Aus dem Institut für Virologie und Immunologie
der Universität Würzburg
Vorstände:
Professor Dr. med. Axel Rethwilm
Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Die Übertragung von *Toxoplasma gondii* über die Muttermilch und deren immunologischen Konsequenzen: Arbeiten im Rattenmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Judith Nußbaumer
aus Ellwangen

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Professor Dr. med. Thomas Herrmann

Koreferent: Professor Dr. med. Ulrich Vogel

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung 1

1.1 *Toxoplasma gondii* – der Parasit 1

1.1.1 Entdeckung und Forschungsgeschichte 1

1.1.2 Merkmale, Aufbau und Entwicklungsstadien von *T. gondii* 2

1.1.2.1 Tachyzoiten 2

1.1.2.2 Bradyzoiten und Gewebezysten 3

1.1.2.3 Oozysten 4

1.1.3 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* 4

1.2 Die Toxoplasmose 6

1.2.1 Vorkommen und Verbreitung 6

1.2.2 Transmissionswege im Menschen 6

1.2.3 Klinische Manifestation 9

1.2.4 Diagnose 10

1.2.5 Therapie 12

1.3 Grundlagen der Immunologischen Abwehr 13

1.4 Das Rattenmodell 15

1.5 Zusammensetzung und Funktion von Muttermilch 16

1.6 Fragestellung und Zielsetzung 18

2. Material und Methoden 20

2.1 Material und Versuchstiere 20

2.1.1 Versuchstiere 20

2.1.2 Reagenzien 20
2.1.3 Puffer und Kulturmedien 21
2.1.4 Standardisierte Testsysteme 23
2.1.5 Enzyme 23
2.1.6 Amplifizierungsprimer 23
2.1.7 Antikörper 24
2.1.8 Geräte 24
2.1.9 Parasitenstämme und Zellkultur 24

2.2 Methoden 25
2.2.1 Zellkultur 25
2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von HFF 25
2.2.2 Parasitenkultur 26
2.2.2.1 Tachyzoiten 26
2.2.2.2 Gewebezysten 26
2.2.3 Milchgewinnung und Verarbeitung 27
2.2.3.1 Aufbau der Melkmaschine 27
2.2.3.2 Melkvorgang und Bestandteile der Milch 27
2.2.4 Visueller Parasitennachweis 29
2.2.4.1 Parasitennachweis in der Milch inokulierter Ratten mittels HFF 29
2.2.4.2 Parasitenanreicherung über Dichtegradienten 30
2.2.4.2.1 Percoll Gradient 30
2.2.4.2.2 Ficoll Gradient 31
2.2.4.3 Zytospin-Zentrifugation und Giemsa Färbung 31
2.2.5 *T. gondii* Antigen Gewinnung 31
2.2.5.1 *T. gondii* Antigen (TAg) 31
2.2.5.2 *T. gondii* Crude Extract (TCE) 32
2.2.5.3 *T.gondii* Excreted Secreted Antigen (ESA) 33
2.2.6 Inokulieren von trächtigen Ratten und Austausch der Neugeborenen 33
2.2.6.1 Auslösen der Ovulation und Bestimmung der Tragzeit 33

2.2.6.2 Intravenöse Inokulation trächtiger Ratten mit Tachyzoiten 33
2.2.6.3 Orale Inokulation trächtiger Ratten mit Zysten 34
2.2.6.4 Austausch der Neugeborenen 34
2.2.7 Bioassay und Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii* Antigen in Ratten- und Mäuseserum 35
2.2.7.1 Bioassay in Mäusen und Serumgewinnung 35
2.2.7.2 Gewinnung von Rattenserum 35
2.2.7.3 Bestimmung von Antikörpern gegen *T. gondii* mittels ELISA 35
2.2.8 Orale Inokulation 48 Stunden alter F344 Ratten 36
2.2.9 Immunisierung adulter Ratten und Austausch der Neugeborenen 37
2.2.10 DNA-Extraktion und PCR zum Nachweis des B1 Gens von *T. gondii* 37
2.2.10.1 DNA-Extraktion 37
2.2.10.2 PCR 37
2.2.11 Lymphozytentransformationstest (LTT) 39
2.2.12 Zytokinproduktion in Überständen von in vitro stimulierten Milz-und Lymphknotenzellen 40

3. Ergebnisse 41

3.1 Nachweis von *T. gondii* in der Milch von F344 Ratten 42
3.1.1 Arbeiten mit Milch und visueller Parasitennachweis 42
3.1.2 Titrationsreihe der Parasiten in Zellkultur 45
3.1.3 Parasitennachweis in Milch inokulierter F344-Ratten mittels HFF Zellkultur und Bioassay 46
3.1.4 Nachweis des B1-Gens von *T. gondii* in Milch durch PCR 49

3.2 Immunisierung von F344 Ratten und Übertragung von Immunglobulinen über die Milch 50
3.2.1 Humorale Immunantwort immunisierter Ratten 51
3.2.1.1 Antikörpernachweis im Serum von Ratten, die von immunisierten Ammenmüttern gesäugt wurden 53

3.3 Experimentelle Übertragung von *T. gondii* über die Milch (Fütterexperiment) 54
3.3.1 Humorale Immunantwort 55
3.3.2 Zelluläre Immunantwort 58
3.3.2.1 Lymphozytentransformationstests (LTT) 58
3.3.2.2 Zytokinproduktion von Milz- und mesenterialen Lymphknotenzellen 61

3.4 Humorale Immunantwort und Milch als Transmissionsweg 64
3.4.1 Korrelation von IgG2b und IgM in Serum und Milch infizierter Ratten 64
3.4.2 Analyse via Milch inokulierter Nachkommen 66

4. Diskussion 69

4.1 Nachweis von *T. gondii* in Rattenmilch 69

4.2 Übertragungen von Immunglobulinen über die Milch 71

4.3 Tachyzoiten in Milch – eine Infektionsquelle ? 73

4.4 Milch als Transmissionsweg für *T. gondii* und Immunglobuline 75

4.5 *T. gondii* und die Muttermilch 77

5. Zusammenfassung 79

6. Literaturverzeichnis 82

7. Anhang 98

7.1 Abkürzungen 98

1. Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii* – der Parasit

1.1.1 Entdeckung und Forschungsgeschichte

Der obligat intrazellulär lebende Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii)* wurde erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux (Nicolle und Manceaux, 1908) in mononukleären Milz- und Leberzellen des Gundi, einem in Nordafrika verbreiteten Wüstennagetier aus der Familie der Kammfinger (Ctenodactylidae), entdeckt und zunächst als *Leishmania gondii* beschrieben. Aufgrund seiner Halbmondform wurde er bereits ein Jahr später von seinen Entdeckern als *Toxoplasma* (griech. Toxon, Bogen) und aufgrund des Wirtstieres als *T. gondii* bezeichnet (Nicolle und Manceaux, 1909). Unabhängig von Nicolle und Manceaux isolierte Splendore 1908 in Brasilien aus einem an Paralyse verendeten Kaninchen Toxoplasmen (Splendore, 1908). In Japan fand Mine im selben Jahr in einem Maulwurf Protozoen, die später als *T. gondii* identifiziert wurden (Mine, 1908). Die mögliche Humanpathogenität des Parasiten wurde erstmals in den 20er Jahren vermutet, als der Prager Ophthalmologe Janku in der Retina eines im Alter von elf Monaten verstorbenen Kindes mit kongenitalem Hydrozephalus und Mikrophthalmus Zysten eines Parasiten entdeckte (Janku, 1923).

Der Nachweis der Humanpathogenität und insbesondere die Bedeutung des Parasiten als Ursache pränataler Infektion erfolgte 1937 durch Wolf und Cowen, denen es gelang *T. gondii* aus einem Neugeborenen mit Enzephalomyelitis zu isolieren und im Tierversuch zu züchten (Wolf and Cowen, 1937). 1940 zeigten Pinkerton und Weinmann erstmals die Auswirkungen einer postnatalen Infektion mit *T. gondii*, bzw. wiesen sie auf die Möglichkeit der Reaktivierung einer latenten Toxoplasma-Infektion hin (Pinkerton and Weinmann, 1940).

Der laboratoriumsdiagnostische Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* basierte zunächst auf dem direkten Nachweis des Erregers durch Färbung. Im Jahr 1948 entwickelten Sabin und Feldman die erste zuverlässige serologische Nachweisreaktion, den sog. Dye-Test (Sabin und Feldman, 1948), der auch heute noch als Goldstandard gilt, obgleich er nur noch von wenigen Labors angewandt wird.

1.1.2 Merkmale, Aufbau und Entwicklungsstadien von *T. gondii*

T. gondii ist ein Protozoon, der nach seiner systematischen Einordnung zum Stamm der Apicomplexa, zur Klasse der Sporozoeae und zur Gattung der *Toxoplasma* gehört (Levine, 1977). Andere Vertreter der Gruppe Apicomplexa sind z.B. *Plasmodien* (Erreger der Malaria), *Eimeria* (Erreger der Hühner-Coccidiose) sowie *Cryptosporidien* (Erreger der Kryptosporidiose) (Barta et. al., 1991).
Es existieren drei verschiedene infektiöse Entwicklungsstadien von *T. gondii:* Tachyzoiten, Bradyzoiten (in Gewebezysten) und Sporozoiten (in Oozysten) (Dubey, et al., 1998b). Alle drei Formen sind in ihrer Grundstruktur ähnlich, daher wird der Aufbau des Parasiten anhand des Tachyzoiten erläutert.

1.1.2.1 Tachyzoiten

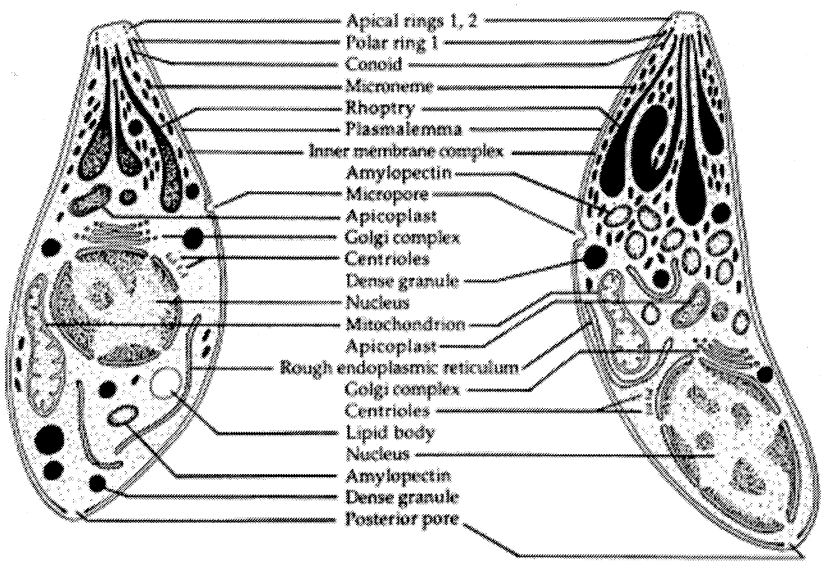


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Tachyzoiten (links) und eines Bradyzoiten (rechts) von *T. gondii.* Nach Dubey, J.P. et al. 1998. Clin Microbiol Rev *11* (2): 267-299

Als Tachyzoiten (tachos, griech., schnell) bezeichnet man die Proliferationsformen, die sich nach aktiver Invasion in die Wirtszelle (Ryning und Remington, 1978) innerhalb jeder beliebigen Zelle des Zwischenwirtes und mit Ausnahme der Darmepithelzellen in jeder Zelle des Endwirtes durch Endodyogenie (asexuelle Vermehrung, wobei in einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entstehen) (Van de Zypen and Piekarski, 1967) schnell

vermehren (Frenkel, 1973). Tachyzoiten sind sichel- oder halbmondförmige Zellen etwa 3,5-7 µm lang und 2-4 µm breit (Smith, 1995). Sie enthalten wie alle Eukaryonten einen Nucleus mit zentral gelegenem Nucleolus, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und Mitochondrien. Daneben zeichnen sich Apicomplexa durch eine besondere Organellenstruktur am vorderen Ende, den Apicalkomplex, aus. Dieser Komplex beinhaltet sowohl Organellen als auch komplexe zytoskelettale Elemente (Dubey et al., 1998b), die beim Eindringen in die Wirtszelle eine entscheidende Rolle spielen. Bestandteile des Apicalkomplexes sind u. a. zigarrenförmige Mikronemen, die mehrere Adhäsions-Moleküle enthalten (Tomley and Soldati, 2001), das Konoid, eine konische Struktur aus 22 spiralig angeordneten Fibrillen, in denen Aktin nachgewiesen wurde (Nichols and Chiappino, 1987), und ein Polring. Vom Konoid ausgehend reichen Rhoptrien (sekretorische Einheiten) (Nichols et al., 1983) in das Zytoplasma hinein. Jedes dieser Organellen besitzt Proteine, deren Funktion mit dem zeitlichen Entladen der Organellen während der Invasion in die Wirtszelle zusammenhängt. Darüber hinaus enthalten die Apicomplexa den sog. Apicoplasten, ein Organell, das Gene enthält, die typischerweise in Chloroplasten vorkommen (Kohler et. al., 1997) und vermutlich durch sekundäre Endosymbiose einer Grünalge entstanden ist (Fichera and Roos, 1997). Bemerkenswert am Zytoskelett von *T. gondii* ist der innere Membrankomplex, der eine ähnliche Funktion wie das ER besitzt (de Melo and de Souza, 1997) und aus einer mittleren und inneren Membran, die eng miteinander verbunden sind, besteht (Sheffield and Melton, 1968). Zusammen mit der äußeren Membran bildet der innere Membrankomplex die Pellicula. Sowohl innerer Membrankomplex als auch Pellicula weisen Unterbrechungen, Mikroporen, auf.

1.1.2.2 Bradyzoiten und Gewebezysten

Tachyzoiten können sich in infizierten Tieren in die langsam wachsenden Bradyzoiten (brady, griech., langsam) umwandeln, die Gewebezysten bilden. Die Zysten bilden sich ungefähr sieben bis zehn Tage nach der Infektion. Die Größe der Zysten variiert von 5 µm im Durchmesser mit zwei darin enthaltenen Bradyzoiten bis zu 300 µm großen Zysten mit mehreren tausend Bradyzoiten. Letztere finden sich vorwiegend intramuskulär (Dubey et. al., 1998b). Die Zystenwand ist ungefähr 0,5 µm dick und besteht sowohl aus Wirtszell- als auch aus Parasitenbestandteilen (Ferguson and

Hutchison, 1987). Im Wirt haben sie eine sehr lange Lebensdauer. Gewebezysten lassen sich durch Erhitzen oder Einfrieren zerstören (Dubey, 1988; Dubey et al., 1990), ferner sind sie empfindlich gegen γ-Strahlung (Dubey et al., 1986).

1.1.2.3 Oozysten

Oozysten sind rundliche, mit einer resistenten Hülle ausgestattete, ungefähr 11 bis 14 µm im Durchmesser große Dauerstadien, die als Endprodukt eines im Darmepithel von Felidae abgelaufenen geschlechtlichen Zyklus entstehen. Sie werden mit dem Katzenkot ausgeschieden und enthalten die Zygote. Gegen Umwelteinflüsse sowie gegen die meisten Desinfektionsmittel (Dubey and Beattle, 1988) sind die Oozysten außerordentlich resistent und können lange infektiös bleiben (Frenkel et al., 1975).

1.1.3 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist einer der unter Vögeln und Säugetieren am meisten verbreiteten und häufigsten Parasiten des Menschen. Er ist in der Lage, nahezu jede beliebige Säugetier- oder Aviatenzelle zu infizieren und sich zu vermehren (Wong and Remington, 1993).

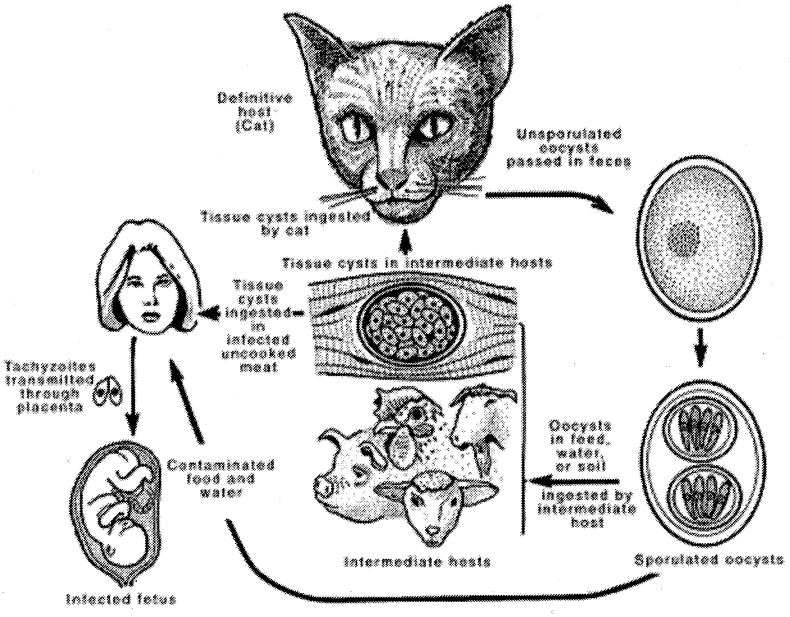


Abb. 2 Lebenszyklus von *T. gondii.* Nach Dubey J. P. et al., 1998. Clin Microbiol Rev *11*(2): 267-299.

Hauptwirt des Erregers ist die Gruppe der Katzenartigen (Felidae). Ausschließlich hier findet neben der asexuellen Vermehrung die geschlechtliche Fortpflanzung des Parasiten in Darmepithelzellen statt. Dies ist erst seit 1970 durch die Entdeckung von sexuellen Stadien im Dünndarm von Katzen bekannt (Dubey et al., 1970).

Nach oraler Aufnahme von Gewebezysten durch eine Katze, wird die Zyste durch proteolytische Enzyme aufgelöst, und die freigesetzten Bradyzoiten infizieren Epithelzellen des Dünndarms. Hier werden Mikro- und Makrogameten gebildet, deren Verschmelzung zur Oozystenbildung führt. Die zunächst noch nicht infektiösen Oozysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden und reifen innerhalb von 48 bis 72 Stunden durch Sporogonie (Entwicklung von Sporozoiten) zu infektiösen Einheiten heran. Wenn diese nun infektiösen Oozysten von einem Zwischenwirt (beispielsweise von Nagetieren, Vögeln oder dem Menschen) aufgenommen werden, werden die durch Meiose entstandenen acht Sporozoiten im Darm freigesetzt, penetrieren Gewebezellen, oder werden von Zellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen. Sie vermehren sich alle vier bis sechs Stunden asexuell innerhalb einer parasitären Vakuole durch Endodyogenie, wobei aus einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entstehen (Dubey and Beattle, 1988). Beinhaltet eine Wirtszelle 64 bis 128 Parasiten, rupturiert die Zelle und setzt die entstandenen Tachyzoiten frei (Radke and White, 1998). In der akuten Phase einer *T. gondii* Infektion lassen sich Tachyzoiten in Blut (Parasitämie), Lymphe, Liquor und Milch nachweisen. Sie sind außerdem in der Lage, die Plazentaschranke zu überwinden. Die Tachyzoiten infizieren weitere Körperzellen und beginnen den Vermehrungszyklus von vorne.

Mit dem Einsetzen der Immunantwort verändert und verlangsamt sich der Metabolismus der Tachyzoiten, so dass sie ungefähr eine Woche nach der Infektion in Bradyzoiten übergehen, in der parasitären Vakuole verbleiben und jahrelang bestehende Gewebezysten v. a. in Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur bilden (Ferguson and Hutchison, 1987). Wird beispielsweise nun mit Gewebezysten kontaminiertes Fleisch verzehrt, werden die Bradyzoiten nach Aufbruch der Zyste frei und infizieren das Darmepithel. Dort differenzieren sie sich wieder zu Tachyzoiten und verteilen sich im ganzen Körper.

Die Bildung von Zysten markiert die chronische Phase der Infektion. Die Parasiten in den Zysten schädigen den Wirt zwar nicht mehr, doch kann es durch Nachlassen der Immunität zu einer endogenen Reaktivierung der Infektion kommen.

1.2 Die Toxoplasmose

1.2.1 Vorkommen und Verbreitung

Im Gegensatz zu vielen anderen Parasiten, die vorwiegend in tropischen und subtropischen Regionen vorkommen, ist *T. gondii* global verbreitet. Von der gesamten Weltbevölkerung sind 30-60% mit *T. gondii* infiziert (Dubey and Beattle, 1988, Frenkel, 1990), wobei seroepidemiologische Studien zeigen, dass die Seroprävalenz in verschiedenen Ländern abhängig von klimatischer Region, Alter der Bevölkerung, ethnischer Gruppierung und Ernährungsgewohnheiten stark variiert (Remington et al., 2001). Innerhalb Europas liegt sie bei Frauen im gebärfähigen Alter zwischen 37 und 58% (Tenter et al., 2000). In Frankreich ist sie am höchsten, was sich vermutlich durch den vermehrten Genuss von halbrohem oder rohem Fleisch erklären lässt (Desmonts, 1987). Die Häufigkeit des Nachweises von Toxoplasma-Antikörpern steigt dabei proportional dem Lebensalter an, d.h. für Kinder unter zehn Jahren liegt sie bei 20-25%, bei den 70-90 jährigen dagegen über 90% (Ockert, 1991).
Frauen im gebärfähigen Alter sind bis zu 40% bereits infiziert und dadurch vor einer Zweitinfektion während der Gravidität geschützt. Bei einer Primärinfektion mit *T. gondii* während der Gravidität kann es zu einer diaplazentaren Parasitenübertragung auf den Fötus mit der Folge einer konnatalen Toxoplasmose kommen. Eine Infektion des Fötus tritt aber nur in 50% der Fälle ein. So führen bei einer Erstinfektion der Schwangeren 25% der mütterlichen Infektionen, die im ersten Trimenon erworben wurden, und etwa 65% der mütterlichen Infektionen, die im letzten Trimenon erworben wurden, zu einer kongenitalen Infektion (Desmonts and Couvreur, 1974). Die fetale Infektionsrate in Deutschland liegt bei drei bis vier pro 1000 Neugeborene (Enders, 1991).

1.2.2 Transmissionswege im Menschen

Mehrere epidemiologische Studien haben gezeigt, dass der Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem Fleisch (Carnivorismus), das mit Gewebezysten von *T. gondii* kontaminiert ist, eine der Hauptinfektionsquellen darstellt (Desmonts, 1965; Kimball et. al., 1974; Roghmann et al., 1999). In Europa und den USA handelt es sich insbesondere

um den Verzehr von Schweinefleisch (Dubey, 1994), obgleich auch Schaf-, Ziegen- und Rindfleisch als Infektionsquellen bekannt sind (Edelhofer, 1994).
Mc Auley et al. führten 1994 eine Studie durch, in der gezeigt werden konnte, dass 28 von 45 Frauen, die ein Kind mit kongenital erworbener Toxoplasmose Infektion geboren haben, rohes oder nicht genügend erhitztes Fleisch verarbeitet oder verzehrt hatten (Mc Auley et al., 1994).

Perorale Schmutz- und Schmierinfektion im Bereich von Katzenhaltung sowie der Verzehr von Salat und Gemüse (Herbivorismus), die auf dem Feld mit Oozysten direkt aus dem Katzenkot (Frenkel, 1990) oder über tierische Vektoren (Frenkel et al., 1975, Ruiz and Frenkel, 1981) wie beispielsweise Schaben, Fliegen und Regenwürmer kontaminiert wurden, bilden die Hauptursache für die Oozysten-Übertragung auf den Menschen. Aufgrund der Säuberungsgewohnheiten von Katzen finden sich normalerweise keine Fäkalien oder Oozysten an der Katze selbst, daher ist die Wahrscheinlichkeit der Übertragung von *T. gondii* auf den Menschen durch Streicheln einer Katze minimal (Dubey, 1994). Die Übertragung findet beispielsweise durch Reinigung von mit Katzenkot kontaminierten Gegenständen, oder nach Kontakt mit Erde bei Gartenarbeit statt, da Katzen ihren Kot vorwiegend in weichem Untergrund vergraben (Dubey, 1994). Hunde, die sich im kontaminiertem Erdreich wälzen und in deren Fell Oozysten haften bleiben, können als Überträger fungieren (Lindsay et. al., 1997). Dass eine Infektion durch kontaminiertes Trinkwasser ebenso möglich ist, beschrieben Benenson et al., 1982 (Benenson et al., 1982).

Die diaplazentare Toxoplasma Übertragung, welche als Folge einer Primärinfektion während der Gravidität eintreten kann, stellt einen weiteren Transmissionsweg dar (vertikale Transmission). Es wird angenommen, dass im Rahmen der Parasitämie, die im akuten Stadium der Infektion auftritt, Tachyzoiten Zellen der Plazenta infizieren, die dann in den fötalen Kreislauf gelangen (Remington et al., 2001). Seltener ist eine *T. gondii* Infektion mit Tachyzoiten, die sich in kontaminierten Blutkonserven befanden (Siegal et al., 1971), oder durch Laborunfälle (Remington et al., 2001).
Infektionen des Menschen mit *T. gondii* sind weiterhin möglich über Transplantate, die Tachyzoiten oder Bradyzoiten enthalten (Mayes et al., 1995; Mele et al., 2002).

Tachyzoiten von *T. gondii* fanden sich außerdem in unbehandelter Milch von beispielsweise Mäusen, Schafen, Kühen und Katzen (Eichenwald, 1948; Powell et al., 2001; Remington et al., 1961). Sacks et al. berichten 1982 von einer Familie mit 24 Mitgliedern von denen, serologisch mittels IgM-Antikörpernachweis gesichert, zehn an einer akuten Toxoplasmose Infektion erkrankt waren. Der Indexfall erlitt eine Retinochoroiditis während bei den anderen neun positiv getesteten Familienmitgliedern die Erkrankung asymptomatisch verlief. Alle zehn erkrankten Familienmitglieder gaben an, kürzlich frische Ziegenmilch konsumiert zu haben, während die übrigen 14 dies verneinten (Sacks et al., 1982). Chiari und Riemann beschreiben ebenfalls Fälle, in denen Menschen nach dem Verzehr von frischer Ziegenmilch eine Toxoplasmose Infektion entwickelten (Chiari Cde and Neves, 1984; Riemann et al., 1975). Bislang konnte die Übertragung von *T. gondii* über die Muttermilch beim Menschen noch nicht nachgewiesen werden, obgleich ein Fall beschrieben ist, in dem ein Säugling an Toxoplasmose erkrankte, nachdem die Mutter während dem Stillen eine Erstinfektion mit *T. gondii* durchmachte (Bonametti et al., 1997).

