) oder bei Verzehr von rohem Fleisch oder Innereien, sofern die lebensmittelliefernden Tiere mit *T. cruzi* infiziert sind (Die Infektionsrate bei zum Verzehr am Haus gehaltenen Meer-schweinchen kann bis zu 60% betragen (Zeledon und Rabinovich 1981). Eine derartige Infektionsgefahr besteht auch bei dem rituellen Verzehr roher Organe bei einigen Indio-völkern.

3.1.2 Infektion über Haut und Schleimhäute

Ein weiterer, diesmal für den Menschen wichtigerer Weg ist die Infektion über Haut und Schleimhäute. Als Eintrittspforte in die Haut genügt dem Erreger eine kleine Läsion: Nur wenige 100 Flagellaten, die durch Kratzer die Haut penetrieren, können bereits für eine patente Infektion ausreichen (Marsden 1967b). Auch der Stichkanal der Wanze wurde als Eintrittspforte diskutiert (Soares & Marsden 1986).

Nach einem Wanzenstich entwickeln sich beim Menschen Allergien vom Sofort- oder häufiger vom Spättyp. Durch den Speichel der Wanze oder das in den Fäzes vorhandene Histamin wird Juckreiz ausgelöst, der die Wahrscheinlichkeit für den Erreger erhöht, in eine kleine Hautläsion oder den Stichkanal eingekratzt zu werden und so Zugang zum Wirtsorganismus

zu bekommen (Harington 1958). Häufig gelangt kontaminierter Wanzenkot auch durch Juckreiz-bedingtes Einreiben in die Augen- und Mundschleimhäute, die der Erreger leicht passieren kann (Marsden 1967b). Weiter können Erreger in Kontakt mit der menschlichen Haut kommen, wenn eine infizierte Wanze bei einer unwillkürlichen Bewegung nachts im Bett vom Schlafenden zerdrückt wird (Wood 1951).

Aber auch Tiere müssen sich auf dieselbe oder ähnliche Weise infizieren können: Bei überwiegend herbivoren Affenarten (Dunn et al. 1963) sowie bei fruchte-, nektar- oder fischfressenden Fledermäusen (Marinkelle 1982) sind *T. cruzi*-Infektionen genauso nachgewiesen worden wie bei ihren omnivoren oder carnivoren Verwandten. Das Auftreten der Erkrankung ist bei ihnen demnach unabhängig von der Ernährungsweise. Ein Versuch zu dieser Fragestellung, in dem Opossums und infizierte Wanzen über einen bestimmten Zeitraum zusammengelassen wurden, ergab fast genauso viele infizierte Opossums unter denen, die keine Wanzen verspeist hatten, wie unter den anderen. Die Tiere können also nur Wanzenkot eingekratzt oder aus dem eigenen Fell geleckt haben (Schweigmann et al. 1995).

Für die Übertragung über die Haut ist eine feuchte Umgebung oder tropisches Klima besonders günstig, da dort die Fäzes der Wanzen weniger schnell trocknen und der Kot so länger infektiös bleibt.

3.1.3 Andere Übertragungswege

T. cruzi kann auch über Blutkontakte übertragen werden: Zum einen bei der Schlachtung infizierter Tiere, zum anderen über Blutkonserven. Der letztgenannte Weg ist in Südamerika sehr bedeutsam, da gerade unter den ärmeren Bevölkerungsschichten die Blutspende als attraktive Verdienstmöglichkeit angesehen wird. In Argentinien und Brasilien sind 6-20% aller Blutspender seropositiv für *T. cruzi*, in Bolivien sogar bis zu 63% (TDR 1992). Blut kann zwar mit Gantianviolett desinfiziert werden, dies wurde aber aus Nachlässigkeit oder sogar aus ästhetischen Gründen (!) oft nicht genutzt, da die Haut des betroffenen Patienten nach der Transfusion einige Tage bläulich schimmert (Lienhard 1990). Erst seit wenigen Jahren – nicht zuletzt ausgelöst durch AIDS-Bekämpfungsmaßnahmen – wird in mehreren lateinamerikanischen Ländern verstärkt auf schärfere Kontrollen in den Blutbanken gedrungen und werden gesetzlich festgelegte Kontrollen gefordert (TDR 1992 und 1996).

Diaplazentare Infektionen oder Infektionen über die Muttermilch sind möglich, aber seltener. Bei Hunden als Reservoirwirten könnte dieser Übertragungsweg allerdings eine bedeutende Rolle spielen (s. Kap. 2.4.2, Gürtler et al. 1986).

