

Neue Möglichkeiten zum Nachweis einer Chagas-Krankheit mittels künstlicher Xenodiagnose

Christiane Merks, H. Werner

Robert Koch-Institut, Fachgebiet Klin. Parasitologie, Berlin

Zusammenfassung:

Bei Verdacht auf eine Chagas-Erkrankung ist neben serologischen Nachweisverfahren die Xenodiagnose für den Parasitennachweis nach wie vor die Methode der Wahl. Bisher konnte die Xenodiagnose nur am Patienten selbst vorgenommen werden.

Es wird eine Möglichkeit des indirekten Parasitennachweises über den natürlichen Überträger (*Reduviiden*) der amerikanischen Trypanosomiasis mittels künstlicher Xenodiagnose beschrieben. Die Xenodiagnose *in vitro* hat den Vorteil, daß sie auch mit eingesandtem Patientenblut, das durch Zusatz von Natriumcitricum im Verhältnis 4:1 ungerinnbar gemacht wurde, durchgeführt werden kann. Die Anwesenheit des Patienten ist nicht mehr erforderlich. Jedoch ist auch diese modifizierte Xenodiagnose an Speziallaboratorien gebunden.

Schlüsselwörter:

Chagas-Krankheit – *Trypanosoma cruzi* – herkömmliche Xenodiagnose – modifizierte Xenodiagnose „*in vitro*“ – praktische Anwendung

Summary:

Beside the serological test, Xenodiagnosis is being used for the diagnosis of suspected Chagas' disease in detecting the parasite. Till now Xenodiagnosis could be applied solely on the Patient himself.

The presented study outlines a possibility of indirect identification of the parasite through a natural vector (*Reduviidae*) of american trypanosomiasis with the help of artificial Xenodiagnosis.

The Xenodiagnosis *in vitro* has special value in that, it can be carried out with sent in blood specimen treated with sodium citrate in ratio 4:1 to prevent coagulation.

The presence of patient is not necessary. However, this modified Xenodiagnosis requires special laboratories.

Keywords:

Chagas' disease – *Trypanosoma cruzi* – conventional Xenodiagnosis – modified Xenodiagnosis *in vitro* – practical application

Einführung

In der Mitteilungsreihe „Ärztliche und technische Leistungen im medizinischen Laboratorium“ ist in dieser Zeitschrift der Artikel von Feldmeier und Knobloch (1): „XIX. Die Chagas-Krankheit: Immunologie, Diagnose und Chemotherapie“ erschienen. In Anlehnung an diese Mitteilung möchten wir im folgenden eine modifizierte Methode der Xenodiagnose beschreiben, die es ermöglicht, diesen indirekten Parasitennachweis auch mit eingesandtem Patientenblut durchzuführen.

Besteht nach der Rückkehr aus Südamerika Verdacht auf eine mögliche Infektion mit dem Erreger der Chagas-Krankheit, dem *Trypanosoma cruzi*, so sollte die Diagnose durch serolo-

gische und parasitologische Untersuchungen gesichert werden.

Infektionen mit *T. cruzi* werden im europäischen Raum serologisch mittels indirektem Fluoreszenzantikörpertest, Komplementbindungsreaktion, indirektem Hämagglutinationstest und dem Latex-Test nachgewiesen; beim parasitologischen Nachweis liegt der Schwerpunkt auf der Xenodiagnose (indirekter Erregernachweis), da der direkte Parasitennachweis wegen der Spärlichkeit der Trypanosomen im peripheren Blut, besonders im frühchronischen Stadium, meist negativ ausfällt. Einzelheiten zur Diagnostik sowie weiterführende Literatur sind der oben zitierten Arbeit zu entnehmen.

Xenodiagnose – Grundlagen

Die Xenodiagnose wird mit infektionsfrei gezüchteten Überträgern des Parasiten, den Raubwanzen (Reduviiden) der Gattungen *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Rhodnius* u. a. durchgeführt. Gelangt durch die Blutaufnahme nur *ein* *T. cruzi* in den Verdauungstrakt der Wanzen, so kann es dort zur Vermehrung und dadurch zur Anreicherung der Trypanosomen kommen. Die Parasiten sind dann 21 Tage nach der Blutmahizeit leicht im Wanzenkot nachweisbar.

Zur Durchführung der Xenodiagnose ist es üblich, 5–10 im Labor infektionsfrei gezüchtete Raubwanzen des Larvenstadiums L IV und L V der örtlich prädominierenden Vektorenart in einem Holzkäfig dem Patienten zum Blutsaugen anzusetzen. Die Reduviiden werden 15–20 Minuten an dem Patienten belassen. Etwa drei Wochen nach der Blutaufnahme wird der Kot der Raubwanzen auf das Vorhandensein von *T. cruzi* untersucht.