Obgleich man weiß, dass *T. gondii* über die Muttermilch übertragen werden kann, ist der Transmissionsmechanismus, ob der Parasit extrazellulär als freier Tachyzoit, als Bradyzoit in Gewebezysten oder intrazellulär in die Milch gelangt, bis heute nicht bekannt. Nach den Arbeiten von Channon et al. ist es durchaus denkbar, dass sich *T. gondii* nach der Aufnahme über den Darm als Tachyzoit innerhalb von Monozoiten, dendritischen Zellen oder Neutrophilen über den peripheren Blutstrom im gesamten Körper ausbreitet (Channon et al., 2000). Da *T. gondii* aktiv intraepitheliale Leukozyten infiziert (Dubey et al., 1997), die wiederum Epithelbarrieren überwinden, ist es vorstellbar, dass der Parasit über diesen Weg in die Milch gelangt.

Der Klasse I Stamm RH hat ein besonders hohes Potential Epithelbarrieren mittels transepithelialer Migration zu überwinden. Mit diesem Mechanismus, der erst kürzlich von Barragan und Sibley beschrieben wurde, ist es dem Parasiten möglich, viele biologische Barrieren im Organismus zu überwinden und sich rasch auszubreiten (Barragan and Sibley, 2002).

Da *T. gondii* bei der oralen Aufnahme über die Milch zunächst in den Magen gelangt und somit Verdauungsenzymen und Magensäure ausgesetzt ist, hat man versucht, sich dies bei der Unterscheidung zwischen Tachyzoiten und Gewebezysten zu Nutze zu machen. Es ist seit 1960 bekannt, dass Bradyzoiten in Magensäure und pepsinhaltigem

Milieu für mindestens zwei bis drei Stunden überleben können und ihre Infektiosität behalten, während Tachyzoiten sofort zerstört werden. Diese überleben lediglich in 1%iger Trypsinlösung für drei Stunden (Jacobs et al., 1960). Sharma und Dubey untersuchten 1981 ebenfalls die Überlebensdauer von Bradyzoiten in pepsin-und trypsinhaltigen Lösungen. Sie fanden heraus, dass Bradyzoiten in einer pepsinhaltigen Lösung zwei aber nicht drei Stunden überleben können, und obwohl sie in 1%iger trypsinhaltiger Lösung drei Stunden überleben konnten, reduzierte sich ihre Infektosität um das zehnfache (Sharma and Dubey, 1981).
Pettersen war 1984 der Ansicht, dass *T. gondii* bereits fünf Tage nach einer Infektion als Gewebezysten in die Milch gelangt. Er begründete diese Annahme mit der Beobachtung, dass Milch infizierter Mäuse, die für 60 Minuten mit HCL inkubiert worden war, eine *T. gondii* Infektion hervorrufen konnte (Pettersen, 1984). Diese Behauptung stand allerdings im Gegensatz zu den Resultaten von Dubey und Frenkel, die festgestellt hatten, dass sich Bradyzoiten in Gewebezysten frühestens sieben Tage nach einer Infektion bildeten (Dubey and Frenkel, 1976).
In neuesten Studien zeigte sich, dass hohe Konzentrationen (≥1000) von extrazellulären *T. gondii* Tachyzoiten, die oral aufgenommen wurden, durchaus in Mäusen und Katzen eine Infektion hervorrufen können (Dubey, 1998a) und somit die Resistenz von Tachyzoiten und Bradyzoiten gegenüber Verdauungsenzymen keine zuverlässige Unterscheidungsmethode hinsichtlich der Übertragungsform von *T. gondii* in die Muttermilch darstellt.

1.2.3 Klinische Manifestation

Beim immunkompetenten Menschen verläuft eine Infektion meist inapparent oder subklinisch mit unspezifischen Symptomen wie Lymphadenopathie, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen und Fieber (Teusch et al., 1979). Dieses Krankheitsgefühl kann über mehrere Wochen andauern, eine medikamentöse Behandlung ist nicht erforderlich. Eine klinisch unauffällige Toxoplasmose-Infektion kann bei Immunsuppression (beispielsweise bei AIDS-Kranken, Organtransplantatempfängern oder Leukämie-Patienten) reaktiviert werden und als klinisch manifeste Erkrankung in Erscheinung treten. Die häufigste Manifestation ist dann die Toxoplasmen Enzephalitis (Wong and Remington, 1993), die unbehandelt zum

Tod führt. Toxoplasmose gehört zu den häufigsten opportunistischen Infektionen bei AIDS-Patienten (Luft and Remington, 1992). Man nimmt an, dass in den USA 3-10% aller Patienten, die an AIDS erkrankt sind, an Toxoplasmose sterben. In Europa und Afrika sind es 25-50%, die Zeichen einer Toxoplasmose-Infektion zeigen (Luft at al., 1993). Aus bislang unerklärlichen Gründen verläuft eine reaktivierte Toxoplasmose-Infektion in Patienten mit Knochenmarktransplantation besonders schwerwiegend. Über 90% dieser Patienten sterben (Slavin et al., 1994; De Medeiros et al., 2001).

Tritt vor der 20. Gestationswoche einer Schwangerschaft eine Toxoplasmen-Infektion bei einer zuvor noch nicht mit *T. gondii* infizierten Frau ein, so führt dies meist zum intrauterinen Fruchttod (Von Harnack und Koletzko, 1997). Infektionen im zweiten oder dritten Trimenon einer Schwangerschaft führen zur Frühgeburt oder zu Krankheitserscheinungen beim Neugeborenen wie Pneumonie, Myokarditis, Nephritis Hepatitis oder hämorrhagische Gastroenteritis. Oftmals kommt es zur Enzephalitis mit Hydrozephalusentwicklung, Bildung von zerebralen Verkalkungsherden, Epilepsie, Großhirnatrophie und geistiger Retardierung. Daneben bestehen Optikusatrophie, Iritis, Katarakt oder Chorioretinitis. Erfolgt die Infektion erst sehr spät in der Schwangerschaft, so wird das Kind scheinbar gesund geboren, entwickelt dann aber über Jahre die beschriebene Symptomatik (Guerina et al., 1994).

1.2.4 Diagnose

Der Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* erfolgt durch serologische Verfahren, Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), durch direkten histologischen, mikroskopischen Nachweis des Erregers, mittels Immunperoxidase Färbung seiner Antigenprodukte, oder durch Kultur in der Maus (bioassay) (Montoya, 2002). Der 1948 von Sabin und Feldman beschriebene Dye-Test (Sabin and Feldman, 1948) wird nur noch selten eingesetzt.

Serologische Testverfahren sind heute das Mittel der Wahl beim Nachweis des Vorliegens einer akuten oder chronischen Toxoplasmose-Infektion. Dabei verwendet man gewöhnlich eine Kombination aus verschiedenen Testverfahren zum Nachweis der unterschiedlichen Antikörperklassen, die je nach Dauer und Zeitpunkt der Infektion im Serum eines Menschen feststellbar sind (Montoya et al., 1995).

IgG-Antikörper werden routinemäßig mittels ELISA, indirekter Immunfluoreszenz, oder modifiziertem direkten Hämagglutinationstest (Thulliez et al., 1986) nachgewiesen. In diesen Testsystemen erscheinen die Antikörper gewöhnlich innerhalb ein bis zwei Wochen nach einer Infektion mit Spitzenwerten nach vier bis acht Wochen, die dann wieder abfallen, jedoch ein Leben lang nachweisbar bleiben (Montoya, 2002).

IgM–Antikörper, die hauptsächlich mittels „double–sandwich" IgM–ELISA (Naot et al., 1981) und IgM–Immunosorbent Agglutinations Assay (ISAGA) (Remington et al., 2001) nachgewiesen werden, gelten als Indikator einer kürzlich erworbenen, einer akuten Toxoplasmose-Infektion. Sie sind initial nachweisbar, doch werden die Antikörper-Titer im Verlauf der folgenden Monate negativ (Montoya, 2002). Liesenfeld et al. gelang es allerdings 1997 im Serum chronisch infizierter Patienten IgM-spezifische Antikörper nachzuweisen (Liesenfeld, 1997), und auch Bobic et al. fanden zwölf Jahre nach einer Infektion mit *T. gondii* im Serum hohe IgM-Antikörper Titer (Bobic et al., 1991). Diese Tatsache erschwert die Interpretation der Testergebnisse, zumal man festgestellt hat, dass das Vorhandensein von Rheumafaktoren (RF) und antinukleären Antikörpern (ANA) im Serum von Patienten zusätzlich zu falsch-positiven IgM-Resultaten führt (Camargo et al., 1972; Araujo et al., 1971).

Zur Diagnosestellung einer kongenitalen Toxoplasmose-Infektion hat sich der Nachweis spezifischer IgA-Antikörper mittels ELISA oder ISAGA als sehr hilfreich erwiesen. Man hat festgestellt, dass in diesem speziellen Fall der Nachweis von IgA-Antikörpern im Serum eines kongenital infizierten Neugeborenen wesentlich sensitiver ist als der Nachweis von IgM-Antikörpern (Stepick-Bieck et al., 1990).

Der Nachweis von IgE-Antikörpern, der vorwiegend durch ELISA geschieht, hat sich bislang zur Diagnosestellung einer Toxoplasmose-Infektion als nicht sehr nützlich erwiesen, obgleich es Hinweise gibt, dass IgE-Antikörper als Indikatoren einer kürzlich erworbenen Infektion dienen können (Montoya and Remington, 1995).

Die Amplifizierung von Parasiten-DNA mittels PCR aus verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* (Burg et al., 1989; Holliman et al., 1990). Dennoch konnte sie

sich bislang nicht gegenüber den einfacheren und ebenso zuverlässigen serologischen Testsystemen durchsetzen.

In vielen Labors wird noch immer der bioassay zum Nachweis einer akuten Infektion mit *T. gondii* durchgeführt. Im bioassay wird Gewebe oder Körperflüssigkeit des vermutlich erkrankten Menschen oder Tieres intraperitoneal in Labormäuse, die nachweislich uninfiziert sind, injiziert und das Serum der Mäuse ca. vier Wochen nach der Injektion mittels serologischer Testverfahren auf Antikörper getestet. Neben dem Bioassay in Mäusen wird der Parasitennachweis auch direkt über Zellkulturen erbracht. Die Sensitivität dieser Methode ist vergleichbar dem Bioassy in Mäusen (James et al., 1996).

Beim direkten histologischen Parasitennachweis im Rahmen einer akuten Toxoplasmose-Infektion hat sich das Verfahren der Immunperoxidase-Färbung bewährt. So konnte mit Hilfe dieser Technik das Vorhandensein von *T. gondii* im ZNS von AIDS-Patienten gezeigt werden (Conley et al., 1981).

1.2.5 Therapie

Die derzeitige Behandlung besteht aus Sulfonamiden (vorwiegend Sulfadiazin) und Diaminopyrimidinen (vorwiegend Pyrimethamin). Die Substanzen wirken effektiv gegen die schnell replizierenden Tachyzoiten im akuten Stadium der Erkrankung, jedoch nicht gegen Bradyzoiten bei der chronischen Form der Toxoplasmose. Aus diesem Grund ist bei immunsupprimierten Patienten eine dauerhafte Medikamenteneinnahme notwendig. Die seltenen Nebenwirkungen treten in Form von Blutbildungsstörungen, gastrointestinalen Störungen, allergischen Reaktionen und Nephrotoxizität auf. Aufgrund ihrer bekannten teratogenen Wirkung dürfen die Medikamente bei Schwangeren erst nach der 20. Woche eingesetzt werden. Eine Alternative stellt Spiramycin aus der Gruppe der Makrolide dar.

1.3 Grundlagen der Immunologischen Abwehr

Die Aufgaben des Immunsystems umfassen die Erkennung, Vernichtung und Eliminierung von pathogenen Erregern, Fremdstoffen, infizierten Zellen, Tumorzellen, gealterten oder abgestorbenen Zellen.

Die unspezifische Abwehr repräsentiert die erste Schutzbarriere und sorgt dafür, dass Krankheitserreger bereits vor dem Eindringen in den Organismus bzw. in die Blutbahn wirkungsvoll bekämpft werden. Sie umfasst anatomische Faktoren (z. B. Haut, Blut-Hirnschranke), physikalische Faktoren (z.B. Schleim-, Sekretfluss, Spüleffekt im Urogenitaltrakt), biochemische Komponenten (z. B. bestimmte pH-Verhältnisse, Lysozym, Neuraminidase, CRP, Komplementsystem) und zelluläre Bestandteile (z. B. Granulozyten, mononukleäres-phagozytäres System, NK-Zellen).

Bei der spezifischen (adaptiven) Immunabwehr erlernt das Immunsystem die Eliminierung der als Antigene bezeichneten körperfremden Moleküle. Spezielle Antigen-präsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) phagozytieren Antigene und zerlegen sie in antigene Peptide. Diese Fragmente des Proteins werden mit Molekülen des Haupt-Histokompatibilitätskomplex

(MHC = major histocompatibility complex) verbunden und auf der Zelloberfläche präsentiert. MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen, MHC-II-Moleküle werden dagegen nur auf B–Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) exprimiert (Rammensee, 1995). T-Lymphozyten, Abkömmlinge der lymphoiden Stammzelllinie aus dem Knochenmark, tragen spezifische Rezeptormoleküle, die es ihnen ermöglicht, den Peptid-MHC-Komplex zu erkennen. Eine Voraussetzung hierfür ist ihre funktionelle Reifung im Thymus. Hier bilden sie neben dem charakteristischen CD3-signaltransduzierenden Komplex auch antigenspezifische T-Zellrezeptoren (α:β; γ:δ) und die Korezeptoren CD4 und CD8 aus, die eine Differenzierung in T -Helfer Lymphozyten ($CD4^+$) und Zytotoxische-T-Lymphozyten ($CD8^+$) ermöglichen. $CD8^+$-Zellen erkennen Epitope zusammen mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Werden sie aktiviert, differenzieren sie zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die die antigen – tragenden Zellen zerstören können. T-Helferzellen erkennen hingegen Peptide, die an MHC-II-Moleküle gebunden sind. Sie sind die zentrale Population, die mit der primären Antigen-Erkennung befasst und an der Aktivierung von Killerzellen und B-Lymphozyten beteiligt ist. Sie produzieren

Zellmediatoren (Zytokine), die sie an andere Zellen (z. B. B-Lymphozyten, Makrophagen, T-Zellen) abgeben und diese somit stimulieren und aktivieren. Aufgrund ihrer Zytokinproduktion lassen sich die T-Helferzellen in zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilen: Typ 1 Zellen (TH1) synthetisieren IL-2 und IFN-γ, während TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 produzieren. Zytokine sind unspezifische, hochaktive Moleküle, die vorwiegend von T-Zellen und Makrophagen nach antigenspezifischer Stimulierung gebildet werden und die Proliferation und Differenzierung weiterer Zellen des Immunsystems beeinflussen. Sie bewirken vor allem eine Differenzierung der reifen B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder von T-Zellen zu aktivierten Helferzellen oder CTL. Reife B-Lymphozyten tragen Rezeptormoleküle einer einzigen Spezifität in Form von oberflächenständigen Immunglobulinen. Sobald sie aktiviert werden, teilen und differenzieren sie sich zu Plasmazellen, die spezifische Antikörper (Immunglobuline) produzieren. Treffen Immunglobuline auf das entsprechende Antigen, lagern sie sich an, neutralisieren es, oder beschleunigen seinen Abbau durch Aktivierung des Komplementsystems und Unterstützung der Phagozytose durch Opsonisierung. Alle Antikörper sind Glycoproteine mit einer gemeinsamen Grundstruktur. Man unterscheidet fünf verschiedene Klassen, die jeweils unterschiedliche Hauptfunktionen haben: IgG (Subklasse 1-4, beim Menschen), IgA (Subklasse 1 und 2), IgM, IgD und IgE. Die ersten Antikörper, die bei einer humoralen Immunantwort entstehen, sind immer Immunglobuline der Klasse M. Durch ihre pentamere Struktur können sie besonders gut das Komplementsystem aktivieren und sind somit insbesondere wichtig bei der Bekämpfung einer Infektion des Blutes. IgA, das hauptsächlich neutralisierend fungiert, kommt in Körpersekreten vor. Es findet sich vor allem in den Sekreten der Schleimhautepithelien des Darmes, im respiratorischen Trakt und in der Milch. Es tritt entweder als Monomer in der Zirkulation oder als Dimer in Sekreten auf. Die mit IgA assoziierte SC-Kette (SC = secretory component) wird während der durch einen Rezeptor vermittelten Transzytose von IgA durch Epithelien gebildet und schützt vor Verdauungsenzymen. IgG opsonisiert Pathogene für die Aufnahme durch Phagozyten und aktiviert das Komplementsystem. IgG besitzt von der zweiten Hälfte der Schwangerschaft an die Fähigkeit zur Plazentapassage, wodurch das Neugeborene während der ersten Lebenswochen geschützt ist („Nestschutz"). Es findet sich außerdem in der Kolostralmilch und kann vom Neugeborenen als vollständiges Molekül im

Intestinaltrakt resorbiert werden. IgE-Antikörper treten nur in geringer Konzentration im Blut oder in extrazellulären Flüssigkeiten auf, da sie von einem spezifischen IgE-Rezeptor auf Mastzellen gebunden werden. Nach Bindung der entsprechenden Antigene kommt es zur Degranulierung der Mastzelle und Freisetzung vasoaktiver Amine, Leukotriene und Prostaglandine. IgD-Antikörper sind auf unreifen B-Lymphozyten nachweisbar; über ihre Funktion ist bislang wenig bekannt.
(Bitter-Suermann, 1994; Janeway und Travers, 1997; Löffler und Petrides, 1998; Mosmann et al, 1986; Opal, 1999).

1.4 Das Rattenmodell

Der Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* ist sowohl im immunkompetenten Menschen als auch in der adulten Ratte meist subklinisch. Aus diesem Grund hat man schon lange versucht, die Toxoplasmose, ihren Verlauf und die Auswirkungen auf das Immunsystem anhand des Rattenmodells zu verstehen. Dabei hat man festgestellt, dass der Erkrankungsverlauf entscheidend vom Alter der Ratte, vom Infektionsweg und vom Parasitenstadium abhängt (Dubey and Frenkel, 1998).
Zur Infektion mit Tachyzoiten hat man bislang vorwiegend den RH Stamm von *T. gondii* verwendet. Mäuse überleben eine Infektion mit diesem Stamm ohne medikamentöse Therapie nicht, Ratten hingegen überleben und entwickeln eine chronische Infektion. Allerdings ist es bei chronisch infizierten Tieren schwierig, den RH Stamm histologisch nachzuweisen (Hellbrügge et al., 1956). Jacobs und Jones gelang es sieben Monate nach einer intraperitonealen (i.p.) Inokulation virulente Parasiten aus einer Ratte zu isolieren (Jacobs and Jones, 1950) und Ruchman und Fowler beschreiben das Überleben von Parasiten im Rattenhirn zwei Jahre nach einer i.p. Inokulation (Ruchman and Fowler, 1951).
Ratten, denen eine hohe Tachyzoitenzahl intrazerebral inokuliert wurde, verstarben. Allerdings überlebten sie bei Inokulation mit geringen Parasitenzahlen (Ruchman and Johansmann, 1948).
Hinsichtlich der Auswirkungen einer Infektion mit *T. gondii* in Bezug auf das Alter der Ratten existieren verschiedene Hypothesen. So wird beispielsweise angenommen, dass neugeborene Ratten anfällig für die Erkrankung an einer Toxoplasmose sind, während entwöhnte Ratten resistent dagegen sein sollen (Lewis and Markell, 1958).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die letale Tachyzoitendosis der adulten Ratte bei $>10^7$ und für die jüngere Ratten bei 10^4 liegt.
Eine Infektion nach oraler Aufnahme von Gewebezysten verläuft im Gegensatz zu einer Infektion mit Tachyzoiten in der immunkompetenten Ratte stets subklinisch (Dubey and Shen, 1991; Zenner et al., 1993). Für die Infektionskontrolle spielt dabei eine intakte T-Zell Antwort, insbesondere von IFN-γ produzierenden TH1-Zellen, eine entscheidende Rolle (Mordue et al., 2001). Die Bedeutung der zellulären Immunabwehr zeigt sich auch darin, dass eine Infektion mit 10^3 Tachyzoiten (Stamm RH), 10^6 Tachyzoiten (Stamm NTE) oder 1200 Zysten (Stamm Prugniaud) in der athymischen F344 Nacktratte tödlich verläuft (Foulet et al., 1994; Kempf, 1999; Santoro et al., 1987). Allerdings zeigten Schlüter et al., dass die athymische LEW Nacktratte eine Infektion mit 100 Zysten von *T. gondii* (Stamm DX) aufgrund der massiven Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und γδ T-Zellen überlebt (Schlüter et al., 1995).

1996 veröffentlichte Dubey eine Arbeit, in der er die Infektosität und Pathogenität von Oozysten in der Ratte testete. Ratten, denen 10^5 Oozysten verabreicht wurde, überlebten mit Krankheitssymptomen wie Diarrhö oder Depression. 60% der Ratten, denen 10^6 Oozysten verfüttert wurde, starben an der Infektion. Wurde den Ratten zwischen $1\text{-}10^4$ Oozysten oral verabreicht, so entwickelten sie eine subklinische Infektion (Dubey, 1996).

1.5 Zusammensetzung und Funktion von Muttermilch

Kolostral- und Folgemilch der meisten Säugetierarten und des Menschen enthält viele lösliche und zelluläre Bestandteile, die neben der optimalen Ernährung der Neugeborenen immunologischen und antiinfektiösen Prozessen dienen. Das Risiko für Infektionen und Allergien soll vermindert werden. Durch die Aufnahme von Muttermilch werden die Nachkommen nicht nur bedarfsgerecht ernährt, sondern sind mit der Milch als möglicher Infektionsquelle zugleich einem großen Erregerspektrum aus dem mütterlichen Umfeld ausgesetzt. So ist beispielsweise die Möglichkeit einer Infektion des Kindes über die Milch im Falle von HIV sehr gut untersucht (Van de Perre et al., 1991; Ziegler et al., 1985). Newell et al. fanden 1997 heraus, dass die Wahrscheinlichkeit einer HIV-Infektion über die Milch bei 7 bis 22% liegt (Newell et

al., 1997). Das Vorkommen des humanen Zytomegalievirus (HCMV) in der Muttermilch ist ebenfalls seit mehr als 30 Jahren bekannt (Diosi et al., 1967). Milch gilt hier als einer der Haupttransmissionswege. Dass auch der Parasit *T. gondii* in Muttermilch vorhanden ist und über diesen Weg auf die Nachkommen übertragen wird, wurde bereits in 1.1.2 erwähnt.

Haupternährungsbestandteile der humanen Muttermilch sind Lactose, Lipide, Proteine und Peptide, Elektrolyte, Mineralien, Spurenelemente und Vitamine (Department of Health and Social Security, 1977; Gopalan et al., 1961). Sie stammen entweder direkt aus den mit reichlich sekretorischen Einheiten (ER, Golgi-Apparat) ausgestatteten, luminalen Epithelzellen des Brustdrüsengewebes, die sich zwei bis drei Wochen nach Beginn der Laktation auch in der Milch selbst nachweisen lassen (Rassin et al., 2001), oder werden durch aktive und passive Transportmechanismen aus dem Blut der Mutter gewonnen.

Zu den zellulären Komponenten der Milch gehören u. a. auch Monozyten-Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten (Smith and Goldman, 1968).

Die eigentliche Funktion der Makrophagen in der Muttermilch ist bislang noch ungeklärt, doch nimmt man an, dass sie neben der Biosynthese und Exkretion von Zellmediatoren u. a. als Transportvehikel für IgA fungieren (Pittard et al., 1977). Das intrazellulär in Makrophagen vorkommende IgA macht 10% der Gesamt-IgA Menge in der Milch aus (Clement et al., 1986). Weiter besitzen sie direkte zytotoxische Eigenschaften gegen Staphylococcus aureus und Escherichia coli und nehmen an der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zerstörung HSV1 (Herpes Simplex Virus Typ1) infizierter Zellen teil (Rassin et al., 2001).

Besonders in den ersten vier Tagen der Laktationsperiode enthält Muttermilch eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten, die im Verlauf konstant abnimmt (Rassin et al., 2001). Neutrophile haben vorwiegend phagozytäre Eigenschaften und sind mittels oxidativem Metabolismus an der Abtötung bzw. Inaktivierung von körperfremden Antigenen beteiligt.

Die Lymphozytengesamtpopulation der Milch setzt sich zu 80% aus T-Lymphozyten und zu 4–6%aus B-Lymphozyten zusammen (Wirt et al., 1992). Die T-Lymphozyten bestehen vorwiegend aus $CD4^+$-Helferzellen und $CD8^+$-Zytotoxische Zellen. Der Anteil der $CD8^+$-Zellen ist dabei in der Milch verhältnismäßig höher als im Blut (Rassin et al., 2001).

B-Zellen aus dem Darm- und Bronchialtrakt überwinden während der Schwangerschaft die Lamina propria des Brustdrüsengewebes, differenzieren sich zu Plasmazellen und produzieren Immunglobuline, die der Säugling dann über die Milch aufnimmt und somit einen Schutz gegen fast alle pathogenen Erreger, mit denen die Mutter vorher konfrontiert war, erhält. Sekretorisches IgA ist das am häufigsten vorkommende Immunglobulin in der humanen Muttermilch und besonders wirksam in der Bekämpfung gastrointestinal- und respiratorisch assoziierter Keime (Fishaut et al., 1981; Orskov and Sorenson, 1975). Seine Konzentrationen in der Milch sind vier- bis fünfmal höher als IgM, 20- bis 30-mal höher als IgG und fünf- bis sechsmal höher als das Serum-IgA (Ogra and Ogra, 1978). Die Antikörpertiter von IgA und IgM nehmen dabei in der ersten Woche der Laktation rapide ab, während die IgG-Titer keine wesentlichen Unterschiede im Verlauf der Laktationsperiode zeigen (Rassin et al., 2001).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war, *T. gondii* in der Rattenmilch mittels einer einfachen Nachweismethode darzustellen und die Übertragung des Parasiten nachzuweisen. Es sollte eine Melkvorrichtung für Ratten zur Milchgewinnung entwickelt und das experimentelle Arbeiten mit Milch ausgetestet werden.