Weiter wurde von Marsden (1967b) gezeigt, daß auch eine Infektion über die Genitalschleimhaut, z.B. bei der Kopulation, möglich ist.

Bei Hyperinfektionen mit massiven Parasitämien, wie sie z. B. nach Immunsuppression auftreten, können die Erreger sogar über den Urin und seltener den Speichel ausgeschieden werden (Marsden & Hagstrom 1968). Bestimmte Erreger-Wirt-Kombinationen scheinen auch ohne besonders hohen Befall – nur bedingt durch ihren Histotropismus – eine Besiedlung der Harnblase und somit die Ausscheidung von *T. cruzi* über den Urin zu ermöglichen (Bice & Zeledon 1970, Herrera & Urdaneta-Morales 1992).

Eine spezielle, besonders interessante Situation besteht bei einem der Hauptreservoirwirte von *T. cruzi*: In den Analbeuteln infizierter Opossums läuft der gesamte Vermehrungszyklus der Flagellaten ab, der sich sonst in der Wanze abspielt (Petana 1969, Deane et al. 1984b). Es besteht also die Möglichkeit, daß Opossums durch Lecken an Artgenossen oder bei der Geburt *T. cruzi* auf ihre Jungen übertragen, ohne daß dabei ein Vektor benötigt wird.

3.2 Verschiedene Infektionsmodi im Experiment

3.2.1 Auswirkung wirtstierabhängiger Faktoren

Wie in Kap. 2.2.3 erwähnt, verlaufen *T. cruzi*-Infektionen bei verschiedenen Säugetierarten unterschiedlich. Neben der Spezies sind aber auch Geschlecht, Alter und Immunstatus für die Entwicklung der Infektion entscheidend.

3.2.1.1 Auswirkung von Geschlecht und Alter des Wirtes

Bei verschieden geschlechtlichen Wirtstieren entwickeln sich manchmal unterschiedliche Infektionsverläufe. Dabei sind die Männchen häufig schwerer betroffen als die Weibchen (Goble 1952, Bice & Zeledon 1970). Dieses Phänomen wurde u.a. auf die Stoffwechselunterschiede der Geschlechter zurückgeführt, zumal bei keinem die Gonaden von *T. cruzi* befallen

waren (Hauschka 1947). An anderer Stelle wurden gleichartige Verläufe beschrieben (Edgcomb 1973).

Des Weiteren spielt das Alter des Wirtes eine Rolle: Ältere Tiere oder Menschen sind grundsätzlich resistenter als junge (Culbertson & Kessler 1942, Goble 1952, Silva et al. 1987).

3.2.1.2 Auswirkung von Sekundärinfektionen der Wirtstiere

Koinfektionen mit anderen Parasiten oder Erregern scheinen sich nicht auf die *T. cruzi*-Infektion auszuwirken, wenn sie nicht zu massiv sind (Edgcomb 1973). Auffallend ist der Unterschied im Infektionsverlauf bei normal und keimfrei aufgezogenen Tieren, bei letzteren verläuft die Krankheit schwerer (Silva et al. 1987). Labortiere, die nur bestimmte Keime gewohnt sind, können auch zuweilen an ihren Sekundärinfektionen und nicht an der *T. cruzi*-Infektion sterben (Trischmann et al. 1978).

3.2.2 **Auswirkung der Verwendung verschiedener Flagellatenstadien**

Ausschlaggebend für die Art der Infektion ist neben dem *T. cruzi*-Stamm das verwendete Flagellatenstadium:

Blutstadien sind relativ bequem zu gewinnen, und werden demzufolge häufig angewendet. Infektionen mit Flagellaten dieses Stadiums sind im Vergleich zum natürlichen System aber sehr artifiziell (Villalta & Kierszenbaum 1983b, Hoft et al. 1993).

Genauso einfach und verbreitet ist die Verwendung von *Kulturstadien* (Villalta & Kierszenbaum 1987). Wie aber schon in Kap. 2.2.3 erwähnt, verändern diese eventuell im Vergleich zu Blut- und Wanzenstadien desselben *T. cruzi*-Stammes ihre Virulenz, so daß zu anderen Versuchen möglicherweise keine Vergleichbarkeit mehr gegeben ist.

Wanzenstadien zu verwenden kommt dem natürlichen System am nächsten, ist aber durch die Wanzenzucht und die Isolierung der Flagellaten sehr aufwendig. Dennoch wurden mehrere Versuche damit durchgeführt, um eine "natürliche Infektion" nachzuahmen (zusammengefaßt von Marsden 1967b, Okanla et al. 1982). Bei vielen Versuchen wurden die Wanzen allerdings

erst im dritten bis fünften Larvenstadium infiziert und die Flagellaten ca. 30 Tage später "geerntet", so daß sie sich nur relativ kurz im Vektor befanden.