Die Xenodiagnose ist noch immer die Methode der Wahl zum Nachweis des Parasiten. Sie hat jedoch den Nachteil, daß sie bisher nur am Patienten selbst durchgeführt werden konnte, d. h. der Chagas-Verdächtige mußte sich zu der Institution begeben, an der die Raubwanzen gezüchtet werden und auch die Xenodiagnose durchgeführt wird. Bisher waren dies in der Bundesrepublik Deutschland das Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg und das Robert Koch-Institut in Berlin (West).

Ein weiterer Nachteil der Xenodiagnose liegt darin, daß die Stiche der Raubwanzen bei hiesigen Patienten zu psychischen Reaktionen und/oder zu Entzündungen an der Einstichstelle und zu allergischen Reaktionen geführt haben bzw. führen können (2, 3). Außerdem kann eine mögliche Übertragung von Mikroorganismen durch die Wanzen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Modifizierte Xenodiagnose

Seit kurzem führen wir nun die Xenodiagnose „in vitro“ durch. Hierzu werden dem Patienten 16 ml Blut aus der Armvene entnommen und mit Natriumcitricum im Verhältnis 4:1 gut durchgemischt (4), um die Blutgerinnung zu hemmen. Die Blut-Natriumcitricum-Lösung wird in einer Petrischale auf konstant 38°C gehalten und mit einer Plastikfolie, die unter dem Handelsnamen „Frapan“ (Hersteller: Kraft GmbH, D-8998 Lindenberg/Allgäu) bekannt ist, luftblasenfrei abgedeckt. Diese Folie ist sehr flexibel und paßt sich leicht der Form der Glasschale an, so daß sie mit dem fallenden Flüssigkeitsspiegel nach unten sinkt und dadurch die Entstehung von Luftblasen verhindert. Nun wird das mit Gaze verschlossene Fütterungsgefäß, in dem sich 20–30 Raubwanzen der Larvenstadien L IV und L V befinden, auf die Plastikfolie gesetzt. Die thermotaktisch reagierenden Wanzen durchstechen die Folie und saugen sich innerhalb von 15–20 Minuten mit dem verdächtigen Blut voll (s. Abb. 1).

Sensibilität

Zur Prüfung der Brauchbarkeit dieser künstlichen Xenodiagnose haben wir Blutproben von gesunden Spendern mit trypanomastigoten Formen von *T. cruzi*, Stamm B, versetzt. Die

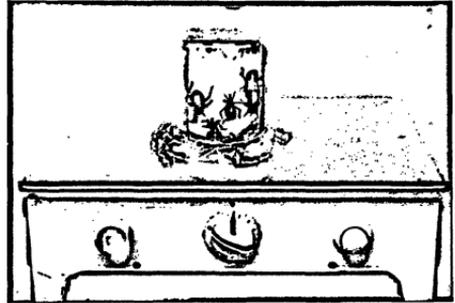


Abb. 1: Xenodiagnose „in vitro“ auf einer Wärmebank

Trypanosomen-Konzentrationen wurden so berechnet, daß je nach benutztem Larvenstadium bei voller Blutmahizeit im Mittel ein Trypanosom pro Wanze aufgenommen werden mußte. Es wurden mehrere Versuchsreihen mit *Triatoma infestans* (und auch *Dipetalogaster maximus*) durchgeführt. Es zeigte sich, daß 21 Tage nach der Fütterung 57% von L III, 39% von L IV und 76% von L V von *T. infestans* infiziert waren (5, 6). Damit konnte der Beweis erbracht werden, daß selbst bei spärlichster Parasitämie eine Infektion des Überträgers mittels künstlicher Xenodiagnose möglich ist.

Die Xenodiagnose in vitro hat den Vorteil, daß der Patient nicht mit den Wanzen in Kontakt kommt, so daß die erwünschten Reaktionen auf die Wanzenstiche ausgeschlossen sind.

Eignung

Zur Klärung der Frage, ob auch eine künstliche Xenodiagnose mit zugesandtem (älterem) Patientenblut erfolgversprechend durchgeführt werden kann, haben wir – auch einer Anregung von Herrn Prof. Dr. Maekelt aus Caracas folgend – mit *T. cruzi* versetztes, durch Natriumcitricum ungerinnbar gemachtes Patientenblut simulierten postalischen Versandverhältnissen ausgesetzt. Die Anzahl der Trypanosomen/ml wurde so gewählt, daß bei voller Blutmahizeit von L IV ein und von L V zwei *T. cruzi* (rechnerisch) aufgenommen wurde. Mehrere Chargen des so infizierten Fütterungsblutes, das sich in den üblichen Blutversandgefäßen zu je 8 ml befand, ließen wir zunächst 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Danach hielten wir eine Hälfte der Röhren 24 Stunden bei +4°C (Wintertemperatur), die andere Hälfte bei +27°C (Sommer-temperatur); beide Chargen befanden sich, extreme mechanische Bedingungen simulierend, während dieser Zeitspanne auf einem Schüttelapparat. Schließlich wurden die so behandelten Blutproben noch einmal 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach der anschließenden künstlichen Xenodiagnose, durchgeführt mit je 30 *Triatoma infestans*-Stadien L IV und L V, erwiesen sich bis zu 50% der Wanzen als infiziert (7).