Die immunologischen Konsequenzen einer Übertragung von *T. gondii* über die Muttermilch sollten in dieser Arbeit vorwiegend hinsichtlich der humoralen Immunantwort in Serum und Milch von F344 Ratten, die auf verschiedene Art und Weise (inkl. via Milch) und mit unterschiedlichen Parasitenstämmen infiziert wurden, analysiert werden. Berücksichtigt werden sollte dabei auch eine mögliche Korrelation zwischen Serum- und Milchantikörpern. Durch ein Immunisierungsexperiment sollte geklärt werden, ob es sich bei den nachgewiesenen Immunglobulinen im Serum der via Milch infizierten Nachkommen um maternale Antikörper oder eine eigenständige Immunantwort handelte.

Schließlich sollte untersucht werden, ob freie Tachyzoiten von *T. gondii* (Stamm RH und NTE), die von 48 Stunden alten F344 Ratten oral über die Muttermilch aufgenommen werden, eine Infektion bzw. Immunreaktion in den Jungtieren auslösen

können. Die Konzentration der Tachyzoiten sollte dabei unterschiedlich gewählt werden, um eine eventuelle Dosisabhängigkeit bestimmen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Versuchstiere

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten acht Wochen alte weibliche F344 Ratten, die entweder von den Charles River Labaratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, oder in den hausinternen Stallungen gezüchtet wurden. Für den Bioassay und die Gewinnung von Gehirnzysten wurden sechs bis acht Wochen alte Mäuse, Stamm NMRI (Charles River Laoratories), oder C57BL/6 (hauseigene Züchtung) verwendet. Die Tiere wurden in Makrolon Kunststoffkäfigen (Grundfläche 20 x 40 cm) auf Weichholzgranulat gehalten und erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum. Die Käfige adulter Ratten waren mit maximal drei, die Mauskäfige mit maximal zehn Tieren besetzt. Der Tierstall war klimatisiert und in einem zwölfstündigen Tag-Nachtrhythmus künstlich beleuchtet.

2.1.2 Reagenzien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma, Steinheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
CO_2	Kohlendioxid
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Deisenhofen
(3-(3-Cholamidopropyl)-Demethyl-amonio)-1-Propan Sulphonat (CHAPS)	Fluka, Buschs
2` Desoxynukleosid-5`-Triphosphat (dNTP)	MBI- Fermentas, Lithuania
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco` s Minimum Essential Medium (DMEM) mit Glutamax I	Gibco BRL, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA laboratories, Linz
Ficoll	Amersham, Uppsala
Gonadoliberin (GnRH)	Sigma, Deisenhofen
^{3}H-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Isofluran	Abbot GmbH, Wiesbaden
L(+)-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Gibco BRL, Eggenstein
$MgCl_2$	Ferak, Berlin
Na_2HPO_4	Ferak, Berlin
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Oxytocin	Sigma, Deisenhofen
PCR Mineralöl	Sigma, Steinheim
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Phenylmethylsulfonylfurid (PMSF)	Sigma, Steinheim
RPMI-1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Salzsäure (HCL)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trimethoprim-Sufamethoxazol	Ratiopharm, Ulm
Tris-(Hydroximethyl)-Aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Steinheim

2.1.3 Puffer und Kulturmedien

ATV	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS
Beschichtungpuffer (Zytokin ELISA)	0,2M Natriumphosphat (in 1l dH_20)

Blockpuffer/Verdünnungspuffer (für Zytokin ELISA)	PBS mit 10% FCS (hitzeinaktiviert)
DEPC Wasser	0,1 g DEPC in 1l destilliertem Wasser, autoklaviert
Diethanolaminpuffer	1 M Diethanolamin, 0,5 mM $MgCl_2$ pH 9,8
DMEM +	500 ml Dulbecco`s MEM mit Glutamax I (25 mM HEPES und Pyridoxin), ergänzt mit 50 ml SC, 25 ml FCS und 2,5 mg Amphotericin B
Medium zum Einfrieren von Zellen und Parasiten	DMEM + oder RPMI + mit 20% FCS und 10% DMSO
phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2 (PBS)	2,7 mM KCL, 1,45 mM KH_2PO_4 0,24 mM $MgCl_2$, 137 mM NaCl 6,5 mM Na_2HPO_4
RPMI +	500 ml RPMI-1640 ergänzt mit 40 ml SC
SC (sterilisiert, 50 ml/ Tube abgefüllt)	500 ml inaktiviertes FCS, 100 ml Natrium-Pyruvat (100 mM), 100 ml MEM, 100 ml Penicillin/Streptomycin 1000U/ml 5 ml 2-Mercaptoethanol (50 mM) 58,4 ml 5% Glutamin bei -20°C aufbewahrt
TBE (10 fach Puffer für PCR-Gel)	0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,3

Trypanblau Lösung	0,04% Trypanblau in PBS/BSA
Waschpuffer (ELISA)	1l PBS mit 0,05% Tween 20

2.1.4 Standardisierte Testsysteme

Diff-Quik® Färbeset (Giemsa)	Dade Behring, Marburg
DNA molecular weight marker	MBI Fermentas, Lithuania
Micro BCA protein assay kit	Pierce, Rockford
optEIA ELISA sets: IFN-γ	Pharmingen, Hamburg
10 x PCR buffer	Quiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden

2.1.5 Enzyme

Proteinase K	Quiagen, Hilden
HotStart DNA Polymerase	Quiagen, Hilden

2.1.6 Amplifizierungsprimer

(MWG Biotech, Ebersberg)

B1 Gen

PCR Produkt: 517 bp

11 (5 ' CAGCGTATTGTCGAGTAGAT 3 ')

12 (5 ' ACCGGAACTGTAATGTGATA 3 ')

PCR Produkt: 192 bp

3 (5 ' TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC 3 ')

8 (5 ' GGAACTGCATCCGTTCATGA 3 ')

2.1.7 Antikörper

Biotin-conjugated rat-anti mouse IgG	Sigma,Deisenhofen
Biotin-conjugated mouse-anti rat IgG_{2b}	Pharmingen, Hamburg
Biotin-conjugated mouse-anti rat IgM	Serotec, Oxford
Biotin-conjugated mouse-anti rat IgA	Pharmingen, Hamburg

2.1.8 Geräte

BD, Microtainer	Schubert, Wackersdorf
Centrex UF-2 10 kDa Tubes	Schleicher & Schuell, Dassel
Liquid scintillation counter	
(1205 Betaplate^{TM}) und Harvester	Wallac Oy, Turku, Finnland
Maxline microplate reader	Molecular Devices, Sunnyvale,CA
Melkmaschine	hausinterne Konstruktion
Mikro-Hämatokritröhrchen (heparinisiert)	Hartenstein, Würzburg
Narkoseapparatur	hausinterne Konstruktion
Potter tubes	Novodirect, Kehl
Fütterkanüle	Hauptner, Solingen
Schlauch SL0 4 1 m	Hartenstein, Würzburg
Thermocycler Perkin Elmer 480	Perkin Elmer
Wasserstrahlpumpe	Hartenstein, Würzburg
Zyto-Kammer mit Dichtung	
(1 x 4 ml; 12,4/120 mm^2)	Hettich
0,22 µm Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
3 µm Polycarbonat Membranen	Millipore, Eschborn

2.1.9 Parasitenstämme und Zellkultur

NTE	Prof. Uwe Gross, Universität Göttingen
Prugniaud-ß-gal	Prof. J.F.Dubremetz, Pasteur Institut Lille, Frankreich

RH	Prof. M.F. Cesbron-Delauw, Pasteur Institut, Lille Frankreich
HFF (Human Foreskin Fibroblasts)	Dermatologische Klinik Universität Würzburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Human Foreskin Fibroblasts (HFF) wurden in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 in Gewebekulturflaschen (Greiner, Nürtingen, Deutschland) gezüchtet.
Als Kulturmedium diente Dulbecco`s MEM mit Glutamax I (DMEM $^+$ Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland). Das Medium wurde alle zehn Tage gewechselt.
Alle sechs bis acht Wochen wurden die Zellen geteilt und neue Kulturen angesetzt. Hierzu wurde der Zellrasen einer 75 ml Flasche mit Hilfe von 3 ml ATV (Einwirkzeit 2 min) vom Flaschenboden gelöst, die HFF in Medium bei 1600 U/min 5 min lang zentrifugiert, das Zellsediment in 8 ml resuspendiert und jeweils 1 ml der Suspension in acht neue, mit 4 ml Medium gefüllte, 75 ml Flaschen gegeben. Diese wurden inkubiert und das Wachstum regelmäßig kontrolliert.

Um HFF in Zellkulturplatten (Greiner) mit 48 Vertiefungen für den Parasitennachweis in Rattenmilch zu züchten, wurde der Zellrasen einer 250 ml Gewebekulturflasche verwendet. Das Zellsediment wurde in 80 ml gelöst und je 500 µl der Suspension in jede Vertiefung gegeben. Die Platten wurden ebenfalls bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und das Medium alle acht bis zehn Tage gewechselt.

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von HFF

Die Zellen konnten in Gefriermedium, bestehend aus DMEM$^+$, 20% fetales Kälberserum (FCS) und 10% DMSO, in gefrierstabilen Röhrchen bei -140°C aufbewahrt werden. Die Vorgehensweise entsprach bis zur Gewinnung des

Zellsediments dem Splitten von Zellen. Das Sediment wurde dann direkt in 2 ml Gefriermedium resuspendiert und eingefroren.

Um gefrorene HFF in Kultur zu bringen, wurden sie in einem Wasserbad bei Raumtemperatur (RT) langsam aufgetaut, tropfenweise in ein mit 10 ml $DMEM^+$ gefülltes Zentrifugationsröhrchen (blue cap 15 ml) überführt und 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 5 ml $DMEM^+$ resuspendiert, in eine Gewebekulturflasche gegeben und wie unter 2.2.1 beschrieben inkubiert.

2.2.2 Parasitenkultur

2.2.2.1 Tachyzoiten

Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii* wurden in $DMEM^+$, dem 10% FCS, Penicillin (200 U/ml), Streptomycin (200 U/ml),1 mM Natriumpyruvat, 0,05% L-Glutamin und 0,025 2-Mercaptoethanol zugegeben worden war, bei 37°C und 5%CO_2 gezüchtet. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt. Abhängig vom Parasitenstamm zeigte sich drei bis zehn Tage nach der Infektion der Zellen ein lysierter Zellrasen. Um das Wachstum der Parasiten aufrecht zu erhalten, wurden drei Tropfen des Lysats bestehend aus Tachyzoiten, Medium und zerstörten HFF auf einen neuen Zellrasen gegeben.
Die Parasiten konnten analog dem Protokoll für HFF eingefroren und aufgetaut werden.

2.2.2.2 Gewebezysten

Da man Gewebezysten für die Infektion von Ratten benötigte, wurden acht Wochen alte NMRI Mäuse entweder mit 10^4 Tachyzoiten oder mit 20-50 Gewebezysten (Stamm Prugniaud), die aus homogenisierten Gehirnen infizierter Tiere stammten, intraperitoneal (i.p.) infiziert. Von Tag fünf bis zehn post infectionem (p.i.) wurden die Mäuse mit Trimethoprim (25 mg/100 ml) und Sulfamethoxazol (125 mg/100 ml) (Ratiopharm, Ulm), das über das Trinkwasser verabreicht wurde, behandelt. Die Mäuse dienten somit als Spender für Gehirnzysten zur Infektion von Versuchstieren. (Zystenpräparation und Infektion von Ratten s. 2.2.6.3)

2.2.3 Milchgewinnung und Verarbeitung

2.2.3.1 Aufbau der Melkmaschine (ohne Narkoseanlage)

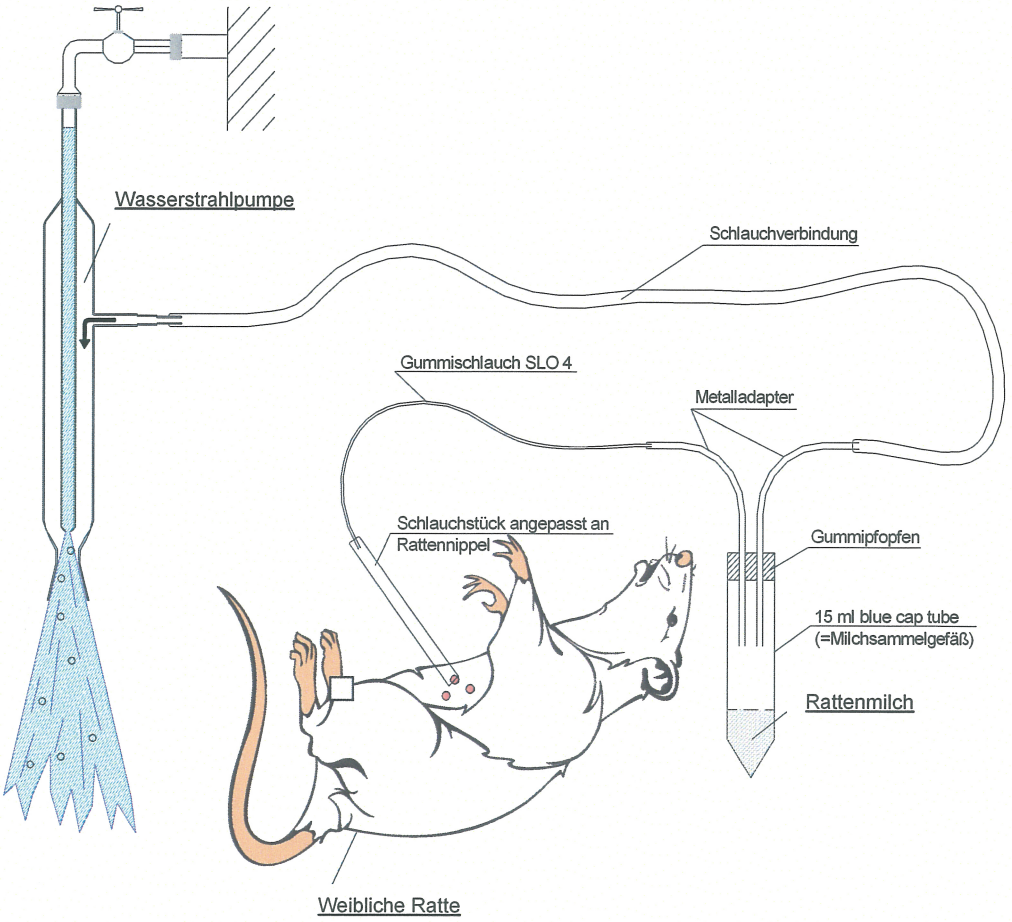


Abb. 3 Aufbau Melkmaschine

2.2.3.2 Melkvorgang und Bestandteile der Milch

Die Milch infizierter und naiver F344 Ratten wurde für eine Vielzahl von Experimenten benötigt. Für die Milchgewinnung wurde im Haus eine Melkvorrichtung (s. 2.2.3.1) entwickelt und ein Melkprotokoll entworfen. Als Ausgangsprotokoll diente die Methode von Rodgers (Rodgers, 1994), die stark modifiziert wurde.

Zwei Monate alte F344 Ratten wurden am 13. Tag ihrer Tragzeit mit 250 Zysten des Parasitenstammes Prugniaud oral infiziert (s. 2.2.6.3). 48 Stunden nach der Geburt wurde der Wurf auf sechs Junge pro Rattenmutter reduziert, um zu verhindern, dass die Jungtiere zuviel der Milch, die für die Experimente benötigt wurde, zu sich nahmen.

Die Ratten wurden jeden zweiten Tag, beginnend Tag zwei post partum (p.p.), bis Tag zehn p.p. gemolken.

Um die Milchproduktion anzuregen, wurden die Ratten 20 min vor Beginn des Melkens von den Jungtieren getrennt und jeder Ratte Oxytocin (Sigma, 2 U/Ratte) i.p. gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, kein Drüsengewebe zu verletzen. Die Jungtiere wurden für die Zeit der Trennung zur Wärmeisolierung abgedeckt. 20 min nach der Injektion wurden die Ratten mit 4%igem Isofluran (Narkoseeinleitung) narkotisiert. Nach Erreichen der Tiefschlafphase wurde den Ratten eine Gesichtsmaske, die über ein Schlauchsystem mit dem Narkosegerät verbunden war, übergestülpt und das Isofluran auf 1% reduziert (Narkoseerhalt). Die einzelnen Brustdrüsen wurden nun vorsichtig mit PBS (RT) befeuchtet und zwischen zwei Fingern massiert. Mit Hilfe des Vakuum-Milchsystems (s. 2.2.3.1) wurde die austretende Milch in einem 15 ml Röhrchen gesammelt.

Das Schlauchsystem wurde vor und nach jedem Melken mit 70%igem Ethanol und PBS durchspült, um Verschmutzung und bakterielle Besiedelung gering zu halten.

Die Dauer des Melkens wurde stets auf 20 min beschränkt.

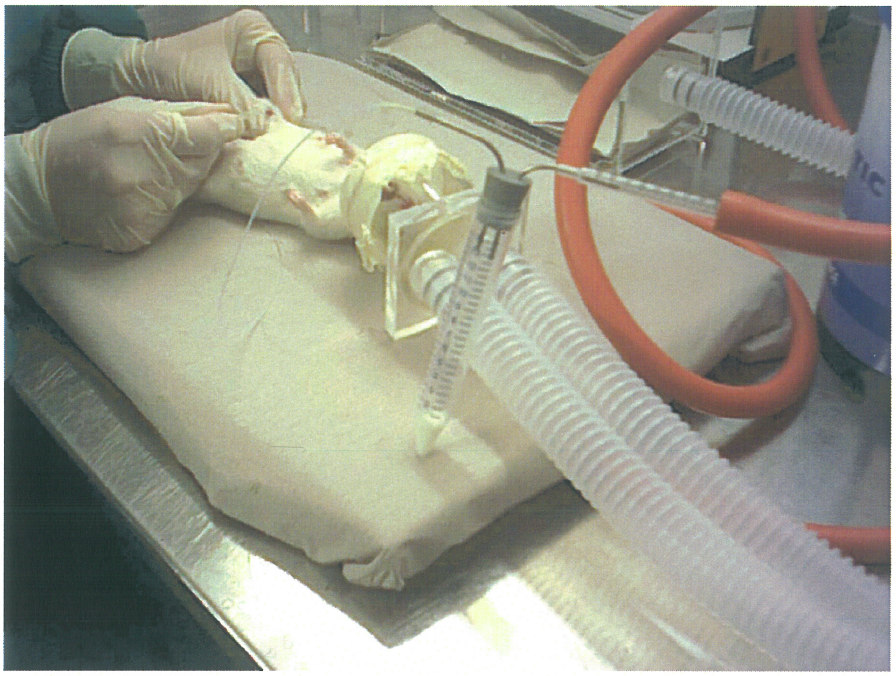


Bild: Melken einer F344 Ratte

Es war möglich zwischen 500 und 1200 µl Milch pro Ratte zu erhalten. Dabei war die Milchmenge 48 Stunden p.p. eher gering (500 µl), stieg bis zu Tag 16 p.p. an (1200 µl) und nahm im weiteren Verlauf wieder ab, bis schließlich ab Tag 24 p.p. keine Milch mehr gewonnen werden konnte.
Um die Milch auf das Vorhandensein von *T. gondii* zu testen, wurden 100-200 µl der frischen Milch abgenommen und in NMRI Mäusen ein Bioassay durchgeführt (s. 2.2.4.1). Die restliche Milch wurde zu einem Volumen von 3 ml mit PBS verdünnt und bei RT mit 3200 rpm 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation trennte sich die Milch in drei Phasen auf. Die oberste Schicht war Fett und wurde verworfen. Darunter befand sich eine wässrige Phase (Interphase), die wenige Zellen und Fett enthielt. Diese Schicht wurde bei -20°C aufbewahrt und zur Antikörperbestimmung (IgG2b, IgM; s. 2.2.7.3) gegen *T. gondii* herangezogen. Die unterste Schicht war ein Sediment, das vor allem aus feinen Fetttropfen und Zellen bestand. Wurden Tachyzoiten in vitro in hoher Konzentration in die Milch gegeben, so fanden sie sich nach dem Zentrifugieren in dieser Schicht. Das Sediment wurde demzufolge resuspendiert, nochmals in 9 ml PBS gewaschen und mit 500 µl PBS in Lösung gebracht. Zweimal 200 µl wurden auf in Kultur gebrachte HFF gegeben und auf Parasitenwachstum kontrolliert (s. 2.2.4.1). Die verbleibenden 100 µl der Suspension wurden für den Parasitennachweis mittels PCR verwendet (s. 2.2.10.2).

2.2.4 Visueller Parasitennachweis

2.2.4.1 Parasitennachweis in der Milch inokulierter Ratten mittels HFF

Es wurden drei, zwei Monate alte F344 Ratten verpaart und am 13. Tag ihrer Tragzeit mit 250 *T. gondii* Zysten (Stamm Prugniaud) oral inokuliert (s. 2.2.6.3). Von Tag zwei bis Tag zehn p.p. wurden die Ratten jeden zweiten Tag mit der unter 2.2.3 beschriebenen Melkvorrichtung gemolken. Von der frischen Milch jeder Ratte wurden 100-200 µl abgenommen, mit 100 bzw.200 µl PBS verdünnt und jeweils zwei NMRI Mäusen 150 µl der Suspension i.p. gespritzt (Bioassay). Den Mäusen wurde vier Wochen p. i. Blut über den retroorbitalen Venenplexus entnommen und auf Antikörper gegen *T. gondii* (s. 2.2.7.3) getestet. Außerdem wurden die Gehirne sechs Wochen p.i. präpariert und auf Zysten untersucht.

Die restliche Milch wurde zu einem Volumen von 3 ml mit PBS verdünnt, bei 3200 rpm 30 min zentrifugiert und die oben schwimmende Fettschicht und darunter liegende Interphase entfernt. Das Milchsediment wurde in 1 ml PBS resuspendiert, mit 8 ml PBS verdünnt und nochmals bei 3200 rpm 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das so gereinigte Sediment in 500 µl PBS wieder in Lösung gebracht. HFF, die in Zellkulturplatten mit 48 Vertiefungen (s. 2.2.1) gezüchtet worden waren, wurden nun mit je 200 µl/Vertiefung resuspendiertem Milchsediment inokuliert (zweimal 200 µl pro Ratte pro Melktag). Nach 48 Stunden wurde das Medium der Zellen gewechselt. Das Parasitenwachstum wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Bis zum visuellen Nachweis von *T. gondii*, der im positiven Falle im Schnitt zehn Tage betrug, wurde das Medium alle vier bis fünf Tage ausgetauscht.

2.2.4.2 Parasitenanreicherung über Dichtegradienten

Um Parasiten in der Milch infizierter Ratten mit dem Mikroskop nachzuweisen, wurde versucht, sie mit Hilfe verschiedener Methoden sichtbar zu machen.

2.2.4.2.1 Percoll Gradient

Naive F344 Ratten wurden am Tag 16 p.p. gemolken und die Milch mit
10^5 Tachyzoiten (Stamm RH) versetzt. Die Milch wurde bis zu einem Volumen von 9 ml mit PBS verdünnt, bei 3200 rpm (3000g) 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 3 ml 20%iger Percoll-Lösung (Percoll, Amersham Pharmacia Biotech Uppsala; RPMI, Gibco BRL Eggenstein; 5% FCS) resuspendiert. 40, 60, und 80%ige Percoll Lösungen (je 3 ml) wurden in aufsteigender Konzentration unter die 20%ige Suspension gegeben. Der entstandene Percoll Gradient wurde bei 2500 rpm (2000g) 30 min zentrifugiert.
Zwischen der 80- und 60%igen bzw. 60- und 40%igen Percollschicht fanden sich Zellringe, am Grund des 15 ml Röhrchens ein Zellsediment. Sowohl Zellringe als auch Sediment wurden abgenommen, mit Trypanblau 1:10 gefärbt und unter dem Mikroskop auf Parasiten untersucht.

2.2.4.2.2 Ficoll Gradient

Es wurde analog Protokoll 2.2.4.2.1 verfahren. Das gewonnene Milchsediment wurde allerdings in 1 ml PBS resuspendiert und 3 ml Ficoll (Ficoll-Isopaque, Amersham, Uppsala) unter die Suspension gegeben. Nach 30 min Zentrifugation bei 2000 rpm (1200g) entstand ein trüber Zellring und ein Zellsediment, die unter dem Mikroskop auf Parasiten gesichtet wurden.

2.2.4.3 Zytospin-Zenrifugation und Giemsa Färbung

Milch oral infizierter F344 Ratten und Milch naiver Tiere, die in vitro mit 10^5 Tachyzoiten (Stamm RH) versetzt worden war, wurde mit PBS verdünnt und zentrifugiert (s. 2.2.4.2.1). Die Sedimente wurden in 1 ml PBS resuspendiert. 100µl jeder Suspension wurden auf einen Objektträger in eine Zyto-Spin - Zentrifugationsvorrichtung (Zyto-Kammer mit Dichtung 1 x 4 ml, dm 12,4/120mm^2, Hettich) gegeben und bei 1300 rpm (1000g)10 min zentrifugiert. Als Positivkontrolle dienten 10^5 Tachyzoiten in PBS. Nach der Zentrifugation wurden die Objektträger vorsichtig herausgelöst, an der Luft getrocknet und einer Giemsa Färbung (Diff-Quick, Dade Behring GmbH, Marburg) unterzogen. Die Objektträger wurden 2 min in Methanol (Fixierlösung, Fast Green 0,002g/L), 1 min in Eosin G (Färbelösung I in Phosphatpuffer pH 6,6, 1.22 g/l) und 1 min in Thiazin Farbstoff (Färbelösung II in Phosphatpuffer pH 6,6, 1,1 g/l) getaucht. Anschließend wurden die gefärbten Präparate mit destilliertem Wasser gespült, an der Luft getrocknet und unter dem Mikroskop auf Parasiten durchsucht.

2.2.5 *T. gondii* Antigen Gewinnung

2.2.5.1 *T. gondii* Antigen (TAg)

Nach dem Protokoll von Gazzinelli et al. wurde das Antigen, das zum Zytokinnachweis und für die Proliferationsassays diente, folgendermaßen hergestellt (Gazzinelli et al., 1991).
Die Parasiten (Stamm RH) aus viermal 250 ml Zellkulturflaschen wurden gefiltert

(3 µm Polycarbonat Membran Millipore), der Filter jeweils zweimal mit 10 ml PBS durchspült und das Filtrat bei 1600 rpm 10 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 2 ml PBS resuspendiert und die Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF, 2 mM) (Sigma, Steinheim; Deutschland) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 2 mM) (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben. Um die Parasitenmembranen zu zerstören, wurde die Suspension jeweils achtmal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend im 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut und bei 2500 rpm (2000g) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.
Die Proteinkonzentration konnte mittels Micro BCA Assay Kit (Pierce, Rocford, Il, USA) bestimmt werden.