Fast übereinstimmend wird berichtet, daß die Virulenz der Wanzenstadien höher als die von Blutstadien und wesentlich höher als die von Kulturstadien ist (Marsden & Hagstrom 1968, Okanla et al. 1982, Villalta & Kierszenbaum 1987). Dabei zeigen die Infektionen mit Wanzenstadien eine längere Präpatenz (Marsden 1967b, McHardy & Neal 1979, Ramirez & Brener 1986) und manchmal eine höhere Parasitämie (Marsden 1967b) als Infektionen mit Stadien aus anderen Passagierungen. Die Überlebenszeit bei Infektion mit Blutstadien kann enger mit der Infektionsdosis korrelieren als bei Infektion mit Wanzenstadien (McHardy & Neal 1979). Die Parasitämien der mit Kultur- oder Blutstadien bzw. mit Wanzenstadien infizierten Tiere können sich aber auch entsprechen (Villalta & Kierszenbaum 1983b, Lopez et al. 1995).

3.2.3 Einfluß verschiedener Infektionsrouten auf den Infektionsverlauf

Um eine "natürliche Infektion" zu imitieren, wurde zumeist die *Infektion über die Schleimhäute*, also der orale oder der konjunktivale Weg gewählt (z.B. Kirchhoff & Hoft 1990, Hoft et al. 1996). Auf diesen Wegen entwickelten sich immer mildere Infektionsverläufe als bei Injektion dergleichen Inokula z.B. intraperitoneal oder subkutan (Culbertson & Kessler 1942, Deane et al. 1963, Marsden & Hagstrom 1968, Villalta & Kierszenbaum 1983a). Dies ist wahrscheinlich u.a. darin begründet, daß nicht alle Flagellaten des Inokulums die Schleimhäute passieren können, durch eine Injektion aber auf jeden Fall die gesamte Dosis in den Körper gelangt.

Einige Versuche beschäftigten sich mit der möglichen *Infektion über die Haut*, um eine "natürliche Infektion" nachzuahmen: Dias (1932) tropfte auf "unverletzte", frisch geschorene Meer-schweinchenhaut Flagellaten in Wanzenurin auf und infizierte damit einige Tiere. Später wurde jedoch bei ähnlichem Versuchsaufbau festgestellt, daß die intakte Haut von *T. cruzi* nicht passierbar ist. Es reichen jedoch Mikroläsionen aus, damit ausreichend Flagellaten (ca. 100) für eine patente Infektion in den Körper gelangen können (Marsden 1967b).

Soares & Marsden (1986) ließen *Dipetalogaster maximus* an definierten Hautpartien von Mäusen stechen und betropften die Einstichstelle mit infiziertem Wanzenkot. Auch dieser Versuch führte bei einigen Versuchstieren zur Infektion.

Intradermale Injektionen wurden nur vorgenommen, wenn die immunologische Reaktion des Wirtes an der Eintrittspforte von *T. cruzi* untersucht werden sollte und wurden in fast allen Fällen plantar durchgeführt (Deutschländer et al. 1978, Abrahamsohn et al. 1987, Bijovsky & Milder 1988, Monteon 1996).

In bei weitem den meisten Versuchen wurde das Inokulum injiziert, *subkutan* oder *intraperitoneal*, seltener *intravenös*. Die Ergebnisse fielen unterschiedlich aus: Fast in allen vergleichenden Versuchen verlief die Infektion nach s.c.-Injektion deutlich fulminanter, gleichmäßiger und mit weniger Varianz als nach i.p.-Injektion, unabhängig von der infizierten Spezies (Goble 1952, McHardy 1977, Neal & McHardy 1977, McHardy & Neal 1979). Dies könnte in den unterschiedlichen Immunreaktionen begründet sein, die bei den unterschiedlichen Inokulationswegen auftreten (Murfin et al. 1989). Es wurden jedoch auch identische Infektionsverläufe beschrieben (Lopez et al. 1995). Bei Verwendung von sehr hohen Inokulationsdosen wurden nur geringfügige Differenzen in der Überlebenszeit bei s.c.-, i.p.- und i.v.-Injektion festgestellt (Marsden 1967b).

Der Verlauf einer Infektion mit *T. cruzi* kann durch den Infektionsweg demnach stark beeinflusst werden.