Bei wiederholten Postversandversuchen mit anschließender künstlicher Xenodiagnose zeigte sich eine Korrelation zwischen der Anzahl positiver Wanzen und der Aufbewahrungs-

temperatur der Blutproben. Je niedriger die Temperaturen waren, um so größer erwies sich später die Anzahl infizierter Wanzen. Selbst bei extremen hochsommerlichen Temperaturen um 30°C waren noch 5% der Wanzen nach erfolgter künstlicher Xenodiagnose Trypanosomen-positiv.

Die simulierten Postversandversuche waren auf 72 Stunden Transportzeit extrem lang eingestellt. In der Praxis dürfte eine Postsendung, zumindest innerhalb der Bundesrepublik Deutschland, von der Absendung bis zum Empfang in der Regel nicht länger als 24 Stunden betragen. Die Chance, daß dadurch fast alle im Blut befindlichen Trypanosomen überleben, dürfte damit gewährleistet sein.

Die künstliche Xenodiagnose hat gegenüber der herkömmlichen Methode weitere Vorteile:

1. Sie kann mit der 3–4fachen Anzahl von Raubwanzen-Larven durchgeführt werden. Dadurch erhöht sich die Chance der Infektionsmöglichkeit der benutzten Raubwanzen und somit eines Parasitennachweises erheblich.
2. Eine Durchführung ist jederzeit möglich (vorausgesetzt natürlich, daß immer ausreichend Überträger-Larven zur Verfügung stehen).
3. Die Anwesenheit des Patienten ist nicht mehr erforderlich.
4. Die Raubwanzen kommen nicht mehr in direkten Kontakt mit dem Patienten.

Ab sofort kann jeder Arzt, der bei einem Patienten den Verdacht auf eine Chagas-Erkrankung hegt, die künstliche Xenodiagnose durchführen lassen. Hierzu sind erforderlich:

1. Patientenblut, ungerinnbar gemacht: 16 ml frisches Blut aus der Armvene + 4 ml Natrium citricum (andere Gerinnungshemmer sind nicht geeignet!).
2. Vorherige telefonische Terminabsprache (in der Regel stehen genügend infektionsfrei gezüchtete Raubwanzen zur Verfügung).
3. Postversand per Expreß, möglichst zu Wochenbeginn.

Schrifttum:

1. FELDMEIER, H., KNOBLOCH, J.: XIX. Die Chagas-Krankheit: Immunologie, Diagnose und Chemotherapie. Lab.med. 6, A+B 177–182 (1982).
2. LUMBRERAS, H., FLORES, W., EXCALLÓN, H.: Allergische Reaktionen auf Stiche von Reduliden und ihre Bedeutung bei der Chagas-Krankheit. Trop. Med. Parasit. 10, 6–19 (1958).
3. COSTA, C. H. N., COSTA, M. T., WEBER, J. N., GILKS, G. F., CASTRO, C., MARSDEN, P. D.: Skin reactions to bug bites as a result of Xenodiagnosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 405–408 (1981).
4. SULLIVAN, T. D.: Viability of *Tryp. cruzi* in citrated blood stored at room temperature. J. Parasitol. 30, 200 (1944).
5. MERKS, Chr.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Abhängigkeit des Entwicklungsverlaufes von *Trypanosoma cruzi* (Stamm B) in *Triatoma infestans* vom Larvenstadium des Überträgers und von der Anzahl der mit dem Blut aufgenommenen trypanomastigoten Erreger. Ein Beitrag zur Xenodiagnose der Chagas-Krankheit. Diplom-Arbeit Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, 1983, hier auch weiterführende Literatur.
6. MERKS, Chr., WERNER, H.: Xenodiagnose in vitro – Möglichkeit der Chagas-Diagnose. XV. Tg. Österreichischer Ges. Tropenmed. Parasit., Wien (1982).
7. WERNER, H., MERKS, Chr.: Neue Möglichkeiten zum Nachweis einer Chagas-Krankheit mittels künstlicher Xenodiagnose: Gemeinschaftsg. Deutsch. Tropenmed. Ges., Österreichischer Ges. Tropenmed. Parasit., Schweizer Ges. Tropenmed. Parasit., Garmisch-Partenkirchen (1983).

Anschrift der Verfasser:

Christiane Merks
Prof. Dr. H. Werner
Robert Koch-Institut
Fachgebiet: Klin. Parasitologie
Nordufer 20
D-1000 Berlin 65