2.2.5.2 *T. gondii* crude extract (TCE)

TCE wurde für den spezifischen Antikörpernachweis gegen *T. gondii*- Antigen in Mäuse- und Rattenserum im ELISA verwendet. Es wurde mit leichten Abweichungen nach dem Ausgangsprotokoll von Zenner et al. hergestellt (Zenner et al., 1999).
7,5 x 10^8 Tachyzoiten (Stamm RH) wurden nach Filtration und Zentrifugation (s. 2.2.5.1) in 5 ml PBS, das mit 2 mM PMSF und 2 mM EDTA versetzt worden war, resuspendiert, die Suspension sechsmal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im 37°C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Die nun zerstörten Tachyzoiten wurden bei 36000 g und 4°C 90 min zentrifugiert und der gewonnene Überstand (S1) eingefroren. Das Sediment wurde wieder in 5 ml PBS, dem die Proteaseinhibitoren PMSF (40 µM), EDTA (2 mM) und 3-(3 Cholamidopropyl)-Dimethylammonio)-1-Propansulphonat (CHAPS, 9,75 mM) (Fluka, Schweiz) zugegeben worden waren, resuspendiert. Unter leichter Rotation wurde die Suspension bei 4°C über Nacht inkubiert und im Anschluss bei 1370 g 30 min zentrifugiert. Der Überstand (S2) wurde bei -20°C aufbewahrt. S1 und S2 wurden vor Gebrauch 1:1 gemischt und die Proteinkonzentration mittels Micro BCA Protein Assay Kit bestimmt.

2.2.5.3 *T. gondii* excreted secreted Antigen (ESA)

Die Herstellung erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll von Zenner et al. (Zenner et al., 1999). Tachyzoiten (Stamm RH) wurden gefiltert, zentrifugiert (s. 2.2.5.1) und gezählt. 2 x 10^8 Parasiten wurden in 7,2 ml RPMI-1640 (Gibco BRL) und 10% hitzeinaktiviertem Rattenserum resuspendiert und unter leichter Rotation bei 37°C 3 h inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 g für 10 min wurde der Überstand in Centrex UF-2 10 kDa tubes (Schleicher und Schüll) pipettiert und nochmals zentrifugiert. Dadurch wurde das ESA 4-fach konzentriert. Anschließend wurde es gefiltert (0,22 µm Filter, Schleicher und Schüll) und 4 µg/ml Aprotinin (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Bis zur Verwendung wurde das Antigen bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.6 Inokulieren von trächtigen Ratten und Austausch der Neugeborenen

2.2.6.1 Auslösen der Ovulation und Bestimmung der Tragzeit

Da der genaue Tag der Tragzeit trächtiger Ratten wichtig für die Infektion mit *T. gondii* war, wurde acht Wochen alten Ratten, um einen Eisprung auszulösen, 200 µl rekombiniertes Gonadotropin (GnRH, Sigma, Stocklösung 200 µg/ml) i.p. injiziert. Der Tag der Injektion wurde mit „Tag -4“ bezeichnet. Am Abend von Tag 0 wurden die Weibchen verpaart. Mit einem Wattestäbchen wurde am nächsten Morgen ein Abstrich entnommen und auf vorhandene Spermien untersucht. Dazu wurde der Abstrich auf einen Objektträger überführt, zwei Stunden bei RT getrocknet, eine Minute mit 10% Methylenblau gefärbt, mit Wasser gespült und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Fanden sich Spermien, galt die Ratte als trächtig (Tag eins der Tragzeit).

2.2.6.2 Intravenöse Inokulation trächtiger Ratten mit Tachyzoiten

Acht Wochen alte F344 Ratten wurden verpaart (s. 2.2.6.1). Am Tag 13 ihrer Tragzeit wurde das Lysat einer 75 ml Zellkulturflasche, die drei bis vier Tage zuvor mit Tachyzoiten (Stamm RH) infiziert worden war, gefiltert (3 µm Polycarbonat Membran Millipore, Eschborn, Deutschland) und der Filter zweimal mit 10 ml PBS durchspült. Das Filtrat wurde bei 1600 rpm 10 min zentrifugiert, in PBS resuspendiert und die

Parasiten in einer Neubauer Kammer gezählt. Um zu garantieren, dass die Ratten mit lebendigen Parasiten infiziert wurden, wurden die Tachyzoiten vor dem Auszählen mit Trypanblau (Vitalfarbstoff) angefärbt und kontrolliert. Jeder Ratte wurden 10^7 Parasiten in 200 µl PBS mit Hilfe einer Tuberkulinspritze und einer 25 G 5/8 Nadel in die Schwanzvene gespritzt.

2.2.6.3 Orale Inokulation trächtiger Ratten mit Zysten

Trächtige F344 Ratten wurden am 13. Tag ihrer Tragzeit mit Gehirnzysten des Parasitenstammes Prugniaud oral inokuliert.
NMRI Mäuse, die ein bis zwei Monate zuvor i.p. infiziert worden waren (s. 2.2.2.2), wurden getötet, das Gehirn vorsichtig entnommen und das Zerebellum entfernt. In einem Gewebehomogenisator (Novodirect, Kehl, Deutschland) wurde das restliche Hirn in 1 ml PBS, dem Penicillin und Streptomycin zugegeben worden war, homogenisiert und fünfmal 10 µl unter dem Mikroskop mit 100 facher Vergrößerung auf Zysten untersucht. Jeder Ratte wurden 200-250 Zysten in 200-500 µl Gehirnsuspension mittels Fütterkanüle (Hauptner, Solingen, Deutschland) oral verabreicht.

2.2.6.4 Austausch der Neugeborenen

Um die Übertragung von *T. gondii* über die Muttermilch nachzuweisen, wurden die neugeborenen Nachkommen nicht infizierter Ratten von oral infizierten Ammenmüttern gesäugt. Acht Wochen alte F344 Ratten wurden in zwei Gruppen geteilt, in Zyklus gebracht (s. 2.2.6.1) und verpaart. Gruppe eins wurde am 13. Tag ihrer Tragzeit mit 250 Gehirnzysten (Stamm Prugniaud) oral inokuliert (s. 2.2.6.3), während Gruppe zwei unbehandelt blieb. Unmittelbar nach der Geburt wurden die Nachkommen ausgetauscht. D. h. in utero infizierte Tiere wurden von naiven Ammenratten gesäugt und naive Rattenjunge wurden von infizierten Ammenmüttern gesäugt.

2.2.7 Bioassay und Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii* Antigen in Ratten-und Mäuseserum

2.2.7.1 Bioassay in Mäusen und Serumgewinnung

Um nachzuweisen, dass eine Infektion mit *T. gondii* stattgefunden hat, wurden die Gehirne inokulierter Ratten acht Wochen p.i. entnommen und wie in 2.2.6.3 beschrieben auf Zysten untersucht. Konnten keine Zysten gefunden werden, wurde jeweils zwei sechs bis acht Wochen alten NMRI oder C57BL/6 Mäusen 150-200 µl des untersuchten Gehirns einer Ratte i.p. gespritzt. Zuvor wurde den Mäusen unter tiefer Narkose mit einer heparinisierten Mikropipette (20 µl End to End, Hartenstein) Blut über den retroorbitalen Venenplexus entnommen und vier Wochen nach der i.p. Injektion nochmals. Die Seren wurden in doppelter Ausführung im ELISA (s. 2.2.7.3) auf IgG Antikörper getestet.
Sechs Wochen p.i. wurden die Gehirne der Mäuse ebenfalls auf Zysten untersucht. Fanden sich Zysten, galt dies als Infektionsnachweis.

2.2.7.2 Gewinnung von Rattenserum

Ratten wurden auf verschiedenen Wegen mit *T. gondii* inokuliert. Um eine erfolgreiche Infektion nachzuweisen, wurde den Tieren vor der Inokulation (negative Kontrolle) und vier bzw. acht Wochen nach der Infektion mit einem heparinisiertem Haematokritröhrchen (Hartenstein) wie unter 2.2.7.1 beschrieben Blut entnommen.

2.2.7.3 Bestimmung von Antikörpern gegen *T. gondii* mittels ELISA

Der Gehalt an parasitenspezifischen Antikörpern in den Seren der inokulierten Tiere wurde durch einen indirekten ELISA bestimmt.
Nach dem Protokoll von Zenner et al. wurden ELISA Microtiter plates (Nunc Immunomudule MaxiSorp F16, Rosklide, Dänemark) mit TCE (10 µg/ml in PBS) beschichtet (100 µl/Vertiefung) und über Nacht bei 4°C inkubiert (Zenner et al., 1999) Die Platten wurden dreimal mit 200 µl/Vertiefung PBS pH 7,2 und Tween 20 (Sigma,

Steinheim) gewaschen. Dieser Waschgang wurde nach jedem weiteren Schritt wiederholt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl/Vertiefung PBS und 1% Bovines Serum- Albumin (BSA, Sigma) eine Stunde bei RT blockiert. Serum, das zuvor in PBS, 1% BSA 1:100 (Ratten) bzw. 1:50 (Mäuse) verdünnt worden war, wurde zu je 200 µl aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. 100 µl Biotin konjugierte Antikörper gegen Rattenantikörper (biotin-conjugated mouse anti-rat isotype IgG1, Verdünnung 1:1000; IgG2b 1:2000 und IgA 1:1000, Pharmingen, Hamburg, Deutschland) bzw. gegen Mäuseantikörper (biotin-conjugated anti mouse IgG, Verdünnung 1:1000, Sigma) wurden für eine Stunde bei RT zugegeben. Anschließend wurden die Vertiefungen mit je 100 µl Streptavidin-AP-Konjugat (Verdünnung 1:5000, Roche Diagnostics, Mannheim) beschichtet. Die Einwirkzeit betrug eine Stunde bei RT. Das Substrat p-Nitrophenyl- Phosphat (5 mg pNPP, Sigma), das zuvor in 10 ml 1M Diethanolamin (pH 9,8) und 0,05 M $MgCL_2$ gelöst worden war, wurde zu je 100 µl/Vertiefung zugegeben und die Platten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde die Absorption bei 405 nm in einem MAXline microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen und als optische Dichte (OD) angegeben.

Die Seren wurden in Doppelbestimmung im ELISA (s. 2.2.7.3) auf die Antikörper IgG2b, IgM und IgA getestet, wobei darauf geachtet wurde, dass Proben verschiedener Zeiträume im selben ELISA gemessen wurden. Außerdem wurden stets drei Positivkontrollen, Verdünnungspuffer ohne Serumprobe als Leerkontrolle und 6 Seren nicht infizierter Tiere (= Negativkontrollen) mitgetestet.

2.2.8 Orale Inokulation 48 Stunden alter F344 Ratten

48 Stunden alte Jungtiere naiver F344 Ratten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tachyzoiten (Stamm RH und NTE) mittels schmaler, abgerundeter Fütterkanüle (Hauptner, Solingen) oral inokuliert.

Die Parasiten wurden gefiltert (s. 2.2.6.2) und Konzentrationen von 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 und 10 Tachyzoiten pro 50 µl PBS angesetzt. Frisch gemolkene Milch (s. 2.2.3) der naiven Muttertiere wurde gepoolt und 100 µl jedem Ansatz zugegeben. Drei Tieren wurde jeweils 10^5 Parasiten pro 150 µl (Milch + PBS) vorsichtig oral verabreicht. Mit den anderen Konzentrationen wurde analog verfahren.

Nach vier und acht Wochen p.i. wurde Blut über den retroorbitalen Venenplexus entnommen und das Serum auf spezifische Antikörper getestet (s. 2.2.7.3). Im Alter von acht Wochen wurden die Ratten getötet, die zelluläre Immunantwort (s. 2.2.11 u.12) untersucht und die Gehirne mikroskopiert, um Zysten zu finden (s. 2.2.6.3).

2.2.9 Immunisierung adulter F344 Ratten und Austausch der Neugeborenen

Sechs F344 Ratten wurden im Alter von acht Wochen verpaart und in zwei Gruppen zu je drei Ratten aufgeteilt. Gruppe eins wurde am 13. Tag ihrer Tragzeit mit einer Mischung aus 120 µl TAg/TiterMax (60 µl TAg (1,3 mg/ml) + 60 µl TiterMax (Alexis, Grünberg)), die unmittelbar vorher hergestellt worden war, intramuskulär (i.m.) immunisiert. Vor der Injektion wurde Blut abgenommen. Nach der Geburt der Jungtiere wurden die Nachkommen immunisierter Rattenmütter mit den Nachkommen nicht immunisierter Ratten ausgetauscht. Blut und Milch wurde den Rattenmüttern von Tag zwei bis Tag zehn p.p. jeden zweiten Tag abgenommen und zusammen mit den Seren der Nachkommen, denen Blut im Alter von zwei und acht Wochen abgenommen worden war, im ELISA auf spezifische Antikörper gegen *T. gondii* Antigen getestet.

2.2.10 DNA-Extraktion und PCR zum Nachweis des B1 Gens von *T. gondii*

2.2.10.1 DNA-Extraktion

Die DNA Isolierung wurde mit den Reagenzien und nach dem Body Fluid Spin Protokoll von QIAmp Tissue DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt.
Als Proben dienten die Milch oral infizierter Ratten Tag zwei bis Tag zehn nach der Geburt, 10^4, 10^3, 10^2, 10 und 1 Tachyzoit (Stamm RH) in Milch, 10^5 und 10^3 Parasiten (Stamm RH) in PBS und die Milch nicht infizierter Ratten.

2.2.10.2 PCR

Ziel war es, das B1 Gen von *T. gondii* mittels nested PCR in der Milch infizierter F344 Ratten nachzuweisen.

Im ersten PCR-Durchlauf wurde eine 517 bp-Gensequenz mit den Primern 11 und 12 (s.u.) und hieraus in einem weiteren Durchlauf mit den Primern 3 und 8 (s.u.) eine 192 bp Sequenz amplifiziert.
Folgender Ansatz wurde zu einer Reaktionslösung vermischt.

Ansatz1:

DNA (s. Proben) 1 µl

Primer-Mischung (11+12) 1 µl:

- 0,4 µM Primer 11 (5 ' CAGCGTATTGTCGAGTAGAT 3 ')
- 0,4 µM Primer 12 (5 ' ACCGGAACTGTAATGTGATA 3 ')

dNTP 1 µl (100 µM MBI Fermentas, Lithuania)

PCR Puffer:

- 1,5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN), 2,5 µl

0,625 U Hotstart DNA Polymerase (QIAGEN), 0,125 µl

dH_20 19 µl

Für die zweite PCR wurde 1 µl der amplifizierten DNA aus dem 1. Durchlauf und 1 µl der Primer Mischung 3+8 verwendet. Der übrige Ansatz entsprach dem der ersten PCR.

Primer Mischung (3+8):

- 0,4 µM Primer 3 (5 ' TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC 3 ')
- 0,4 µM Primer 8 (5 ' GGAACTGCATCCGTTCATGA 3 ')

PCR Reaktionsparameter

1. 15 min Inkubation bei 95°C
2. 10 (bzw. 30 für die 2. PCR) Zyklen:
   1 min 30 s bei 94°C (Denaturierung)
   2 min bei 55°C (Annealing)
   3 min bei 72°C (Polymerisation)
3. 7 min Inkubation bei 72°C

Gerät: Thermocycler (Perkin Elmer 480)

Die Amplifikate wurden mit sechsfach Blaupuffer 1:5 gemischt und durch eine Gelelektropherese mit 2% Agarose (Roth, Karlsruhe, in TBE und Ethidiumbromid gelöst), bei 120 Volt und 330 Miliampere aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem Transilluminator fotografiert. Anhand eines mitlaufenden DNA Markers konnten die entstehenden Banden zugeordnet werden.

2.2.11 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Um die zelluläre Immunantwort von F344 Ratten, die mit *T. gondii* inokuliert worden waren, zu testen, wurden die Tiere unter Äthernarkose ausgeblutet, mit 70%igem Ethanol besprüht und dorsal auf einer Styroporplatte fixiert. Zunächst wurde das Mesenterium freigelegt, die dort befindlichen Lymphknoten (Lk) mit zwei sterilen Pinzetten entfernt und in eine Petrischale mit 10 ml RPMI Medium gegeben. Danach wurde die Milz mit Pinzette und Schere vom Bindegewebe gelöst und ebenfalls in eine Petrischale mit 10 ml RPMI gelegt. Milz und Lk wurden nun mit einem sterilen Spritzenkolben durch Zellsiebe in Medium passiert. Die Zellsuspensionen wurden in 50 ml blue cap Zentifugationsröhrchen überführt und bei 1600 rpm, 10 min bei 4°C zentrifugiert. Um die Erythrozyten der Milzzellsuspension zu eliminieren, wurde sie mit 0,83% Amonium Chlorid in 20 mM Tris Puffer, pH 7,2 behandelt. Dazu wurde das Zellsediment nach dem Zentrifugieren in 1 ml dieser Lösung resuspendiert, mit Medium aufgefüllt und 10 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschgang wiederholt. Die Lk-Zellsuspension wurde ebenfalls gewaschen. Die Zellsedimente wurden resuspendiert und bis zu einem Volumen von 10 ml mit Komplettmedium (RPMI-1640 (GIBCO), 10% FCS, Penicillin (200 U/ml), Streptomycin (200 U/ml), 1 mM Natriumpyruvat, 0,05%L-Glutamin und 0,025 mM 2-Mercaptoethanol) aufgefüllt. Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Lymphozyten pro ml wurden je 90 µl der Zellsuspensionen mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden auf 2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl in die Vertiefungen einer 96iger Zellkulturplatte (Greiner) pipettiert. In Dreifachansätzen wurden die Zellsuspensionen mit dem Mitogen Concanavalin A (ConA 5 µg/ml) und den Antigenen TAg (10 µg/ml) und ESA (10 µg/ml) im Brutschrank bei 37°C feuchter Atmosphäre und 5% CO_2 inkubiert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Ansätze. Der

Zeitraum der Inkubation betrug für die Mitogenstimulation drei und für die Antigenstimulation fünf Tage. Vor Ablauf der letzten 18 Inkubationsstunden wurden die Ansätze mit radioaktiv markierter Thymidinlösung (^{3}H-Thymidin, 0,5 µCi/Vertiefung) versetzt und weiter inkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen mittels einer Absaugvorrichtung (Cell Harvester) auf Glasfasermatten abgeerntet. In einem Szintillationszähler (ß-plate reader, Wallac Oy, Turku, Finland) wurde dann der radioaktive Zerfall des von proliferierenden Zellen in neu gebildete DNS eingebauten ^{3}H-Thymidins bestimmt und als Zerfall pro min (counts per minute (cpm)) angegeben. Die Stimulationsindizes berechneten sich aus dem Quotienten aus der absoluten Radioaktivität der stimulierten Zellen durch die Radioaktivität der unstimulierten Zellen (Medium).

2.2.12 Zytokinproduktion in Überständen von in vitro stimulierten Milz- und Lymphknotenzellen

Zellen wurden wie zuvor für den Lymphozytentransformationstest (s. 2.2.11) beschrieben isoliert. 2 x 10^6 Zellen/ml (Milz-und Lymphknoten) wurden in Zellkulturplatten (Greiner) mit 24 Vertiefungen überführt und für 72 Stunden mit den gleichen Mengen Antigen und bei gleichen Bedingungen wie im LTT beschrieben stimuliert, bzw. unstimuliert als Kontrolle belassen. Die Überstände wurden anschließend abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand erfolgte mittels bereits optimierter und kommerziell erhältlicher „Sandwich-ELISA“ Testsysteme von Pharmingen (OptEIA set). Es wurde strikt nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die Werte wurden mit Hilfe der in jeder Platte mitgeführten Standards in pg/ml umgerechnet.

3. Ergebnisse

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär lebender Parasit, der unterschiedlich und in verschiedenen Vegetationsformen (1.2.2) übertragen wird.

Dass Tachyzoiten nicht nur in Blut, Lymphe und anderen Körperflüssigkeiten, sondern insbesondere auch in der Milch verschiedener Wirtstiere vorkommen, wurde bereits mehrfach beschrieben, jedoch fehlte bislang der Nachweis von *T. gondii* in der Rattenmilch mittels einer einfachen Methode, abgesehen von PCR und dem indirekten Nachweis über die Nachkommen (Tauschexperimente), oder Bioassay in Mäusen. So wurde zunächst, nach der Entwicklung einer Melkvorrichtung, ausgetestet, wie sich das Arbeiten mit Milch gestaltete und ob ein direkter visueller Parasitennachweis mittels Mikroskopie möglich wäre. Daneben wurde versucht, den Parasiten in der Muttermilch über das bereits etablierte HFF-Zellsystem, das für die Anzucht von *T. gondii* verwendet wird, nachzuweisen. Zur Kontrolle und zur Überprüfung der Sensitivität des Testsystems wurden parallel Bioassays und Polymerasekettenreaktionen durchgeführt (3.1).

Zur Durchführung der Versuche wurden F344 Ratten mit *T. gondii* inokuliert. Ob tatsächlich eine Infektion stattgefunden hat, wurde über den Nachweis von Gehirnzysten, einem positiven Bioassay und über spezifische Antikörper kontrolliert. Beim Nachweis von Antikörpern war aus vorherigen Versuchen bekannt, dass IgG2b im Serum von Nachkommen infizierter Mütter nach 4 Wochen in hoher Konzentration vorhanden, dann aber stark rückläufig war (Sepúlveda Arias, PhD; nach einem Monat 64% der Tiere positiv für IgG2b, nach zwei Monaten 4,8%). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den nachgewiesenen Immunglobulinen um Produkte der maternalen und nicht um eine eigenständige Immunantwort handelt. Um hierfür einen Nachweis zu liefern, wurden Ratten immunisiert, die Nachkommen ausgetauscht (so dass naive Jungtiere von immunisierten Müttern gesäugt wurden = Aufnahme über die Milch) und Serum und Milch der Ratten auf Immunglobuline getestet (3.2).

Es ist bekannt, dass *T. gondii* über die Milch übertragen wird. Allerdings weiß man noch immer nicht in welcher Form, d.h. als freier Tachyzoit, intrazellulär, oder z. B. an Antikörper gekoppelt, und ob eine Infektion der Nachkommen dosisabhängig ist. Die Übertragung des Parasiten über die Milch als freier Tachyzoit wurde in 3.3 simuliert.

Dazu wurden 48 Stunden alte Jungtiere oral mit verschiedenen Parasitendosen inokuliert und die Immunantwort getestet.
In 3.4 wurde schließlich die natürliche Inokulation von trächtigen Ratten mit *T. gondii* simuliert, d.h. die orale Aufnahme von Gewebezysten. Die Nachkommen der inokulierten Ratten wurden wieder durch naive Jungtiere ausgetauscht und die humorale Immunantwort in Serum und Milch getestet.

3.1 Nachweis von *T. gondii* in der Milch von F344 Ratten

3.1.1 Arbeiten mit Milch und visueller Parasitennachweis

Um mit Milch arbeiten zu können, war es wichtig zu wissen, wie viel Milch gewonnen werden kann, wie sich das Arbeiten mit Milch gestaltete und wo in der Milch eventuell vorkommende freie Tachyzoiten von *T. gondii* gefunden werden konnten.

Drei F344 Ratten wurden verpaart und 48 Stunden nach der Geburt nach einem selbst entworfenem Melkprotokoll (s. 2.2.3.1/2) jeden zweiten Tag bis Tag 24 p.p. gemolken. Verwendet wurde die Melkvorrichtung auf Seite 26, die ebenfalls im Haus entwickelt wurde. Die Milch wurde in 15 ml Röhrchen gesammelt und die Menge bestimmt. Das in der Milch enthaltene Fett wurde größten Teils von der Milch durch Verdünnung mit PBS und anschließendem Zentrifugieren bei Raumtemperatur separiert. Die einzelnen Phasen, die sich daraufhin gebildet hatten, wurden unter dem Mikroskop untersucht.
Um das Vorkommen freier Tachyzoiten zu simulieren, wurden hohe Konzentrationen von *T. gondii* (Stamm RH), frisch gemolkener Milch zugegeben, diese wieder verdünnt, zentrifugiert und die einzelnen Phasen unter dem Mikroskop verglichen.

Milchmenge

Es war möglich, zwischen 400 und 1200 µl Milch pro Ratte zu erhalten. Dabei war die Milchmenge 48 Stunden nach der Geburt gering (400 µl), stieg bis zu Tag 16 p.p. an (1200 µl) und nahm im weiteren Verlauf wieder ab, bis schließlich ab Tag 24 p.p. keine Milch mehr produziert wurde.

Milch nach Zentrifugation

Nach der Zentrifugation trennte sich die Milch in drei Phasen auf:

Lipidschicht

Wässrige Phase (Interphase)

Zellsediment

Die oberste Phase stellt sich unter dem Mikroskop als Lipidschicht dar und wurde verworfen. Darunter befand sich eine wässrige Phase, in der unter dem Mikroskop lediglich ein paar feine Fetttropfen und wenige Zellen zu finden waren. Diese Interphase wurde in den folgenden Versuchen zur Antikörperbestimmung herangezogen.

Die unterste Schicht war ein Sediment, das vor allem aus feinen Fetttropfen und Zellen bestand. Wurden Tachyzoiten von *T. gondii* direkt in Milch gegeben, so fanden sie sich nach Verdünnung mit PBS, Zentrifugation und Resuspension in dieser Schicht. Dabei waren mindestens 1000 Parasiten/ml Milch notwendig, um sie visuell unter dem Mikroskop erfassen zu können (Abb. 4). Das Sediment wurde demzufolge in PBS resuspendiert und für den Parasitennachweis in der HFF-Kultur oder für die nested PCR verwendet.

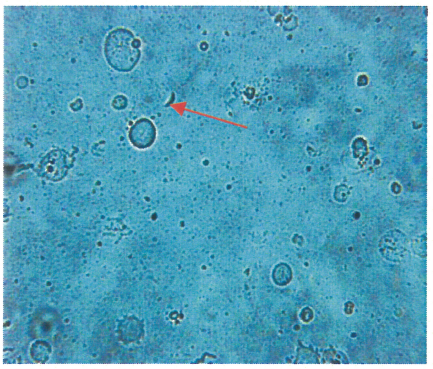
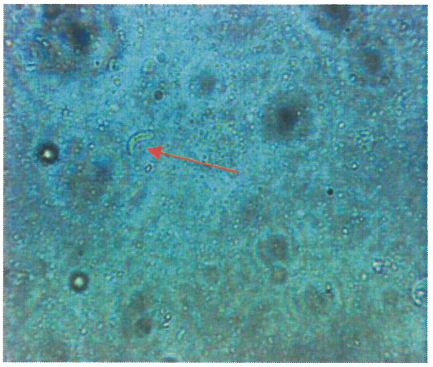
a)  b) 

Abb. 4 Lichtmikroskopiebilder mit Phasenkontrast: 1000 Tachyzoiten / ml Milch, Stamm RH, in 400 -(a) und 1000 facher (b) Vergrößerung. Pfeil zeigt auf Tachyzoit.