3.2.4 Infektionsdosis als Einflußfaktor

Ein weiterer Faktor, der den Infektionsverlauf entscheidend beeinflusst, ist die Infektionsdosis:

Generell läßt sich sagen, daß sich mit steigender Dosis die Präpatenzzeit verkürzt und Morbidität und Mortalität ansteigen (Culbertson & Kessler 1942, Marsden 1967a, Marsden & Hagstrom 1968, Neal & McHardy 1977, Trischmann et al. 1978). Aber auch bei Hyperinfektion mit sehr hohen Dosen setzt die Parasitämie nie vor 8 bis 10 Tagen ein, abhängig vom Vermehrungszyklus des Erregers (s. Kap. 2.2.1, Marsden 1967a, Mshelbwala & Ormerod 1973). Große Inokula erzeugen relativ stabile, homogene Infektionsverläufe, da sie die Immunantwort des Wirtes regelrecht überrollen (Mshelbwala & Ormerod 1973), bei sehr kleinen Dosierungen treten meist große Varianzen innerhalb einer Versuchsgruppe auf (Marsden 1967a). Um auch bei Versuchen mit geringen Dosen noch gute Korrelationen mit wenig Schwankungen zu erzielen, sollte man daher mit einem stark virulenten *T. cruzi*-Stamm

arbeiten (Neal & McHardy 1977). Dadurch können zwar gut auswertbare Ergebnisse erzielt werden, diese Stämme treten jedoch in der Natur seltener auf.

Ebenso bestimmt die Dosis häufig den Verlauf der folgenden Erkrankung der Einzeltiere: Die Arbeit mit hohen Infektionsmengen eignet sich gut für das Studium der akuten Krankheitsphase, während es nach Einsatz geringer Dosen oft zu chronischen Verläufen kommt (Ribeiro dos Santos & Hudson 1981). Dabei kann schon ein einzelner Parasit für eine Infektion ausreichen (Marsden 1967b). Mit so geringer Dosis infizierte Tiere erscheinen manchmal nicht infiziert, sie können aber doch latent erkrankt sein (Marsden 1967a, McHardy & Neal 1979). Eine für eine Spezies oder einen Wirtstamm ermittelte LD₅₀ (bzw. Letaldosis) läßt sich dabei jedoch nicht auf andere Wirte übertragen (Mshelbwala & Ormerod 1973): Die Infektionsdosis kann sogar die Suszeptibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen beeinflussen: Bei unterschiedlich hohen Dosierungen kann sich das Verhältnis der Empfänglichkeit bei zwei Mausstämmen umkehren (Murfin et al. 1989) oder sich auch auf den Histotropismus eines *T. cruzi*-Stammes auswirken (Carreira et al. 1996).

3.3 Methoden und Techniken

3.3.1 Hämatologische Untersuchung

Die am häufigsten angewandte Diagnostikmethode für patente Infektionen ist die mikroskopische Untersuchung des Blutes auf Flagellaten.

Bei weitem die meisten Experimentatoren benutzen die Methode von Brener (1962): 5µl Schwanzblut der zu untersuchenden Maus werden unter ein 22×22 mm großes Deckglas gegeben, so daß eine einfache Schicht roter Blutkörperchen entsteht. Vorher wurde die Gesamtanzahl der mikroskopischen Felder des Deckglases bei 450facher Vergrößerung auf 3.500 geschätzt. Im Frischblutpräparat werden nun 50 oder 100 Gesichtsfelder auf Trypanosomen abgesucht und ihre Konzentration pro 5µl Blut durch Multiplikation der gefundenen Zahl mit 70 bzw. 35 hochgerechnet. Eine weitere Multiplikation mit 200 ergibt dann die Konzentration pro ml Blut. Dieses Prinzip wird vielfach mit kleinen Modifikationen angewendet, manchmal wird von gefärbten Blutaussstrichen anstelle von Frischblutpräparaten ausgegangen. Wenn allerdings nur die Anzahl der Flagellaten pro 100 Gesichtsfeldern ohne die

dazugehörige Umrechnung angegeben wird, werden Ergebnisse dadurch schwerer vergleichbar.

Eine den Volumenanteil betreffend wirklich standardisierbare Methode ist die Zählung im Haemozytometer. Bei niedrigen Flagellatenkonzentrationen liefert diese Methode aufgrund ihrer geringen Sensibilität allerdings ungenauere Ergebnisse als die Zählung nach Brener.

Die Parasitenzählung kann erleichtert werden, indem die Erythrozyten mit 87%igem Ammoniumchlorid bzw. Lock'scher Lösung (Lysepuffer) durch osmotischen Druck zum Platzen gebracht werden. Die Flagellaten bleiben dabei unbeschädigt und sind in dem hämolysierten Blut besser zu sehen (Bice & Zeledon 1970, Trischmann et al. 1978).