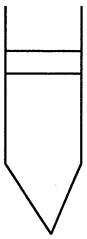
Da durch den hohen Fettanteil in der Milch selbst sehr große Mengen (1000 und mehr Tachyzoiten) an zugegebenen Toxoplasmen nur schwer unter dem Mikroskop wieder zufinden waren, wurde durch folgende Methoden versucht, die Parasiten deutlicher sichtbar zu machen.

Zytospin und Giemsa Färbung

F344 Ratten, die mit *T. gondii* (Stamm Prugniaud) oral inokuliert worden waren, und naive Ratten wurden am Tag fünf p.p. gemolken. Die Milch der naiven Ratten wurde mit verschiedenen Mengen an *T. gondii* Tachyzoiten (Stamm RH) versetzt. Anschließend wurde die Milch verdünnt, zentrifugiert und die Sedimente wieder resuspendiert. Je 100 µl der Suspensionen (Milch oral inokulierter Tiere und Milch mit zugegebenen Toxoplasmen) wurden nach Zytospin-Protokoll zentrifugiert. Als Positivkontrolle dienten 10.000 Tachyzoiten in 100 µl PBS. Nach der Zentrifugation wurde eine Giemsa Färbung (s. 2.2.4.3) durchgeführt.
Auf den Objektträgern, auf denen sich die Milch oral inokulierter Tiere befand, konnten keine Parasiten gefunden werden. Gut sichtbar waren sie jedoch in PBS (10.000 Tachyzoiten/100 µl PBS, Positivkontrolle). In der Milch naiver Ratten, die mit verschiedenen Mengen an Toxoplasmen versetzt worden war, konnte lediglich im Ansatz 1000 Toxoplasmen/100 µl Milch neun Tachyzoiten wieder gefunden werden.

Ficoll Gradient

Mit Prugniaud oral inokulierte und naive Ratten wurden gemolken. 1 ml Milch der nicht inokulierten Ratten wurde mit 10.000 Tachyzoiten (Stamm RH) versetzt. Anschließend wurde die Milch verdünnt, zentrifugiert und das Sediment wieder resuspendiert. 3 ml Ficoll wurden langsam unter die Suspensionen gegeben und wieder zentrifugiert. Über der Sedimentschicht entstand ein trüber Zellring. Beides wurde abpipettiert, mit Trypanblau angefärbt und unter dem Mikroskop auf Parasiten untersucht.

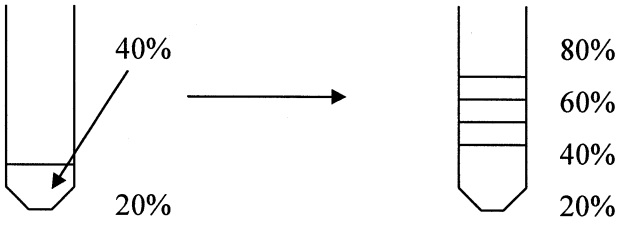


Zellring: wenige Zellen und Fett **aber keine Parasiten**

Sediment: hier konnten Tachyzoiten visuell erfasst werden

Percoll Gradient

Eine oral mit *T. gondii* (Stamm Prugniaud) inokulierte und eine naive Ratte wurden gemolken. 1 ml der Milch der nicht inokulierten Ratte wurde mit 100.000 Tachyzoiten, (Stamm RH) versetzt. Anschließend wurde die Milch verdünnt, zentrifugiert und in 20%iger Percoll-Lösung (s. 2.2.4.2.1) resuspendiert. 40, 60, und 80%ige Percoll-Lösungen wurden in zunehmender Konzentration darunter gegeben.



Nach dem Zentrifugieren fanden sich neben einem Sediment, Zellringe zwischen 80- und 60%iger und zwischen 60- und 40%iger Percoll-Lösung. Zellringe und Sediment wurden entnommen, mit Trypanblau eingefärbt und unter dem Mikroskop auf Toxoplasmen untersucht.
In den Zellringen konnten keine Parasiten beobachtet werden, jedoch im Sediment.

3.1.2 Titrationsreihe der Parasiten in Zellkultur

Da zur Anzucht des obligat intrazellulär wachsende Parasiten *T. gondii* HFF-Zellkulturen verwendet wurden und anhand der Lyse des Zellrasens das Wachstum des Parasiten leicht beurteilt werden konnte, wurden HFF-Kulturen auch zum Nachweis von *T. gondii* in der Rattenmilch herangezogen.

Um die Sensitivität des HFF-Zellkultursystems zu ermitteln, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus RH Tachyzoiten von 1 bis 1000 Toxoplasmen/500 µl Medium und Milchsuspension hergestellt, auf die in Kultur gebrachten Fibroblasten aufgetragen und das Parasitenwachstum kontrolliert.

Bereits vier Tage nach Infektion der Zellen konnte bis zu einer Konzentration von 16 Tachyzoiten/500 µl Medium oder Milchsuspension Parasitenwachstum nachgewiesen werden. Bei den niedrigeren Konzentrationen (bis zu zwei Tachyzoiten/500 µl Medium oder Milchsuspension) fanden sich sowohl in Medium als auch in Milchsuspension erst nach 10 bis 13 Tagen positive Kulturen. In den Zellkulturen, die mit nur einem Tachyzoit versetzt worden waren, konnte kein Parasitenwachstum beobachtet werden (Tab. 1).

Parasitenzahl:	1000	500	250	125	63	32	16	8	4	2	1
HFF Medium:	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HFF Milch:	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tab. 1 Nachweis von verschiedenen Konzentrationen an Tachyzoiten (Stamm RH) mittels HFF-Zellsystem in Medium und Milchsuspension

3.1.3 Parasitennachweis in Milch inokulierter F344 Ratten mittels HFF-Zellkultur und Bioassay

Im vorhergehenden Experiment (3.1.2) stellte sich heraus, dass die Bestandteile der Milch das Wachstum von *T. gondii* in der HFF-Kultur nicht hemmen und sich der visuelle Nachweis des Parasiten in der Zellkultur unter dem Mikroskop als sehr einfach gestaltet. Im Anschluss wurde nun versucht, *T. gondii* mittels HFF-Zellkultur in der Milch von Ratten, die zuvor mit verschiedenen Parasitenstämmen, auf unterschiedlichem Weg und in verschiedener Dosierung inokuliert worden waren, nachzuweisen.

Neben dem Parasitennachweis mittels HFF-Zellkultur sollte ferner diese Methode mit der Sensitivität im Bioassay in Mäusen verglichen werden. Dazu wurden F344 Ratten im Alter von acht Wochen verpaart und in zwei Gruppen eingeteilt. Am 13. Tag ihrer

Tragzeit wurde eine Tiergruppe entweder oral mit 180 bzw. 250 Zysten (Stamm Prugniaud) oder i.v. mit 10^7 Tachyzoiten (Stamm RH) inokuliert. Die zweite Gruppe blieb unbehandelt und diente als Kontrollgruppe (Serum und Milch). Von Tag zwei bis Tag zehn p.p. wurde den Ratten jeden zweiten Tag Milch abgenommen. Die Milch der inokulierten Tiere wurde sowohl in NMRI Mäuse i.p. injiziert (Bioassay), als auch nach Zentrifugation und Resuspension in PBS auf in Kultur gebrachte HFF gegeben, um so Parasitenwachstum nachzuweisen. Die Milchsuspensionen der mit 180 Zysten inokulierten Tiere wurden als Verdünnungsreihe, beginnend bei einer Verdünnung von 1:10.000 bis zu einer Verdünnung von 1:2, auf die Fibroblasten gegeben. Des Weiteren wurde die Interphase nach der Milchzentrifugation abgenommen und in einem indirekten ELISA auf IgG2b und IgM gegen *T. gondii* Antigen getestet. Parallel zur Milch wurde den Ratten Blut über den retroorbitalen Venenplexus abgenommen und das Serum auf Immunglobuline getestet (3.4.1).
Im Bioassay wurde den Mäusen vier Wochen p.i. ebenfalls Blut abgenommen und das Serum in einem indirekten ELISA auf *T. gondii* spezifische Antikörper getestet.
Die Gehirne der Mäuse wurden sechs Wochen p.i., die Gehirne der inokulierten Ratten acht Woche p.i. mikroskopisch auf Zysten untersucht.

In den HFF-Zellkulturen, die mit der Milch der oral mit 250 Zysten von *T. gondii*, (Stamm Prugniaud) inokulierten Ratten versetzt worden waren, konnten Parasiten an den Tagen zwei, vier und sechs p.p. nachgewiesen werden. Am Tag zehn p.p. wurde kein Parasitenwachstum mehr beobachtet (Tab. 2).

	Tag 2			Tag 4			Tag 6			Tag 8			Tag 10		
	HFF	Bioassay	Zysten	HFF	Bioassay	Zysten	HFF	Bioassay	Zysten	HFF	Bioassay	Zysten	HFF	Bioassay	Zysten
Ratte 01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Ratte 02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Ratte 03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Ratte 04		+	+		+	+		+	+		kM	kM		kM	kM
Ratte 05		+	+		+	+		+	+		-	-		-	-
Ratte 06		+	+		+	+		+	+		+	+		-	-

Tab. 2 Parasitennachweis (*T. gondii*, Stamm Prugniaud) in der Milch von oral mit 250 Zysten (Ratte 01 –03) und mit 180 Zysten (Ratte 04-06) inokulierten Ratten mittels HFF-Zellkultur und Bioassay (Rattenmilch ip. in NMRI Mäuse gespritzt und Serum der Mäuse mittels ELISA auf Antikörper gegen *T. gondii* getestet). Das Ergebnis des Parasitennachweises in der HFF-Zellkultur von Ratte 04-06 ist in Tab. 3 dargestellt. Die Gehirne der Mäuse wurden auf Zysten untersucht. Ratte 04 gab ab Tag 8 p.p. keine Milch mehr (kM). Dargestellt sind Positiv - (+) und Negativergebnisse (-).

In den HFF-Zellkulturen, die mit der Milch der oral mit 180 Zysten von *T. gondii* (Stamm Prugniaud) inokulierten Ratten versetzt worden waren, konnten an den Tagen zwei bis zehn p.p. in einer Milchsuspension-Verdünnung von 1:10.000 bis 1:100 keine Parasiten gefunden werden. In der Zellkultur mit der Milchsuspension der Ratte 04 konnten Tachyzoiten an den Tagen zwei und vier p.p. ab einer Verdünnung von 1:10, am Tag sechs p.p. ab einer 1:2 Verdünnung identifiziert werden. Die Milch von Ratte 05 war nur unverdünnt an den Tagen zwei bis acht p.p. positiv für Parasiten.
Parasitenwachstum in der Milch von Ratte 06 wurde in der Zellkultur an den Tagen zwei bis sechs p.p. ab einer Verdünnung von 1:10, am Tag acht p.p. ab einer 1:2 Verdünnung beobachtet (Tab. 3).

	Verdünnung:	1 : 10.000	1 : 1.000	1 : 100	1 : 10	1 : 2	unverdünnt
Tag 2 p.p.							
	Ratte 04	-	-	-	+	+	+
	Ratte 05	-	-	-	-	-	+
	Ratte 06	-	-	-	+	+	+
Tag 4 p.p.							
	Ratte 04	-	-	-	+	+	+
	Ratte 05	-	-	-	-	-	+
	Ratte 06	-	-	-	+	+	+
Tag 6 p.p.							
	Ratte 04	-	-	-	-	+	+
	Ratte 05	-	-	-	-	-	+
	Ratte 06	-	-	-	+	+	+
Tag 8 p.p.							
	Ratte 05	-	-	-	-	-	+
	Ratte 06	-	-	-	-	+	+
Tag 10 p.p.							
	Ratte 05	-	-	-	-	-	-
	Ratte 06	-	-	-	-	-	-

Tab. 3 Parasitennachweis (*T. gondii*, Stamm Prugniaud) in der Milchsuspension von oral mit 180 Zysten inokulierten Ratten. mittels HFF-Zellkultur in verschiedenen Verdünnungen. Ratte 04 gab ab Tag 8 p.p. keine Milch mehr. Dargestellt sind Positiv - (+) und Negativergebnisse (-).

In der HFF-Zellkultur, die Milchsuspensionen von i.v. mit 10^7 Tachyzoiten (Stamm RH) inokulierten Ratten enthielt, konnte an keinem Tag p.p. Parasitenwachstum nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der HFF-Kultur konnten im Bioassay in NMRI Mäusen bestätigt werden. Im ELISA konnte im Serum jener Mäuse, denen Milch der oral infizierten

Ratten injiziert worden war, spezifische Antikörper gegen *T. gondii* von Tag zwei bis Tag acht p.p. ermittelt werden. Die darauf folgenden Seren waren alle negativ.
T. gondii-Zysten fanden sich nur in den Gehirnen der an Tag zwei bis Tag sechs p.p. inokulierten Mäusen (Tab. 2 und Abb. 5).

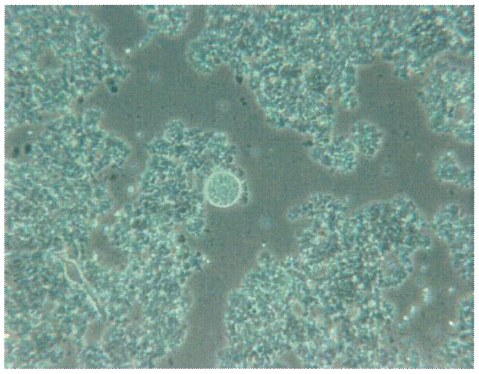
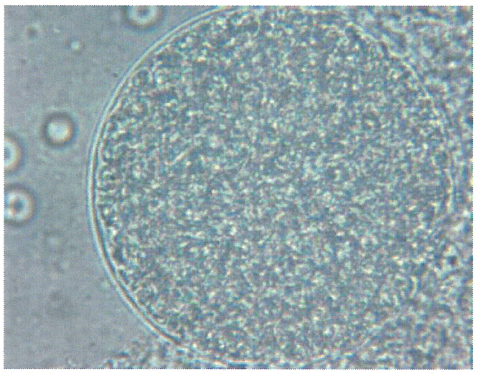
a)  b) 

Abb. 5 Lichtmikroskopiebilder mit Phasenkontrast: 100 – (a) und 1000 fache (b) Vergrößerung einer *T. gondii* Zyste (Stamm Prugniaud) im Gehirnhomogenisat einer sechs Wochen zuvor i.p. infizierten NMRI Maus.

In den Seren der Mäuse, die Milch von i.v. mit RH inokulierten Ratten erhalten hatten, zeigte sich im ELISA keine positive Antikörperreaktion und in den Gehirnen fanden sich keine Zysten.

3.1.4 Nachweis des B1-Gens von *T. gondii* in Milch durch PCR

Neben Mikroskopie, Bioassay und HFF-Kultur wurde auch versucht, mittels PCR *T. gondii* in der Milch oral infizierter Ratten nachzuweisen. Bestimmt wurde das B1 Gen, da es 35mal im Parasitengenom vorhanden ist und somit die Amplifikation höher ausfällt (Burg et al., 1989). Als Proben dienten die Milch oral inokulierter Ratten (Ratte 01-03) aus 3.1.3 Tag zwei bis Tag zehn p.p., in Zehnerschritten in Milch austitrierte Tachyzoiten (Stamm RH, Konzentrationen 10.000 bis 1/500 µl Milch), als Positivkontrolle 1000 Tachyzoiten/500 µl PBS und als Negativkontrolle Wasser und nicht infizierte Milch. Alle Proben wurden zentrifugiert und die Sedimente in je 200 µl PBS resuspendiert. Aus den Suspensionen wurde die DNA mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kit und nach dem Protokoll von QIAGEN gewonnen. Im Anschluss daran wurde eine nested PCR (s. 2.2.10) durchgeführt.

Die im Bioassay und in der HFF-Zellkultur nachweislich für *T. gondii* positiven Milchproben der oral infizierten Ratten waren in der PCR negativ. In den übrigen Proben konnte das B1 Gen bis auf einen Tachyzoiten genau bestimmt werden (Abb. 6).

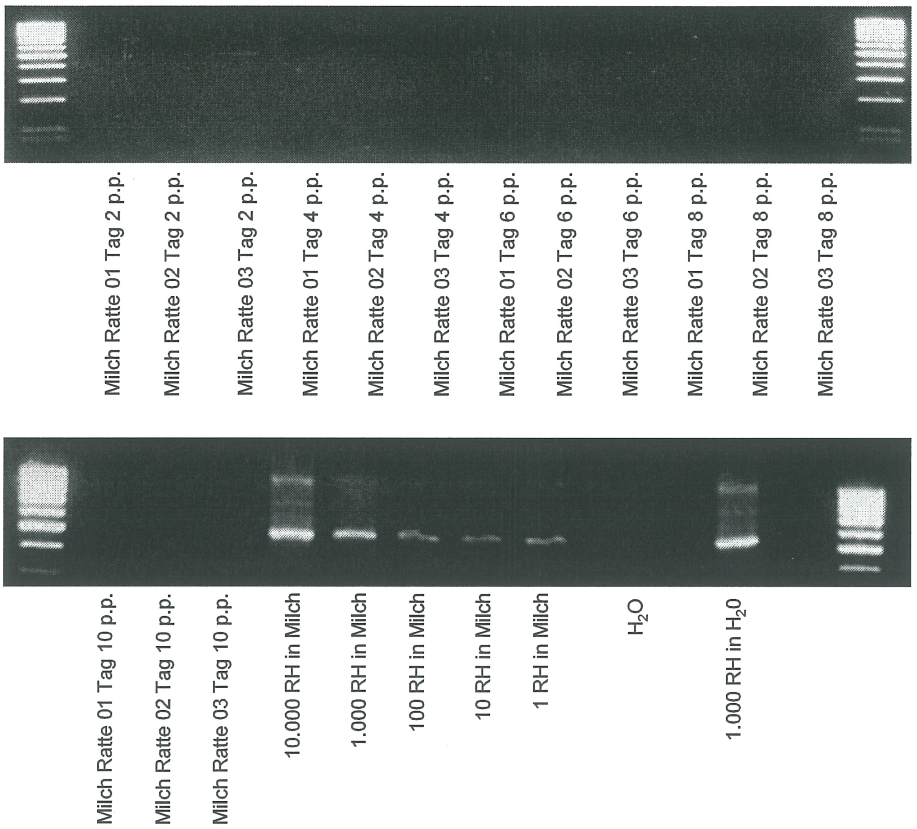


Abb. 6 Nested PCR
Proben: Ratte 01-03 aus 3.1.3 Tag zwei bis Tag zehn p.p., 10^4,10^3,10^2,10 Tachyzoiten und ein Tachyzoit (Stamm RH) in Milch, 10^3 Tachyzoiten (Stamm RH) in PBS, negativ Kontrolle (-) Wasser, negativ Kontrolle (- -) Milch und Marker (M).

3.2 Immunisierung von F344-Ratten und Übertragung von Immunglobulinen über die Milch

Sechs acht Wochen alte F344 Ratten wurden verpaart und in zwei Gruppen aufgeteilt. Gruppe eins wurde am 16. Tag ihrer Tragzeit mit je 120 µl Toxoantigen (TAg)/Titermax/Ratte intramuskulär (i.m.) immunisiert. Unmittelbar nach der Geburt wurde der Wurf von Gruppe eins durch den Wurf der unbehandelten Gruppe zwei ausgetauscht, und Gruppe zwei erhielt den Wurf von Gruppe eins. Die Nachkommen

naiver Mütter wurden demzufolge von mit TAg immunisierten Ratten und die Nachkommen immunisierter Mütter von naiven Ratten gesäugt.
Sollten sich im Serum jener Nachkommen, die von naiven Ratten geboren, jedoch von immunisierten Ratten gesäugt worden waren, Antikörper gegen *T. gondii*-Antigen feststellen lassen, könnte dies als Hinweis für eine orale Aufnahme maternaler Antikörper über die Milch gelten. Da die Muttertiere lediglich mit TAg **immunisiert** und nicht wie in den Versuchen zuvor mit Parasiten **infiziert** worden waren, konnte eine Übertragung von *T. gondii* über die Milch und somit eine Eigenproduktion von Antikörpern im Immunsystem der Nachkommen ausgeschlossen werden.

3.2.1 Humorale Immunantwort immunisierter Ratten

Von Tag zwei bis Tag zehn und Tag 14 p.p. wurden die Ratten der Gruppe eins jeden zweiten Tag gemolken. Parallel zur Milch wurde Blut über den retroorbitalen Venenplexus abgenommen. Die Interphase der Milch (3.1.1) wurde zusammen mit den Seren in einem indirekten ELISA auf die spezifischen Antikörper IgA, IgG2b und IgM gegen *T. gondii* Antigen getestet (Abb. 7).

14 und 28 Tage nach dem Austausch der Nachkommen wurde allen Jungtieren Blut über den retroorbitalen Venenplexus abgenommen und das Serum ebenfalls auf die genannten Immumglobuline getestet (Abb. 8 und 9).

Die gemessenen Werte der Antikörper lagen nahe der Nachweisgrenze (Abb. 7), dennoch konnte in Milch und Serum von den Ratten der Gruppe eins von Tag zwei bis Tag 14 p.p. ein kontinuierlicher Anstieg der IgG2b Antikörper festgestellt werden. Die ELISA-Einheiten der IgM Antikörper waren am Tag zwei p.p. am höchsten und fielen im weiteren Verlauf in Milch und Serum gleichermaßen kontinuierlich ab.
Weder im Serum noch in der Milch konnten IgA Antikörper nachgewiesen werden.

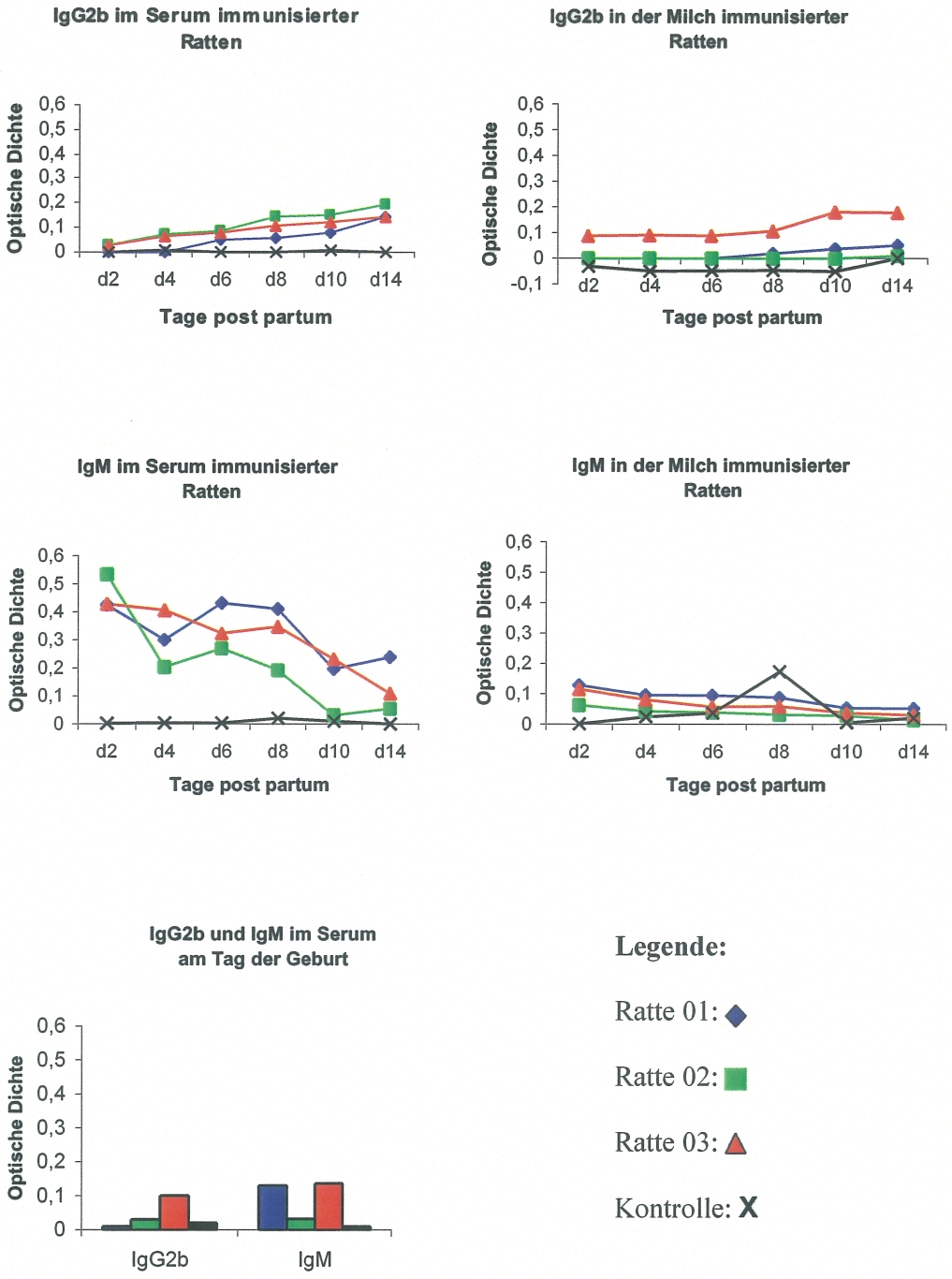


Abb. 7 ELISA-Einheiten von spezifischen Antikörpern (IgG2b, IgM) in Serum und Milch von im. mit 120 µg/ml TAg/Titermax immunisierten Ratten (Ratte 01-03) und von einer nicht immunisierten Ratte (Kontrolle). Serum und Milch wurden jeweils n Tage post partum (p.p.), Serum zusätzlich am Tag der Geburt abgenommen.

3.2.1.1 Antikörpernachweis im Serum von Ratten, die von immunisierten Ammenmüttern gesäugt wurden

Im Serum jener Ratten, die zum Zeitpunkt der Immunisierung noch *in utero* waren, konnte weder gegen *T. gondii* -Antigen gerichtetes IgG2b noch IgM nachgewiesen werden. In den Seren jener Ratten, die hingegen naiv waren, d.h. von nicht immunisierten Ratten geboren wurden, und unmittelbar nach der Geburt von Ammenmüttern (Ratte 01-03), die wiederum immunisiert worden waren, gesäugt wurden, konnte nach zwei Wochen ein deutlicher IgG2b-Nachweis, der nach 28 Tagen wieder zurück ging, erbracht werden (Abb. 8).

IgM Antikörper ließen sich in den Seren der 14 und 28 Tage alten Ratten nachweisen. Dabei ließ sich in den Gruppen, die von Ratte 01 und Ratte 03 gesäugt wurden nach 28 Tagen ein deutlicher Rückgang der Antikörper vermerken, während in der Gruppe, die von Ratte 02 gesäugt wurde, ein Anstieg der Antikörper beobachtet werden konnte (Abb. 9).

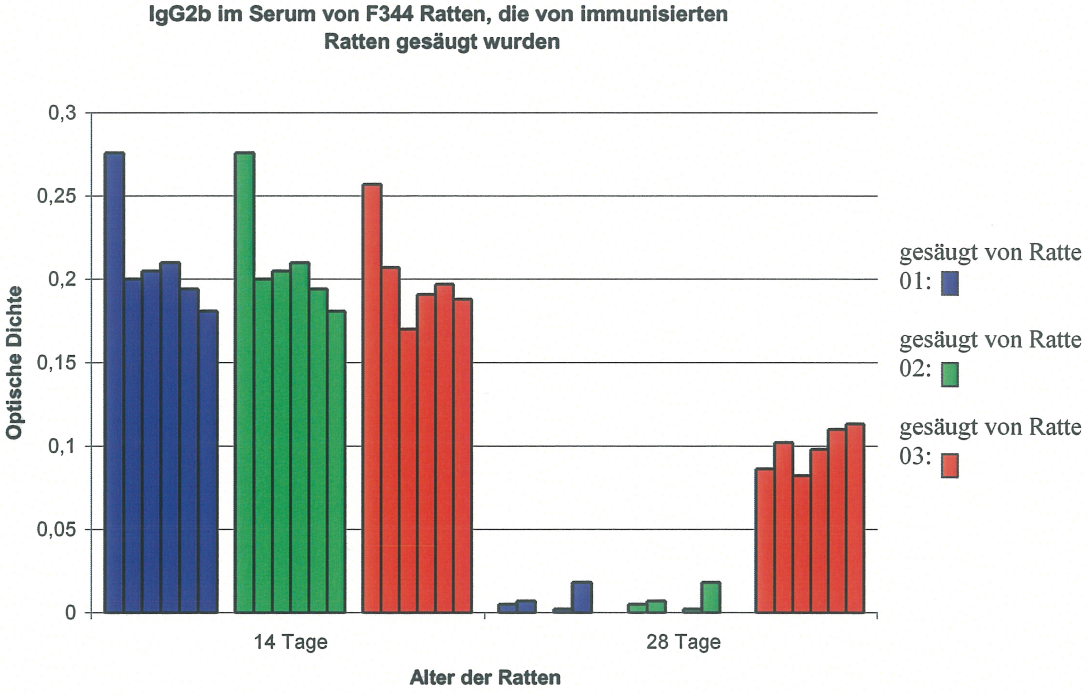


Abb. 8 Parasitenspezifischer Antikörper-Nachweis mittels indirektem ELISA im Serum naiver Ratten, die von immunisierten Ammenmüttern gesäugt wurden. Dargestellt sind die optischen Dichten von IgG2b in den Seren der 14 bzw. 28 Tage alten Ratten. Sechs Jungtiere wurden jeweils von einer Ammenratte (3.2.1) gesäugt.

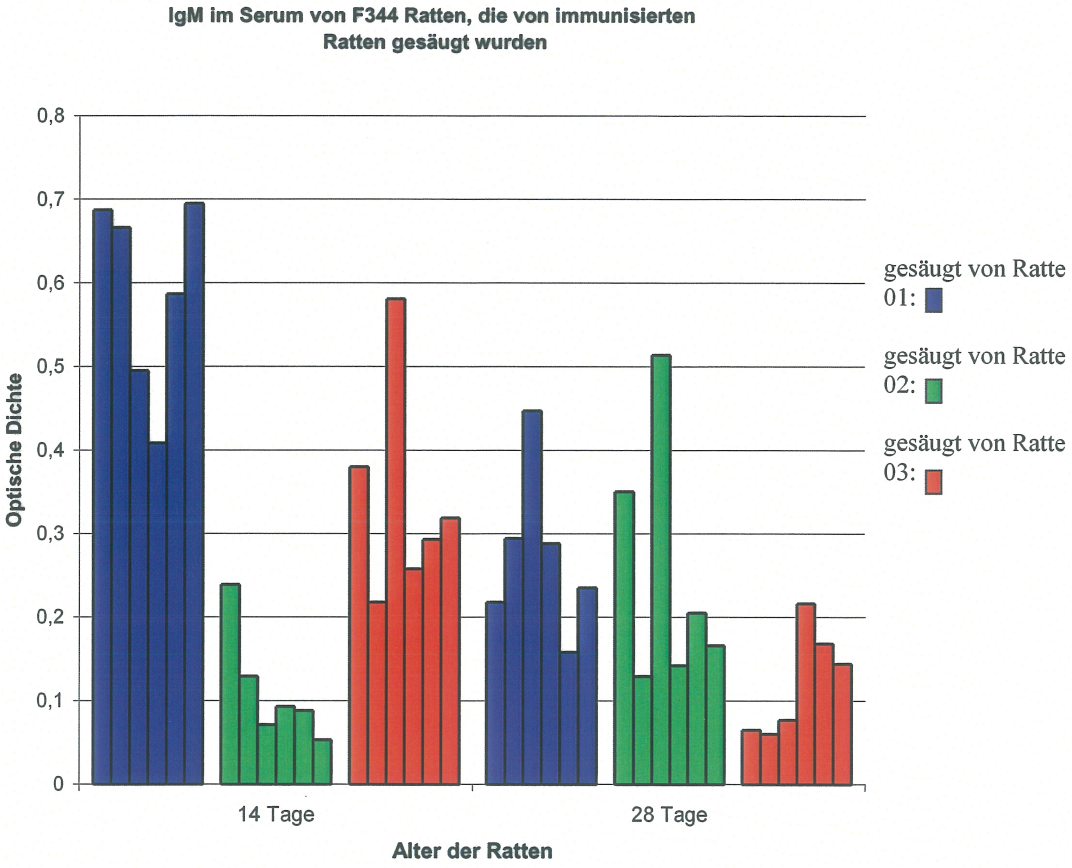


Abb. 9 Parasitenspezifischer Antikörper-Nachweis mittels indirektem ELISA im Serum naiver Ratten, die von immunisierten Ammenmüttern gesäugt wurden. Dargestellt sind die optischen Dichten von IgM in den Seren der 14 bzw. 28 Tage alten Ratten. Sechs Jungtiere wurden jeweils von einer Ammenratte (3.2.1) gesäugt.

3.3 Experimentelle Übertragung von *T. gondii* über die Milch (Fütterexperiment)

Unter der Annahme, dass *T. gondii* als freier Tachyzoit über die Milch einer infizierten Ratte auf ihre Nachkommen übertragen wird, wurde in diesem Versuch genau dieser Transmissionsweg simuliert. Zugleich sollte ermittelt werden, wie viele Tachyzoiten letztlich benötigt werden, um eine erfolgreiche Infektion durchzuführen und ob es Unterschiede zwischen den Parasitenstämmen RH und NTE gibt.

Ratten wurden verpaart und deren Nachkommen 48 Stunden nach der Geburt mit Tachyzoiten von *T. gondii* (Stamm RH und NTE) in unterschiedlicher Dosierung, in zuvor abgenommener Rattenmilch, oral inokuliert.

Versuch I:

Anzahl Tiere	Parasitendosis	Parasitenstamm
2	naiv	-
3	10 Tachyoziten	RH
2	100 Tachyoziten	RH
3	1.000 Tachyoziten	RH
3	10.000 Tachyoziten	RH
3	100.000 Tachyoziten	RH

Versuch II :

Anzahl Tiere	Parasitendosis	Parasitenstamm
3	naiv	-
3	10 Tachyoziten	NTE
3	100 Tachyoziten	NTE
3	1.000 Tachyoziten	NTE
2	10.000 Tachyoziten	NTE
2	100.000 Tachyoziten	NTE

Um zu überprüfen, ob sich tatsächlich eine Infektion der Neugeborenen durchführen lässt, wurde den Ratten vier und acht Wochen nach der Geburt Blut entnommen und die Seren in einem indirektem ELISA auf Antikörper (IgG2b, IgM) gegen *T. gondii* getestet (3.3.1 Humorale Immunantwort). Des Weiteren wurde den acht Wochen alten Ratten die Gehirne entfernt und mit diesen in Mäusen ein Bioassay durchgeführt. Milz und mesenteriale Lymphknoten (MLK) wurden ebenfalls entnommen, die Zellen mit Mitogen (Con A) und Antigen (TAg, ESA) stimuliert und die zelluläre Immunantwort (3.3.2) untersucht.

3.3.1 Humorale Immunantwort

Es konnte nachgewiesen werden, dass für eine erfolgreiche Infektion von neugeborenen Ratten mit dem Parasitenstamm RH bereits 100 Tachyzoiten ausreichen (Versuch I, Tab. 4). Es fanden sich nach vier Wochen p.i. erhöhte Konzentrationen an IgG2b, die jedoch acht Wochen p.i. rückläufig waren, und positive Ergebnisse im Bioassay, d.h. hohe Konzentrationen von IgG im Mäuseserum oder Zysten in den Gehirnen der

Mäuse, die sechs Wochen nach intraperitonealer Infektion entnommen worden sind. Die IgM Antwort fiel in beiden Versuchen (Versuch I, II, Tab. 4, 5) negativ aus.
In Versuch II, der mit dem Parasitenstamm NTE durchgeführt worden war, zeigte sich, dass höchstens 10 Tachyzoiten benötigt wurden, um bereits IgG2b im Serum der inokulierten Ratte nachzuweisen. Ab 1000 Tachyzoiten konnte auch im Bioassay ein positiver Nachweis erbracht werden (Tab. 5).

Versuch I

IgG2b / IgM		**4 Wo *p.i.* OD** IgG2b / IgM		**8 Wo *p.i.* OD** IgG2b / IgM		**Zysten** Ratte	**ELISA OD** Bioassay		**Zysten** Maus	
naive Tiere										
	Ratte 15 (735)	0 / 0,09	-	0,056 / 0,125	-		0,07	0,125	-	-
	Ratte 16 (737)	0 / 0,201	-	0 / 0,121	-		0,14	0,082	-	-
10 Tachyoziten										
	Ratte 04 (726)	0,009 / 0,106	-	0,003 / 0,103	-	-	0,069	0,101	-	-
	Ratte 05 (727)	0,003 / 0,145	-	0 / 0,119	-	-	0,13	0,191	-	-
	Ratte 06 (728)	0,002 / 0,165	-	0 / 0,154	-	-	0,246	0,375	-	-
100 Tachyoziten										
	Ratte 07 (724)	1,193 / 0,35	+	0,876 / 0,269	+	-	0,263	2,718	-	60/ml
	Ratte 08 (363)	0 / 0,159	-	0 / 0,157	-	-	0,21	0,217	-	-
1.000 Tachyoziten										
	Ratte 09 (721)	0 / 0,217	-	0 / 0,139	-	-	0,057	0,083	-	-
	Ratte 10 (722)	0 / 0,209	-	0 / 0,107	-	-	0,09	0,286	-	-
	Ratte 11 (723)	1,215 / 0,226	+	0,96 / 0,171	+	-	1,425	0,899	60/ml	-
10.000 Tachyzoiten										
	Ratte 12 (732)	0 / 0,142	-	0 / 0,125	-	-	0,643	0,215	40/ml	
	Ratte 13 (733)	0 / 0,164	-	0 / 0,131	-	-	0,048	0,082	-	-
	Ratte 14 (734)	0 / 0,18	-	0 / 0,168	-	-	0,037	0,131	-	-
100.000 Tachyzoiten										
	Ratte 01 (729)	0 / 0,171	-	0 / 0,169	-	-	1,324	0,287	40/ml	-
	Ratte 02 (730)	0 / 0,179	-	0,006 / 0,52	-	-	0,158	0,145	-	-
	Ratte 03 (731)	1,642 / 0,279	+	0,88 / 0,172	+	-	0,987	1,02	20/ml	40/ml

Tab. 4 Konzentrationen an spezifischen Antikörpern gegen *T. gondii* in Seren von Ratten, die mit verschiedenen Parasitendosen (Stamm RH) 48 h nach der Geburt oral inokuliert wurden. Als Kontrolle dienten naiv belassene Tiere aus demselben Wurf. Dargestellt sind die ELISA-Einheiten (OD) von IgG2b und IgM vier bzw. acht Wochen nach der Inokulation (p.i.), der mikroskopischen Nachweis von *T. gondii* Zysten in den Gehirnen von Ratten und Mäusen und die ELISA-Einheiten (OD) aus dem in Mäusen in Doppelbestimmung durchgeführten Bioassay. Positiv (+) und negativ (-) wurde jeweils aus der 3-fachen Standardabweichung berechnet.

Versuch II

IgG2b / IgM		4 Wo *p.i.* OD IgG2b / IgM		8 Wo *p.i.* OD IgG2b / IgM		Zysten Ratte	ELISA OD Bioassay		Zysten Maus	
naive Tiere										
	Ratte 01 (551)	0 / 0,145	-	0 / 0,103	-		0,1	0,068		
	Ratte 02 (552)	0 / 0,102	-	0 / 0,09	-		0,115	0,113		
	Ratte 03 (553)	0 / 0,103	-	0 / 0,08	-		0,138	0,053		
10 Tachyoziten										
	Ratte 06 (558)	0 / 0,091	-	0 / 0,021	-	-	0,094	0,061	-	-
	Ratte 07 (559)	0,781 / 0,15	+	0,125 / 0,133	-	-	0,082	0,129	-	-
	Ratte 08 (560)	0 / 0,091	-	0 / 0,072	-	-	0,092	0,051	-	-
100 Tachyoziten										
	Ratte 11 (561)	0 / 0,073	-	0 / 0,05	-	-	0,098	0,096	-	-
	Ratte 12 (562)	0 / 0,105	-	0 / 0,068	-	-	0,053	0,087	-	-
	Ratte 13 (563)	0 / 0,131	-	0 / 0,092	-	-	0,12	0,082	-	-
1.000 Tachyoziten										
	Ratte 14 (564)	0 / 0,075	-	0 / 0,072	-	-	0,078	0,143	-	-
	Ratte 15 (565)	0 / 0,105	-	0 / 0,139	-	-	0,039	0,52	-	40/ml
	Ratte 16 (566)	0 / 0,111	-	0 / 0,106	-	-	0,103	0,093	-	-
10.000 Tachyzoiten										
	Ratte 09 (556)	0 / 0,106	-	0 / 0,09	-	-	0,073	0,04	-	-
	Ratte 10 (557)	0,606 / 0,429	+	0,382 / 0,122	+	-	0,063	0,7	-	40/ml
100.000 Tachyzoiten										
	Ratte 04 (554)	0 / 0,125	-	0 / 0,085	-	-	0,093	0,086	-	-
	Ratte 05 (555)	0,942 / 0,276	+	0,524 / 0,075	+	-	0,142	0,501	-	20/ml

Tab 5 Konzentrationen an spezifischen Antikörpern gegen *T .gondii* in Seren von Ratten, die mit verschiedenen Parasitendosen (Stamm NTE) 48 h nach der Geburt oral inokuliert wurden. Als Kontrolle dienten naiv belassene Tiere aus demselben Wurf. Dargestellt sind die ELISA-Einheiten (OD) von IgG2b und IgM vier bzw. acht Wochen nach der Inokulation (p.i.), der mikroskopischen Nachweis von *T. gondii* Zysten in den Gehirnen von Ratten und Mäusen und die ELISA-Einheiten (OD) aus dem in Mäusen in Doppelbestimmung durchgeführten Bioassay. Positiv (+) und negativ (-) wurde jeweils aus der 3-fachen Standardabweichung berechnet.

3.3.2 Zelluläre Immunantwort

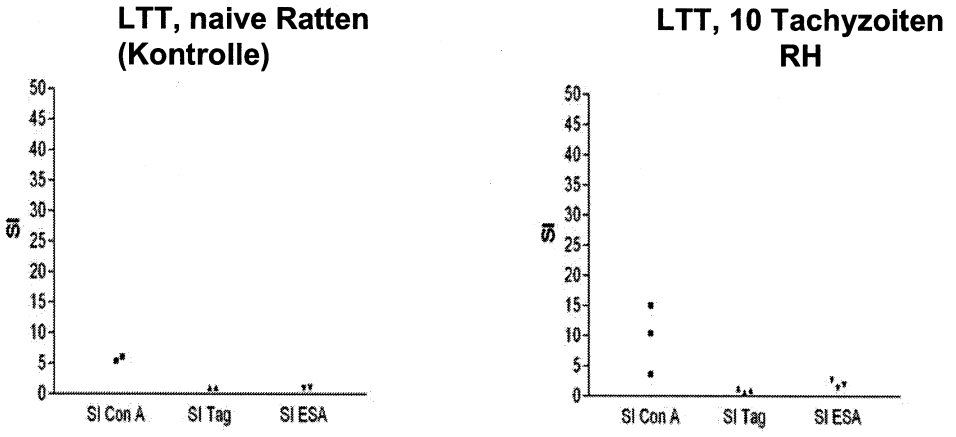
3.3.2.1 Lymphozytentransformationstests (LTT)

Den Ratten aus Versuch I und II wurde Milz und mesenteriale Lymphknoten entfernt und die Zellen für **drei** Tage mit Concanavalin A (ConA) und für **fünf** Tage mit den Antigenen TAg und ESA in vitro stimuliert. Die Proliferationsrate der Zellen wurde über den Einbau von 3H-Thymidin gemessen und die Werte als Stimulationsindizes angegeben (Abb. 10, 11 LTT Milz; LTT MLK nicht dargestellt).

In **Versuch I,** der mit RH durchgeführt worden war, sah man die stärkste Antwort auf die Stimulation mit den Antigenen TAg und ESA in den Zellkulturen jener Tiere, die mit 1.000 Tachyzoiten inokuliert worden waren. Etwas geringer waren die Stimulationsindizes nach einer Inokulation mit 100 bzw. 100.000 Parasiten. Keine Zellproliferation fand sich in den Zellkulturen jener Ratten, die naiv geblieben oder mit 10 bzw.10.000 Tachyzoiten inokuliert worden waren (Abb. 7). Im Falle der MLK-Zellen aus Versuch I zeigten sich nur nach ConA-Stimulation erhöhte Stimulationsindizes (Werte nicht dargestellt).

Lymphozytentransformationstest Versuch I (RH)

Milzzellen



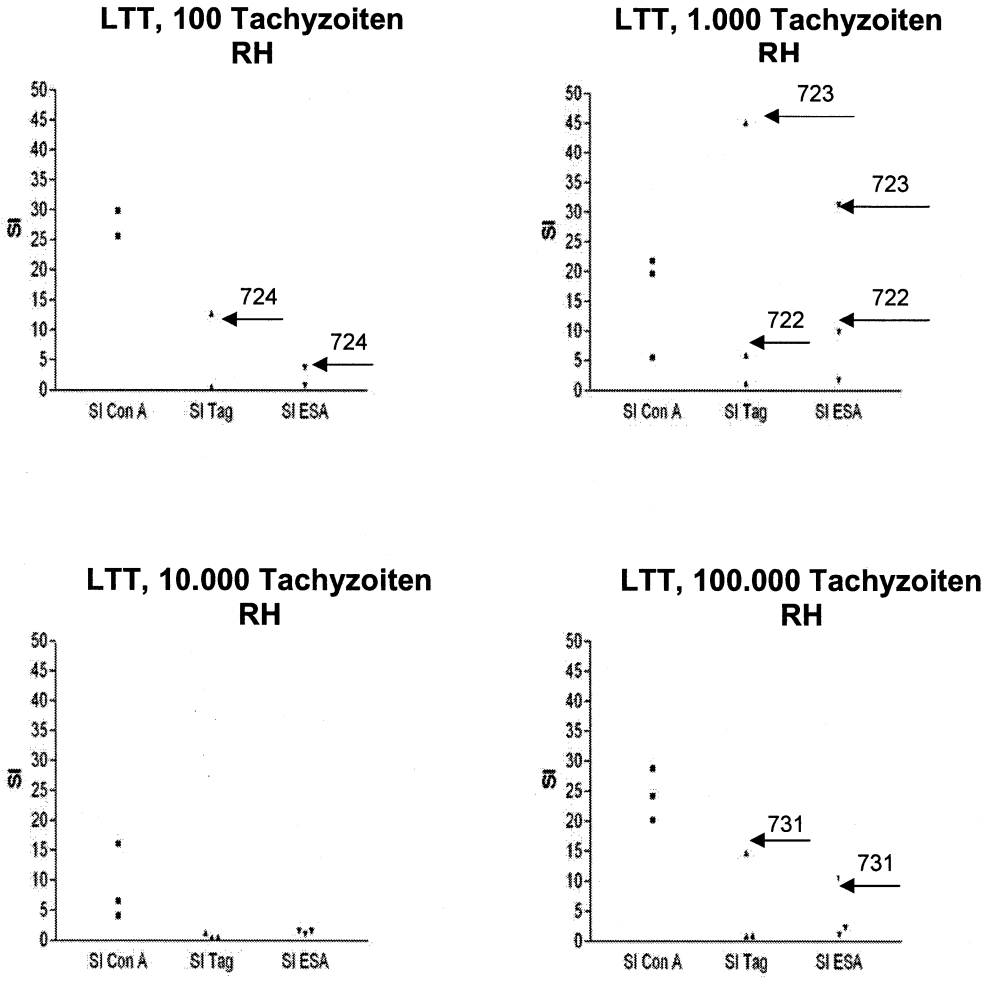


Abb. 10 In vitro-Proliferation von **Milzzellen** von naiven, 8 Wochen alten F344 Ratten und mit verschiedenen Parasitendosen (**Stamm RH**) inokulierten 8 Wochen alten F344 Ratten nach **3**-tägiger Stimulation mit Concanavalin A (Con A) und **5**-tägiger Stimulation mit *T. gondii*-Antigen (TAg) und excreted-secreted-antigen (ESA). Dargestellt sind die Einzelwerte als Stimulationsindices. Die Pfeile kennzeichnen die Ratten, bei denen sich IgG2b und IgM im Serum nachweisen ließ, bzw. die im Bioassay positiv waren (Tab. 4).

Nach Inokulation mit 10, 1.000, 10.000 und 100.000 Tachyzoiten (Stamm NTE) in **Versuch II,** zeigten die Milzzellen der Ratten sowohl nach Stimulation mit TAg als auch mit ESA eine stark erhöhte Zellproliferation. Höher waren nur die Stimulationsindizes der mit ConA stimulierten Zellen (Abb. 11) Die Zellkulturen der MLK-Zellen unterschieden sich in ihrem Proliferationsverhalten nicht von denen aus Versuch I (Werte nicht dargestellt).

Lymphozytentransformationstest Versuch II (NTE)

Milzzellen

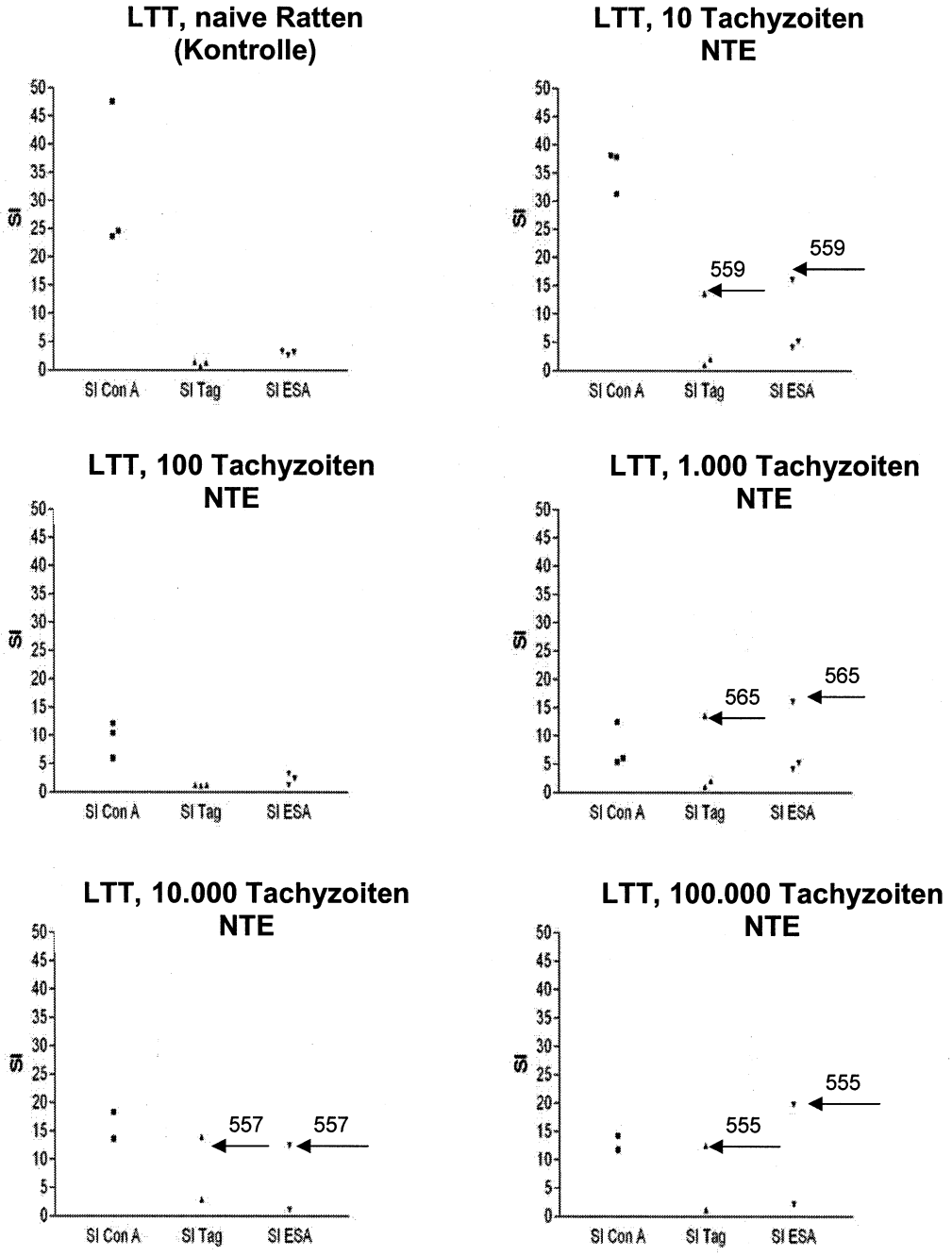


Abb. 11 In vitro-Proliferation von **Milzzellen** von naiven, 8 Wochen alten F344 Ratten und mit verschiedenen Parasitendosen (**Stamm NTE**) inokulierten 8 Wochen alten F344 Ratten nach **3**-tägiger Stimulation mit Concanavalin A (Con A) und **5**-tägiger Stimulation mit *T. gondi*-Antigen (TAg) und excreted-secreted-antigen (ESA). Dargestellt sind die Einzelwerte als Stimulationsindices. Die Pfeile kennzeichnen die Ratten, bei denen sich IgG2b und IgM im Serum nachweisen ließ, bzw. die im Bioassay positiv waren (Tab. 5).