Ist die Blutkonzentration der Flagellaten für diese direkten Untersuchungen zu gering, kann – auch bei Felduntersuchungen – eine Anreicherung mittels Hämatokritröhrchen vorgenommen werden: Mit einigen definiert befüllten Röhrchen wird eine Skala angelegt, mit deren Hilfe sich undefiniert eingefüllte Blutvolumina messen lassen. Das zu untersuchende Blut wird zentrifugiert und der Buffy-Coat auf Flagellaten untersucht, deren Anzahl/ml anschließend errechnet werden kann (Arias & Ferro 1988).

3.3.2 Andere Diagnostikmethoden

Liegen subpatente Infektionen vor, können weitere, indirekte Diagnostikmethoden genutzt werden (zusammengefaßt von Marinkelle 1982).

Subinokulation des Patientenblutes in Mäuse: Handelt es sich um einen wenig virulenten Flagellaten, kann eine Infektion manchmal erst nach mehreren Passagen und einer Adaptionphase an den neuen Wirt festgestellt werden.

Hämokultur: Blut des zu untersuchenden Tieres wird in z. B. LIT-Medium inkubiert und diese Kultur nach einigen Tagen bis Wochen auf Flagellaten untersucht. Bei negativem Ergebnis kann eine Subinokulation von Medium in Mäuse versucht werden.

"Mouse-protection-test" : Mäuse, die nach einer Subinokulation keine patente Infektion gezeigt hatten, werden mit einem leicht zugänglichen Laborstamm von *T. cruzi*, für den sie suszeptibel sind, reinfiziert. Da bei einer solchen Wiederholungsinfektion mit dem Parasiten normalerweise keine erneute Parasitämie auftritt, kann an dem folgenden Verlauf auf eine bereits vorhandene oder nicht vorhandene Erstinfektion geschlossen werden.

Immunsuppression: Um eine subpatente Infektionen sichtbar zu machen, kann man das Immunsystem mit Cyclophosphamid oder Kortison schwächen und dadurch eine unterdrückte Infektion intensivieren.

Xenodiagnose: Mehrere für *T. cruzi* empfängliche Raubwanzen werden am zu untersuchenden Patienten gefüttert, ca. 30 Tage später werden ihre Fäzes und ihr Rektum auf Flagellaten untersucht. Die Methode ist an sich sensibel, hat aber noch höhere Erfolgsquoten, wenn die Wanzenfütterung an mehreren verschiedenen Tagen wiederholt wird. Sie wird von Zeledon et al. (1970) als die sicherste indirekte Nachweismethode – mit einfachen Mitteln – beurteilt. Auch bei Marsden et al. (1976) wird die Xenodiagnose der Hämokultur oder Subinokulation als Nachweis vorgezogen.

Modernere und noch genauere Methoden sind die *serologische Untersuchung* mit *T. cruzi*-Antikörpern und die *PCR*. Beide sind aber sehr aufwendig und teuer und nicht bei jeder Fragestellung erforderlich.

3.3.3 Isolierung von Flagellaten aus Wanze, Blut und Kulturmedien

Bei der Arbeit mit metazyklischen Trypomastigoten wurden verschiedene Grade der Aufreinigung gewählt:

Infizierter Wanzenkot und/oder -urin wurde ohne Rücksicht auf weitere Inhaltsstoffe direkt in Mäuse inokuliert (Dias 1932, Bice & Zeledon 1970, Kirchhoff & Hoft 1990, Hoft et al. 1993).

Kot und Urin wurden gesammelt oder Reakta mazeriert und die Flagellaten durch bloße Verdünnung oder Waschen mit Pufferlösung oder Kulturmedium aufgereinigt (Petana 1969,

Mshelbwala & Ormerod 1973, McHardy & Neal 1979, Soares & Marsden 1986, Magalhaes 1987, Lopez et al. 1995).

In einigen Versuchen wurden die Abdomen der Wanzen abgeschnitten und mazeriert und *T. cruzi* aufgereinigt (Neal & McHardy 1977, Villalta & Kierszenbaum 1983a).

Viele Experimentatoren trennten infektiöse von nicht infektiösen Formen über eine Säule mit DEAE-Cellulose. Neben geringfügigen Unterschieden zu der im Materialteil beschriebenen Methode wurden die mazerierten Rehta oder ganze zerkleinerte Abdomen (Villalta & Kierszenbaum 1987) oder nur Fäzes (Okanla et al. 1982, Schaub 1991) auf die Säule gegeben.