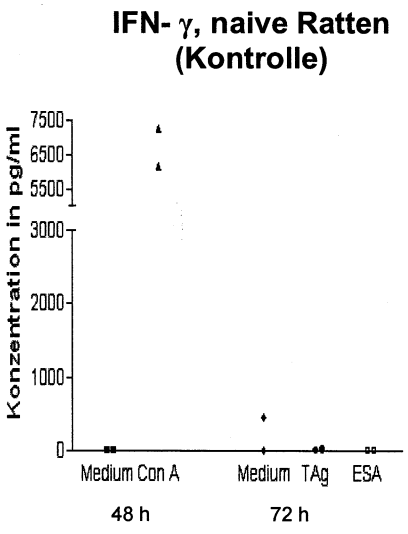
3.3.2.2 Zytokinproduktion von Milz- und mesenterialen Lymphknotenzellen

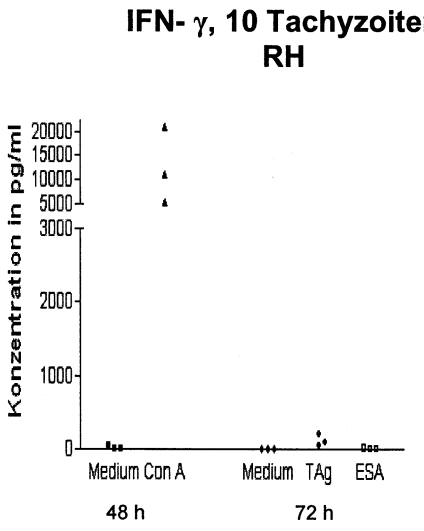
Die Milz- und Lymphknotenzellen der Ratten aus Versuch I und II wurden in Kultur gebracht und für **48 h** mit ConA und für **72 h** mit den Antigenen ESA und TAg stimuliert. Dabei wurde für die **48**- und die **72** stündige Inkubation jeweils ein unterschiedlicher Ansatz mit **Medium** als Leerwert gewählt. Die Bestimmung der Sekretion von IFN-γ erfolgte anschließend in einem „Sandwich-ELISA" mit kommerziell erhältlichen und bereits optimierten Testsystemen. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben.

IFN-γ

Versuch I (RH)

Die Konzentration von IFN-γ war in den Milzzell-Überständen jener Ratten, die mit 100, 1.000 oder 100.000 Tachyzoiten inokuliert worden waren, nach antigener (TAg und ESA) und nach mitogener (ConA) Stimulation leicht erhöht (Abb. 12).
In sämtlichen Überständen der MLK-Zellen konnte IFN-γ nur nach mitogener Stimulation mit ConA nachgewiesen werden (Werte nicht dargestellt).





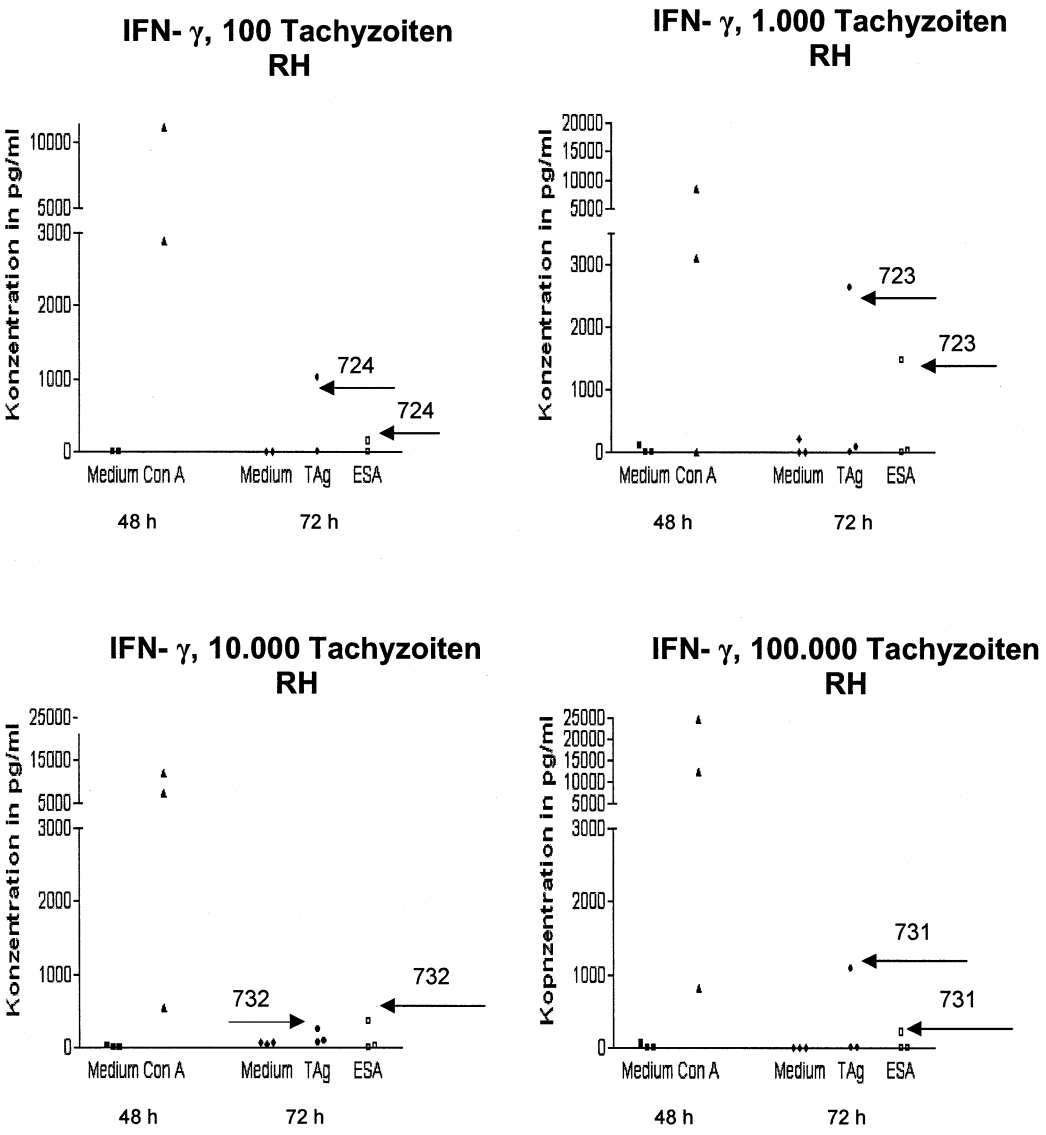


Abb. 12 IFN-γ Sekretion in pg/ml in **Milzzell**kulturüberständen von naiven, acht Wochen alten F344 Ratten und mit verschiedenen Parasitendosen (**Stamm RH**) inokulierten acht Wochen alten F344 Ratten. Das IFN-γ wurde nach **48**-stündiger Mitogen-Stimulation mit ConA und nach **72**-stündiger Antigen-Stimulation mit TAg und ESA bestimmt. Für den mitogenen und den antigenen Stimulationsansatz wurde jeweils eine Kontrollstimulation in Medium durchgeführt. Die Pfeile kennzeichnen die Ratten, bei denen sich IgG2b und IgM im Serum nachweisen ließ, bzw. die im Bioassay positiv waren (Tab. 4).

Versuch II (NTE)

Auch in diesem Versuch zeigte sich in den Überständen der Milzzellen nach der Stimulation mit TAg eine leicht erhöhte Konzentration von IFN-γ bei den Tieren, die 10.000 und 100.000 Parasiten erhalten hatten (Abb. 13). In den Überständen der MLK-Zellen fand sich nur nach Stimulation mit ConA eine hohe Konzentration an IFN-γ (Werte nicht dargestellt).

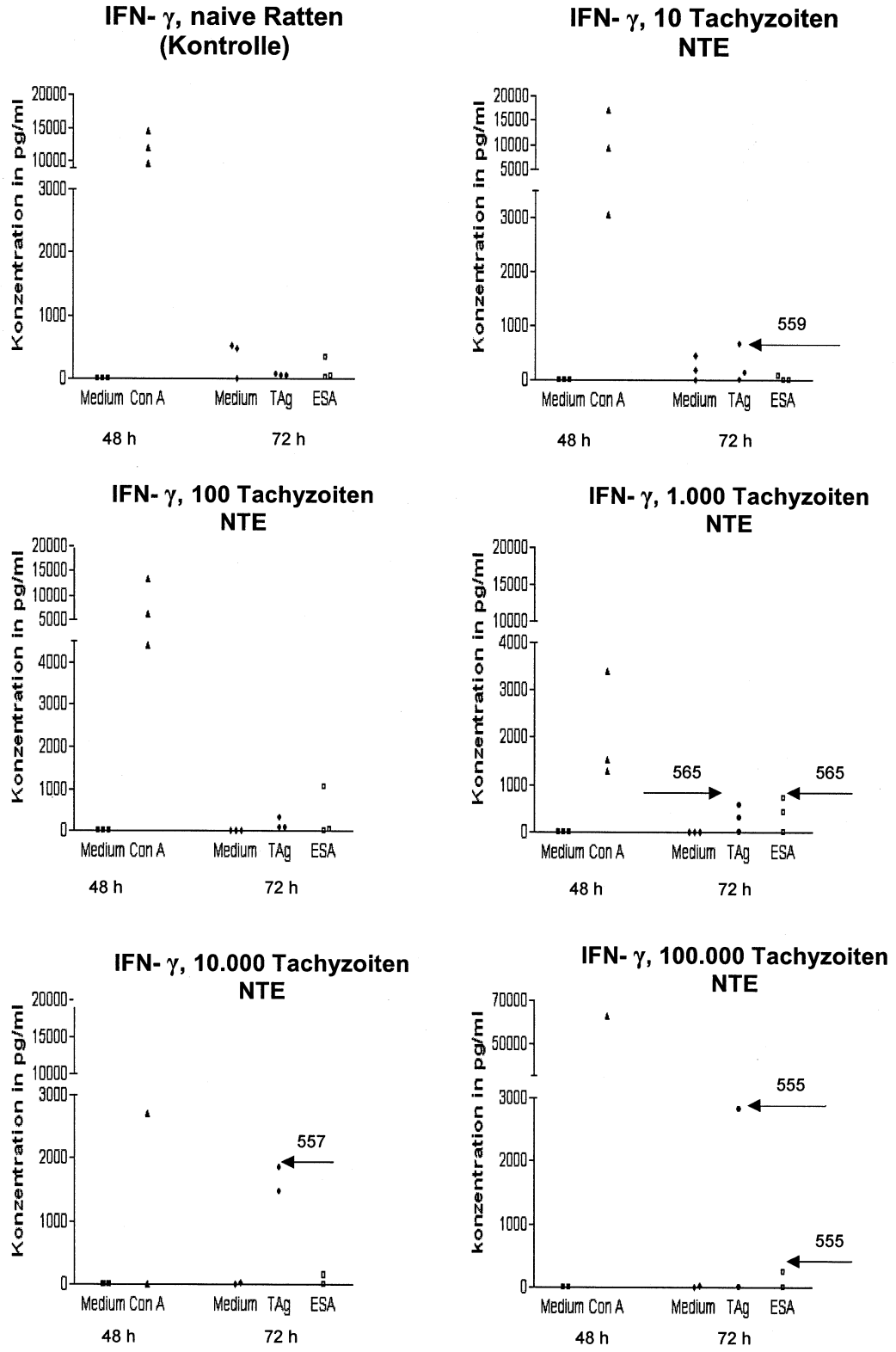


Abb. 13 IFN-γ Sekretion in pg/ml in **Milzzell**kulturüberständen von naiven, acht Wochen alten F344 Ratten und mit verschiedenen Parasitendosen (**Stamm NTE**) inokulierten acht Wochen alten F344 Ratten. Das IFN-γ wurde nach **48**-stündiger Mitogen-Stimulation mit ConA und nach **72**-stündiger Antigen-Stimulation mit TAg und ESA bestimmt. Für den mitogenen und den antigenen Stimulationsansatz wurde jeweils eine Kontrollstimulation in Medium durchgeführt. Die Pfeile kennzeichnen die Ratten, bei denen sich IgG2b und IgM im Serum nachweisen ließ, bzw. die im Bioassay positiv waren (Tab. 5).

3.4 Humorale Immunantwort und Milch als Transmissionsweg

Die Fragestellung dieser Versuchsreihe war, ob eine humorale Immunantwort in der Rattenmilch nach einer oralen (Stamm Prugniaud) bzw. intravenösen (Stamm RH) Inokulation mit *T. gondii* nachweisbar ist und ob sich eine Korrelation zwischen Milch und Serum hinsichtlich des Verlaufs des Auftretens der Antikörper zeigt. Ferner sollten die Nachkommen von inokulierten Ratten mit denen von naiven (nachweislich nicht infizierten) Ratten ausgetauscht, die humorale Immunantwort der Gruppe, die demzufolge von inokulierten Ammenmüttern gesäugt worden war, getestet und ihre Gehirne auf Zysten untersucht und somit die Infektionsrate bestimmt werden.
Durch den Austausch der Nachkommen, der Analyse ihrer Immunantwort und die Bestimmung der Infektionsrate sollte nachvollzogen werden, ob Rattenmilch als Transmissionsweg für *T. gondii* und Immunglobuline dient.
Als Versuchstiere dienten die Ratten aus 3.1.3/4, deren Milch mittels HFF–Zellkultur und Bioassay bereits auf *T. gondii* getestet wurde. Wie bereits in 3.1.3/4 beschrieben wurde den am 13.Tag ihrer Tragzeit oral mit 180 bzw.250 Zysten von *T. gondii* (Stamm Prugniaud) oder i.v. mit 10^7 Tachyzoiten (Stamm RH) inokulierten Ratten neben Milch jeden zweiten Tag Blut entnommen und beides auf die oben genannten Immunglobuline getestet. Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren, die ebenfalls verpaart aber naiv belassen wurden. Die Nachkommen dieser Gruppe wurden dann mit denen der inokulierten Ratten ausgetauscht.

3.4.1 Korrelation von IgG2b und IgM in Serum und Milch infizierter Ratten

Sowohl bei den oral (250 und 180 Zysten, Stamm Prugniaud), als auch bei den i.v. (10^7 Tachyzoiten, Stamm RH) inokulierten Rattenmüttern konnte in der Interphase der Milch und im Serum ein kontinuierlicher Anstieg der IgG2b Antwort gegen *T. gondii* von Tag zwei bis Tag zehn p.p. nachgewiesen werden. Die IgM Antikörper stiegen in Milch und Serum gleichermaßen bis zu Tag vier bzw. sechs p.p. an und fielen im weiteren Verlauf wieder ab (Abb. 14, 15).

Inokulationsweg: oral, Parasitenstamm: Prugniaud, Zysten

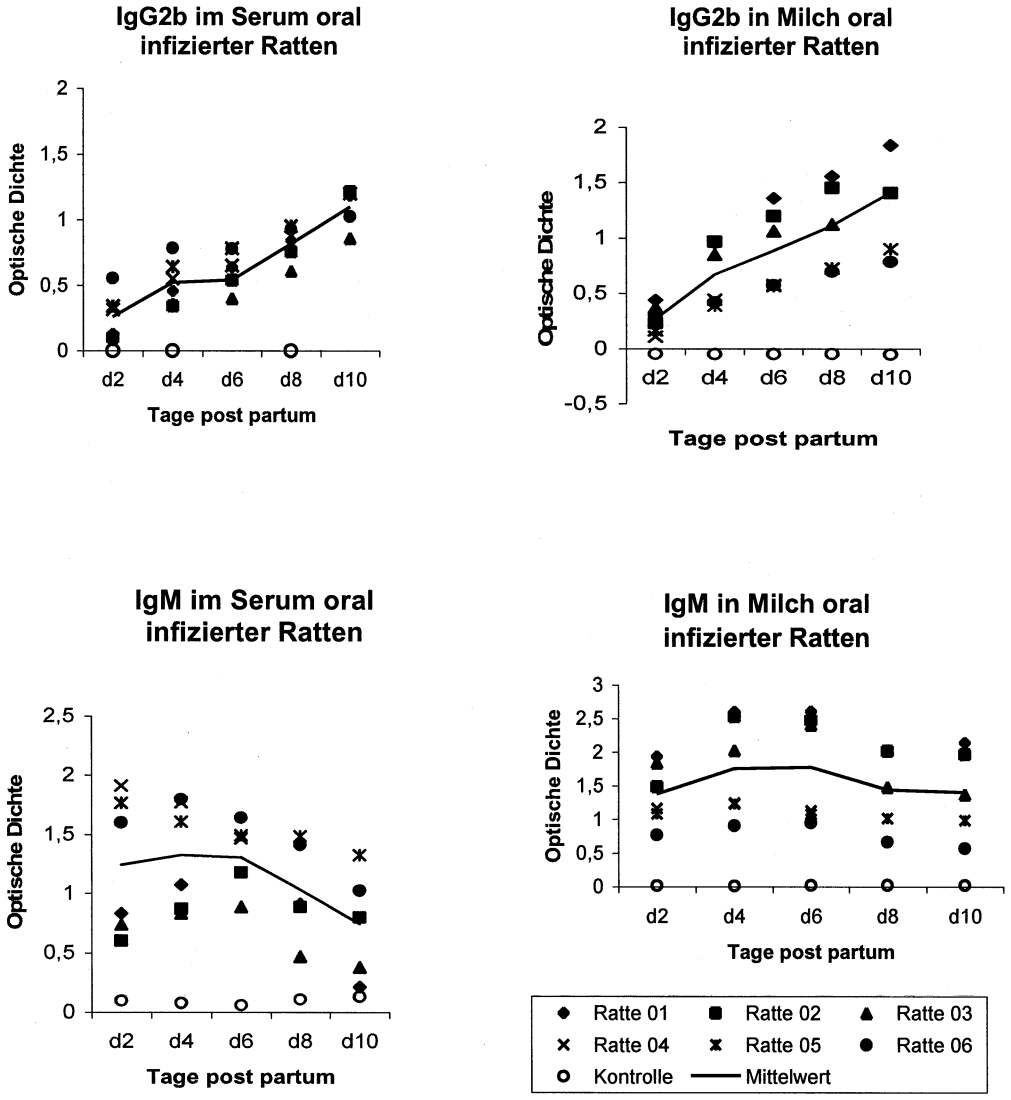


Abb. 14 ELISA-Einheiten von spezifischen Antikörpern (IgG2b, IgM) gegen *T. gondii* in Serum und Milch von infizierten F344 Ratten, die am 13.Tag ihrer Tragzeit mit 250 (Ratte 01-03) bzw. 180 Zysten (Ratte 04-06), Parasitenstamm Prugniaud, oral inokuliert worden waren, und einer naiven Ratte als Kontrolle. Serum und Milch wurde jeweils n Tage post partum abgenommen.

Inokulationsweg: intravenös, Parasitenstamm: RH, Tachyzoiten

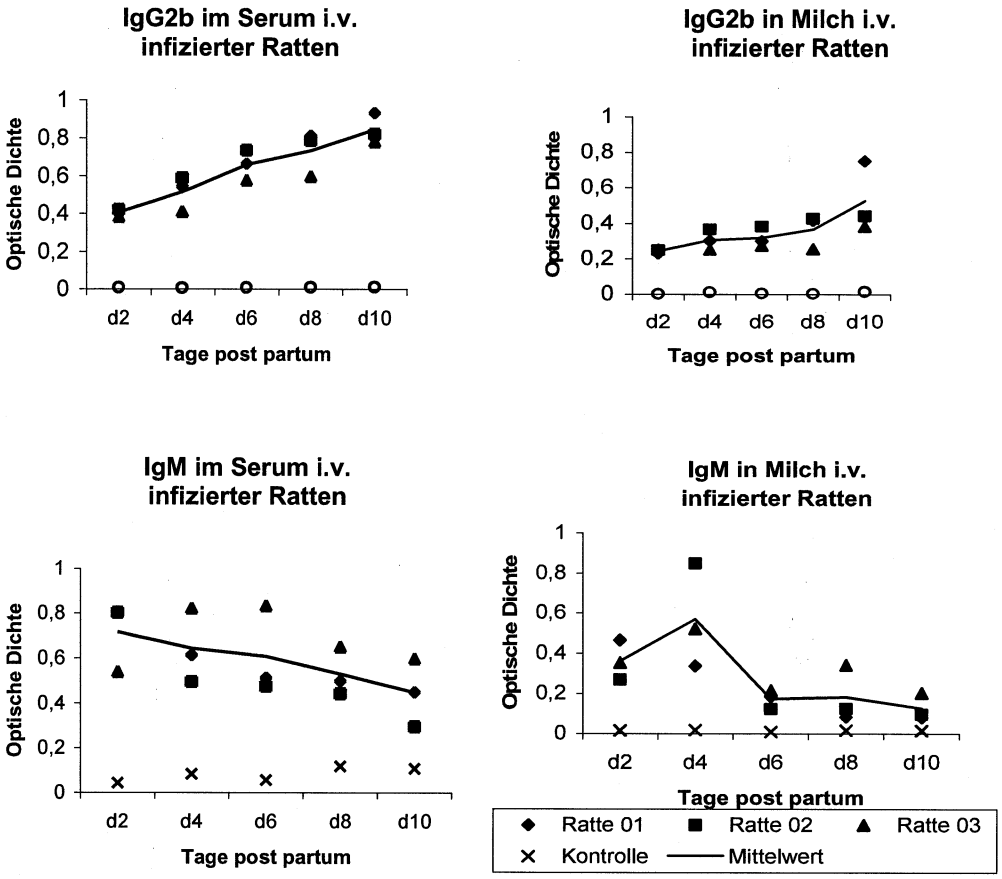


Abb. 15 ELISA-Einheiten von spezifischen Antikörpern (IgG2b, IgM) gegen *T. gondii* in Serum und Milch von infizierten F344 Ratten (Ratte 01-03), die am 13. Tag ihrer Tragzeit mit 10^7 Tachyzoiten (Parasitenstamm RH) i.v. inokuliert worden waren, und einer naiven Ratte als Kontrolle. Serum und Milch wurde jeweils n Tage post partum abgenommen.

3.4.2 Analyse via Milch inokulierter Nachkommen

Den Nachkommen, die von naiven Ratten geboren, aber von inokulierten Ratten gesäugt worden waren, wurde vier und acht Wochen p.p. Blut über den retroorbitalen Venenplexus abgenommen und das Serum in einem indirekten ELISA auf *T. gondii* spezifische Antikörper (IgG2b, IgM) getestet. Die Gehirne wurden acht Wochen p.p. mikroskopisch auf *T. gondii* Zysten hin untersucht und bei einem negativen Ergebnis NMRI Mäusen intraperitoneal gespritzt. Die Gehirne der Mäuse wurden wiederum sechs Wochen p.i. auf Gehirnzysten untersucht und das Mäuseserum auf Antikörper gegen *T. gondii* getestet.

Im parasitenspezifschen Antikörper-ELISA zeigten die über die Milch inokulierten Nachkommen, deren Ammenmütter mit 250 bzw.180 Zysten (Stamm Prugniaud) oral inokuliert worden waren (3.1.3/4), nach vier Wochen p.p. eine deutliche IgG2b Antwort, die im Alter von acht Wochen wieder zurückging. Die IgM Antwort war nach vier Wochen p.p. schwach, und nach acht Wochen p.p. nahe der Nachweisgrenze (Abb. 16).

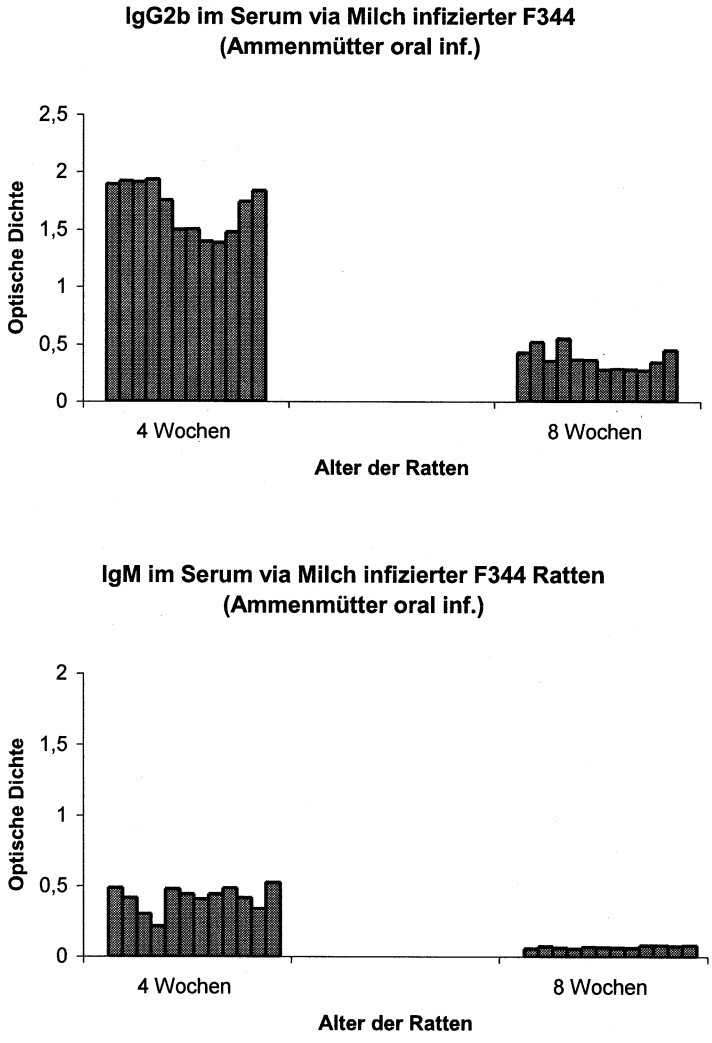


Abb. 16
Dargestellt sind die ELISA-Einheiten von spezifischen Antikörpern (IgG2b, IgM) im Serum via Milch inokulierter F344 Ratten, deren Ammenmütter oral 250 Zysten, (Parasitenstamm Prugniaud) verabreicht worden waren. Das Serum wurde vier und acht Wochen nach der Geburt abgenommen.

Ratte 1-12:

Die Tiere, die von i.v. infizierten Ammenmüttern gesäugt worden waren, zeigten im Antikörper-ELISA im Alter von vier Wochen eine deutliche IgG2b Antwort, die weitere vier Wochen später rückläufig war (Abb. 17). Antikörper der Klasse IgM ließen sich im Serum dieser Versuchsgruppe weder nach vier, noch nach acht Wochen nachweisen (Werte nicht dargestellt).

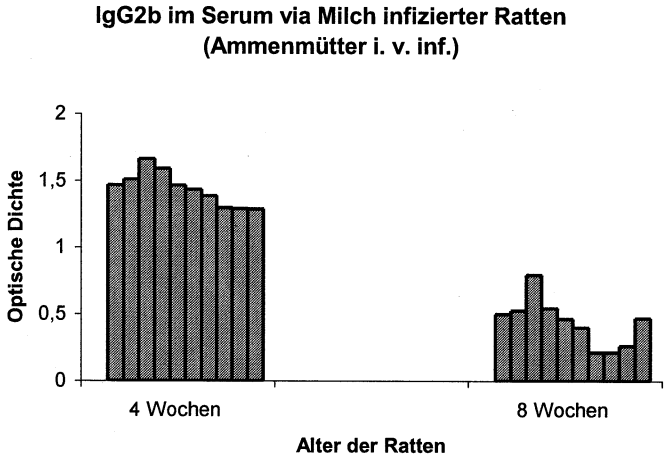


Abb. 17
Dargestellt sind die ELISA-Einheiten von spezifischen Antikörpern (IgG2b) im Serum via Milch inokulierter F344 Ratten, deren Ammenmüttern, i.v. 10^7 Tachyzoiten, (Parasitenstamm RH) verabreicht worden waren. Das Serum wurde vier und acht Wochen nach der Geburt abgenommen.

Weder in den Gehirnen jener Nachkommen, die von oral mit *T. gondii* inokulierten Ammenmüttern gesäugt, noch in den Gehirnen der Nachkommen, die von i.v. mit *T. gondii* inokulierten Ammenmüttern gesäugt worden waren, konnten Zysten gefunden werden. Die mikroskopisch negativen Hirnhomogenisate wurden intraperitoneal in NMRI Mäuse injiziert, deren Gehirne sechs Wochen später wiederum auf Zysten durchsucht wurden. Das Serum der Mäuse wurde auf Antikörper gegen *T. gondii* getestet. Weder in den Gehirnen noch im Serum der Mäuse konnte ein positiver Nachweis erbracht werden.

4. Diskussion

4.1 Nachweis von *T. gondii* in Rattenmilch

Mehrere Studien haben bereits das Vorhandensein von Tachyzoiten von *T. gondii* in der Milch verschiedener Spezies wie beispielsweise Mäusen, Katzen, Schafen und Ziegen beschrieben (Dubey, 1988; Pettersen, 1984; Powell et al., 2001; Tenter et al., 2000). Als Nachweismethoden dienten bislang der indirekte Nachweis über via Milch infizierte Nachkommen, die von naiven, d.h. nachweislich nicht infizierten Tieren, geboren, jedoch von infizierten Müttern gesäugt wurden, über die Injektion von Milch infizierter Tiere in Mäuse (Bioassay) und über die PCR. Ziel dieser Arbeit war es, eine einfache Methode zu finden, mit der es möglich ist, den Parasiten *T. gondii* in der Milch infizierter Tiere, insbesondere in der Milch infizierter Ratten nachzuweisen. Eine Melkvorrichtung wurde nach dem Protokoll von Rodgers (Rodgers, 1995), das stark modifiziert wurde, entwickelt und ein Melkprotokoll zur Milchgewinnung erstellt. Als Vorlage dienten die Arbeiten von Rodgers und Yagil et al. (Yagil et al., 1976). F344 Ratten konnten somit 48 Stunden nach der Geburt ihrer Nachkommen jeden zweiten Tag effektiv – die Milchmenge lag dabei abhängig von der Zeitspanne nach der Geburt zwischen 400 µl und 1200 µl – gemolken werden. Zur direkten visuellen Erfassung von *T. gondii* in der Milch mit dem Mikroskop wurden, unter der Annahme der Übertragung von T. *gondii* in der Rattenmilch als freier Tachyzoit, zur Simulation Tachyzoiten des Parasiten in die frische Rattenmilch gegeben. Der hohe Fettanteil und die Vielzahl der zellulären Bestandteile der Milch erschwerten den direkten visuellen Nachweis des Parasiten allerdings dermaßen, dass die in vitro zugegebenen Tachyzoiten zwar vereinzelt (Abb. 4) gesichtet werden konnten, allerdings erst ab einer Konzentration von 1000 Parasiten/ml Milch. Eine Verbesserung dieses Ergebnisses konnte auch nicht durch eine stärkere Aufreinigung der Proben mittels Zytospin-Zentrifugation und anschließender Giemsa-Färbung, oder durch die Erstellung von Dichtegradienten mittels Ficoll- und Percoll-Lösungen (Omata et al., 1997) zur gezielten Anreicherung der Toxoplasmen erreicht werden.

Die Verwendung von HFF-Zellkulturen zur Anzucht von *T. gondii* ist ein bereits etabliertes Verfahren. Anhand der Vermehrung des Parasiten und der damit einhergehenden Lyse des Zellrasens lässt sich das Parasitenwachstum leicht feststellen.

Nguyen et al., verwendeten beispielsweise HFF-Zellkulturen zum Nachweis von Tachyzoiten und Bradyzoiten in Blut, Urin und Gehirnen von infizierten Mäusen (Nguyen et al., 1996). Daher wurden in dieser Arbeit HFF-Zellkulturen auch zum Nachweis von *T. gondii* in Rattenmilch herangezogen. Diese Methode erwies sich als außerordentlich sensitiv, denn es gelang die Vermehrung des Parasiten mittels Fibroblasten, die mit nur zwei Tachyzoiten/500 µl Milch versetzt worden waren (Tab. 1). Die Bestandteile der Rattenmilch inhibierten demzufolge nicht das Wachstum der Fibroblasten oder die Vermehrung des Parasiten. Die Methode eignete sich nicht nur für den Nachweis von in vitro zugegebenen Tachyzoiten in Milch, sondern ebenso für den Parasitennachweis in der Milch von zuvor oral mit Gewebezysten von *T. gondii* inokulierten, trächtigen F344 Ratten. Es zeigten sich selbst bei einer Verdünnung der Milchsuspension von 1:10 für *T. gondii* positive Zellkulturen von Tag zwei bis zu Tag acht p.p. (Tab. 2 und 3), was ungefähr den Tagen zehn bis 18 p.i. entspricht. Die Kontrollen im Bioassay und in der Gehirnanalyse bestätigten das Ergebnis. Durch die weitere Verdünnung der Milchsuspension wurde die Sensitivität des Systems im Falle der Übertragung nur geringer Parasitenzahlen erfolgreich getestet. Es konnte somit mittels einer einfachen Methode bewiesen werden, dass *T. gondii* über die Rattenmilch übertragen wird.

Die PCR ist ein gängiges und ausgesprochen sensitives, Verfahren zum Nachweis von *T. gondii*-DNA (Cazenave et al., 1992, Savva et al., 1990), und wurde auch schon mehrfach zum Nachweis des Parasiten in Milch (Powell et al., 2001) angewandt. In unseren Versuchen zeigte sich allerdings, dass das B1-Gen von *T. gondii* zwar in den in vitro angefertigten Proben von Tachyzoiten in Milch und PBS bestimmt werden konnte, jedoch nicht in den mittels Bioassay und HFF-Zellkultur nachweislich für *T. gondii* positiven Milchproben der oral infizierten Ratten (Abb. 6). Möglicherweise findet sich hier ein indirekter Hinweis auf eine intrazelluläre Übertragung von *T. gondii* in der Rattenmilch, denn es gelang grundsätzlich der Nachweis des Parasiten in Milch mittels PCR, allerdings nur im Falle von extrazellulären Tachyzoiten, die in die Milch gegeben wurden und deren DNA mit der von uns angewandten Methode gewonnen werden konnte. Intrazellulär vorkommende Parasiten waren für die DNA-Gewinnung möglicherweise nicht zugänglich und konnten somit nicht nachgewiesen werden. Hamprecht et al., beschrieben in ihrer Arbeit gravierende Unterschiede beim Nachweis

des humanen Zytomegalievirus (HCMV) in der Muttermilch seropositiver Frauen in zellfreien und zellhaltigen Komponenten der Milch (Hamprecht et al., 1998).

Unbewiesen bleibt weiterhin, ob der Parasit extrazellulär als freier Tachyzoit, als Bradyzoit in Gewebezysten oder intrazellulär übertragen wird. Ein mögliches Erklärungsmodell wurde bereits unter 1.2.2 beschrieben. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass *T. gondii* zwar in der Milch von oral mit Gewebezysten (Stamm Prugniaud) infizierten Ratten nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht in der Milch von i.v. mit Tachyzoiten (Stamm RH) infizierten Tieren. In der akuten Phase einer Infektion mit *T. gondii,* die normalerweise in den ersten acht bis zwölf Tagen p.i. (Sumyuen et al., 1995), breiten sich Tachyzoiten im gesamten Organismus aus und finden sich, im Falle oral mit Zysten infizierter Ratten nach acht Tagen, auch im Blut (Zenner et al., 1998). Es wird angenommen, dass *T. gondii* während der Phase der Parasitämie Epithelbarrieren überwindet und in die Milch gelangt. Da der Parasit bestrebt ist, seinen Wirt am Leben zu erhalten, setzt eine rasche TH1-Zell vermittelte Immunantwort ein (Yap and Sher, 1999), die die rapide Replikation der Tachyzoiten vorwiegend durch γ-Interferon eindämmt (Pfefferkorn, 1984). Demnach ist denkbar, dass durch die am 13. Tag der Tragzeit der Ratten erfolgte intravenöse Injektion von Tachyzoiten direkt in die Blutbahn eine akute Infektion simuliert und der Parasit noch vor dem Übertritt in die Brustdrüsenepithelien eingedämmt wurde.

4.2 Übertragung von Immunglobulinen über die Milch

Paul Ehrlich zeigte schon im Jahr 1892 anhand eines Mausmodells, dass Feten und Neugeborene einen sog. immunologischen Nestschutz von der Mutter erhalten (Ehrlich, 1892). Dies geschieht bereits pränatal über die Plazenta oder postnatal über die Muttermilch. Bedeutend ist dabei der Transfer von Immunglobulinen, insbesondere IgA und IgG, die dem Neugeborenen bis zur Ausreifung des eigenen Immunsystems, Schutz gegen viele pathogene Keime verleihen.
In den Experimenten von Sepulveda Arias und Herrmann (unveröffentlichte Daten) konnte im Serum via Milch mit *T. gondii* infizierten F344 Ratten und LEW Ratten einen Monat nach der Geburt IgG2b nachgewiesen werden, aber nicht mehr im Alter von sechs Monaten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei dem nachgewiesenen

IgG2b um maternales Immunglobulin handelte, das über die Muttermilch aufgenommen wurde, und nicht um von den infizierten Jungtieren selbst synthetisiertes IgG2b.
In dieser Arbeit wurden zur Bestätigung der Vermutung der maternalen Immunglobulin Übertragung, trächtige F344 Ratten mit TAg immunisiert, die Nachkommen der immunisierten Ratten mit den Nachkommen naiver Ratten ausgetauscht und das Serum sowohl von den Muttertieren als auch von den Nachkommen auf IgG2b und IgM getestet. Da *T. gondii* über die Muttermilch übertragen wird und in den Nachkommen eine Immunantwort mit Antikörperproduktion auslösen kann, wurden in diesem Experiment die Ratten lediglich immunisiert und nicht infiziert. Obgleich die gemessenen Werte der Antikörper nahe der Nachweisgrenze lagen, waren die Werte für IgG2b und IgM im Serum und in der Milch der immunisierten Ratten dennoch höher als bei den nicht immunisierten Kontrolltieren (Abb. 7). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass sich nach einer erfolgreichen Immunisierung mit TAg, Antikörper in der Milch finden und die Ratten eine Immunantwort mit typisch zeitlich ansteigendem Kurvenverlauf für IgG2b ab Tag sechs nach der Immunisierung (entsprechend Tag zwei p.p.) entwickelten. Die Verlaufskurve für IgM zeigte zunächst einen Anstieg der Antikörperkonzentration und flachte ab Tag sechs bzw. acht nach der Immunisierung (entsprechend Tag zehn bzw. 12 p.p.) wieder ab.
Im Serum der ausgetauschten Nachkommen fanden sich IgG2b Antikörper gegen TAg. Auffallend war dabei, dass die Konzentration der Antikörper im Serum 14 Tage nach dem Austausch und somit nach 14-tägiger oraler Aufnahme von Antikörpern über die Milch, ähnlich den Antikörper-Werten der Mütter war, dann aber 28 Tagen nach dem Austausch stark zurück ging (Abb. 8). Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass bei Nagetieren IgG, das über die Muttermilch oral aufgenommen wurde, von Enterozyten im duodenalen und jejunalen Abschnitt des Darms mit Hilfe des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) erkannt, aufgenommen und in die Blutbahn geschleust wird (Van de Perre, 2003). Dieser Rezeptor, der in seiner Struktur dem MHC-Klasse-I-Molekül ähnelt (Simister and Mostov, 1989), erkennt vorwiegend IgG2a und IgG2b Antikörper (Van de Perre, 2003) und transportiert sie durch Transzytose abhängig vom pH-Wert von apikal (Lumenseite, pH 6-6,5) nach basolateral (Blutseite, pH neutral) und umgekehrt (Dickinson et al., 1999). Im Gegensatz zum Menschen erfolgt bei Nagetieren im Alter von drei bis vier Wochen, d.h. sobald die Nachkommen entwöhnt werden, ein Rückgang der Expression des FcRn um das 1000fache (Yoshida et al., 2004) und somit

eine Reduktion der maternalen Immunglobulinaufnahme. Mit dieser Beobachtung lässt sich der Rückgang der IgG2b Konzentration im Serum der vier Wochen alten Nachkommen erklären. IgM wird nicht über den FcRn in die Blutbahn aufgenommen, sondern bindet, ebenso wie IgA, an den polymerischen Immunglobulinrezeptor (pIgR), ein Transmembranprotein, das an der basolateralen Seite von Epithelzellen lokalisiert ist. Dieser Rezeptor transportiert Immunglobuline allerdings nur vom basolateralen, das heißt aus dem Blut, zum luminalen Pol hin (Rojas and Apodaca, 2002). Somit lässt sich zwar erklären, wie IgM in die Milch immunisierter Ratten gelangt, jedoch nicht, die Aufnahme des Immunglobulins aus der Milch und der Transport in den Blutkreislauf der Ratten. Im Serum der ausgetauschten Nachkommen ließen sich aber IgM-Antikörper nach 14 und 28 Tagen nachweisen. Dabei zeigte sich nach 28 Tagen bei den Jungtieren, die von Ratte 01 und Ratte 03 gesäugt worden waren, ein leichte Abnahme der Antikörperkonzentration, während sich bei denen, die von Ratte 02 gesäugt worden waren, sogar eine leichte Zunahme verzeichnen ließ. Dieses Ergebnis kann somit am ehesten als falsch positiv gewertet, bzw. sollte Western-Blot verifiziert werden.

4.3 Tachyzoiten in Milch – eine Infektionsquelle ?

Können oral via Milch aufgenommene Tachyzoiten von *T. gondii* in neugeborenen Ratten eine Infektion auslösen? Ist für eine Infektion eine Mindestdosis erforderlich, und gibt es Unterschiede zwischen dem virulenten Typ I Parasitenstamm RH und dem Typ II Stamm NTE bezüglich ihrer Infektiosität (Sibley and Boothroyd, 1992)? Diese Fragen sollten mit den Versuchen in 3.3 beantwortet werden. Channon et al. zeigten bereits, dass Tachyzoiten über den Darm aufgenommen werden und sich in Trägerzellen über den peripheren Blutstrom im gesamten Organismus ausbreiten (Channon et al., 2000) Insbesondere ist der Parasitenstamm RH in der Lage, Epithelbarrieren wie beispielsweise im Darm vorhanden, zu überwinden (Barragan and Sibley, 2002). Ferner konnte Dubey 1998 nachweisen, dass hohe Konzentrationen (> 1000) oral aufgenommener Tachyzoiten in Mäusen und Katzen durchaus eine Infektion hervorrufen können (Dubey, 1998a).

So wurden 48 Stunden alte F344 Ratten mit Tachyzoiten (Stamm RH und NTE), die zuvor in frische Milch gegeben wurden, oral inokuliert und auf Zeichen einer Infektion bzw. Immunantwort getestet. Eine mögliche Reduktion der Infektiosität der

Toxoplasmen durch das im Digestionstrakt vorhandene saure Milieu (Sharma and Dubey, 1981), sollte durch das sehr frühe Füttern der Ratten im Alter von 48 Stunden und durch die Verwendung von Milch verhindert werden, denn zum einen sind Magensäure und Verdauungsenzyme in der neugeborenen Ratte noch nicht voll ausgebildet, zum anderen wirkt Milchfett als Puffer gegen Säure. Wie sich zeigte waren im Falle einer Inokulation mit dem Parasitenstamm RH, 100 Toxoplasmen ausreichend, um sowohl eine Infektion (vgl. Bioassay), als auch eine humorale und zelluläre Immunantwort in der Ratte auszulösen. Allerdings gelang dies nur mit einer Ratte. Anhand der Analyse der anderen Ratte zeigten sich keinerlei Hinweise auf eine Infektion oder Immunantwort. Ähnliche Resultate ergaben sich bei einer Inokulation mit 1000 bzw. 100.000 Tachyzoiten. Bemerkenswert war, dass eine der Ratten, die mit 10.000 bzw. 100.000 Toxoplasmen inokuliert worden war, sich zwar im Bioassay als positiv für eine Infektion erwies, jedoch fanden sich keine Zeichen einer humoralen oder zellulären Immunantwort (Tab. 6). Wurde den Ratten der Parasitenstamm NTE verabreicht, so konnte teilweise, bei vereinzelten Ratten aus einer Gruppe (erhielten gleiche Anzahl an Toxoplasmen), eine erfolgreiche Infektion mit korrelierender Immunantwort nachgewiesen werden. Die Anzahl der verfütterten Tachyzoiten spielte dabei wieder keine Rolle (Tab. 6).

	Anzahl	Antikörper					Bioassay	
Ratte	Tachyzoiten	IgG2b	IgM	LTT	IFN-γ	Zysten	IgG	Zysten
724	100 RH	1,193	0,35	+	+	-	2,718	+
723	1000 RH	1,215	0,226	+	+	-	1,425	+
732	10.000 RH	0	0,142	-	-	-	0,643	+
729	100.000 RH	0	0,171	-	-	-	1,324	+
731	100.000 RH	1,642	0,279	+	+	-	1,02	+
559	10 NTE	0,781	0,15	+	+	-	-	-
565	1000 NTE	0	0,105	+	+	-	0,52	+
557	10.000 NTE	0,606	0,429	+	+	-	0,7	+
555	100.000 NTE	0,942	0,276	+	+	-	0,501	+

Tab. 6: Zusammenstellung der Ergebnisse aus 3.3

In der Immunologie bedeutet Toleranz die Unfähigkeit auf ein Antigen zu reagieren.
Bei der Nahrungsaufnahme gerät die gastrointestinale Mukosa in Kontakt mit Antigenen aus der Nahrung, deren Aufnahme entweder zu einer lokalen Abwehr mit Bildung von sekretorischem IgA führt, oder in der Bildung einer systemischen

Immuntoleranz, der sog. oralen Toleranz (OT), endet (Marth and Zeitz, 1999; Mowat, 1987).

Nach heutigem Verständnis erfolgt bei der OT eine Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen, die eine gesteigerte Ausschüttung von supprimierenden Zytokinen aufweisen. Von besonderer Bedeutung ist dabei die T-Zellsubklasse T-Helfer–Typ–3 (TH3), die den Transforming growth factor-β (TGF-β) produziert, der wiederum einen suppressiven Effekt auf die Bildung von inflammatorisch wirkenden TH1-Zellen zeigt (Chen et al., 1994). Das Phänomen der OT ist ein mögliches Erklärungsmodell für die unterschiedlichen Resultate bei der oralen Inokulation von Tachyzoiten über die Milch. Das teilweise Ausbleiben einer zellulären und humoralen Immunantwort, sowie die geringen Mengen an nachweisbarem IFN-γ könnten den suppressiven Effekt von TGF-β widerspiegeln. Allerdings wurde in der Versuchsreihe kein Nachweis von TGF-β durchgeführt, so dass fraglich bleibt, ob der Faktor überhaupt vorhanden war. Weiter lässt sich mit OT nicht erklären, warum es trotz Verwendung gleicher Parasitenzahlen nur teilweise gelang, eine Infektion oder Immunantwort, bzw. beides auszulösen. Diese Fragen bleiben weiterhin offen. Feststellen lässt sich letztlich nur, dass, sollte es in vivo zu einer Übertragung von nur wenigen freien, extrazellulären Tachyzoiten unabhängig, ob es sich um einen virulenten Klasse I Stamm (RH) oder einen weniger virulenten Klasse II Stamm (NTE) handelt, über die Muttermilch kommen, eine Infektion der Nachkommen möglich ist.

4.4 Milch als Transmissionsweg für *T. gondii* und Immunglobuline

In Kapitel 4.2. wurde bereits die Übertragung maternaler Immunglobuline über die Milch und die Funktion des FcRn beschrieben. Mit den Versuchen in 3.4. sollten zum einen die Resultate des Immunisierungsexperiments bestätigt werden, zum anderen Ratten in vivo über Milch mit *T. gondii* infiziert werden.

Trächtige F344 Ratten wurden entweder oral mit Zysten, oder i.v. mit Tachyzoiten inokuliert und die humorale Immunantwort in Serum und Milch über einen bestimmten Zeitraum nach der Geburt getestet. Neugeborene Ratten von nachweislich nicht infizierten Müttern wurden von den infizierten Ammenmüttern gesäugt und wiederum die humorale Immunantwort untersucht. Weiter wurden die Gehirne der möglicherweise

über die Milch infizierten Jungtiere auf Zeichen einer erfolgreichen Infektion (Zysten) mikroskopisch durchsucht.

Unabhängig von Inokulationsmodus (oral, i.v.) und Parasitenstamm (Prugniaud, RH) konnten die trächtigen Ammenmütter mit *T. gondii* erfolgreich infiziert werden. Der Kurvenverlaufs der Antikörper IgG2b und IgM, der zum Nachweis der humoralen Immunantwort von Tag zwei bis Tag zehn nach der Geburt erstellt wurde, zeigte eine eindeutige Korrelation zwischen den Immunglobulinen im Serum und in der Milch, d.h. die Menge der in der Muttermilch enthaltenen Antikörpern ist abhängig vom Antikörpergehalt des Serums und die Immunglobuline IgG2b und IgM sind in der Rattenmilch enthalten und können übertragen werden. Im Serum der Nachkommen, die die Milch mit den darin enthaltenen Antikörpern aufgenommen haben, fand sich IgG2b, das allerdings nach acht Wochen rückläufig war. Handelte es sich dabei um maternales Immunglobulin, das über den FcRn aus der Milch aufgenommen wurde, oder um von den Nachkommen selbst synthetisiertes, da mit der Milch auch der Parasit übertragen wurde? Neben IgG2b fand sich im Serum der Nachkommen, die von oral infizierten Ratten gesäugt wurden, auch IgM, das, im Gegensatz zu IgG2b (4.2) bekanntlich zwar in der Milch enthalten ist, jedoch nicht über die Darmmukosa aufgenommen werden kann. Liegt hier eine Eigensynthese von Immunglobulinen vor? Man weiß, dass über die Milch nicht nur Immunglobuline und lösliche Komponenten übertragen werden, sondern auch zelluläre, vorwiegend Leukozyten (Weiler et al., 1983), die sich nach oraler Aufnahme insbesondere in der Leber des Neugeborenen wieder finden (Zhou et al., 2000). Arvola et al. zeigten schließlich im Mausmodell, dass B-Zellen und Plasmazellen, die bekanntlich für die Produktion von Antikörpern verantwortlich sind, von der Mutter über die Milch auf die Nachkommen übertragen werden und Immunglobuline synthetisieren (Arvola et al., 2000). Mit dieser Tatsache lässt sich das Vorkommen der Antikörper, insbesondere von IgM, im Serum der Ratten durchaus erklären. Auch der deutliche Rückgang von IgG2b nach acht Wochen könnte ein Hinweis auf den maternalen Ursprung antikörperproduzierender Zellen sein, denn in den Arbeiten von Arvola ist die Synthese von Immunglobulinen dieser Zellen ebenso zeitlich begrenzt.

Da *T. gondii* die Fähigkeit besitzt, aktiv Leukozyten zu penetrieren (Channon et al., 2000; Dubey, 1997) ist es auch denkbar, dass der Parasit über die in der Milch enthaltenen Zellen, in den Organismus der gesäugten Ratten gelangte und eine humorale

Immunantwort auslöste. Gegen eine Infektion via Milch spricht allerdings, dass in den Nachkommen keine eindeutigen Zeichen einer Toxoplasma-Infektion, wie beispielsweise Gehirnzysten bei der Verwendung eines zystenbildenden Parasitenstammes (Prugniaud), gefunden werden konnten und auch der Bioassay zeigte ein eindeutig negatives Ergebnis. Ferner konnte im Serum bereits nach acht Wochen ein deutlicher Rückgang der IgG2b Antwort vermerkt werden.
Möglicherweise ist auch das Phänomen der Toleranz für die fehlenden Infektionszeichen und den Rückgang der Antikörperantwort verantwortlich, denn man weiß aus Arbeiten in der Maus, dass im Falle einer kongenitalen Infektion, maternale Antikörper ein Stadium der Toleranz in den infizierten Nachkommen hervorrufen können (Suzuki and Kobayashi, 1990).

4.5 *T gondii* und die Muttermilch

In dieser Arbeit wurde veranschaulicht, dass Rattenmilch ein Medium ist, das in ausreichender Menge für Analysezwecke gewonnen werden kann und mit dem sich gängige Labormethoden (Bioassay, ELISA, PCR) durchführen lassen. Es konnte gezeigt werden, dass Milch als Transmissionsweg für Immunglobuline dient und dabei eine deutliche Korrelation zwischen Serum- und Milch-Immunglobulin besteht.
Mittels HFF-Zellkultursystem, ein zuverlässiges und einfaches Testsystem für den Nachweis von *T. gondii* in der Milch, und Bioassay wurde bewiesen, dass der Parasit *T. gondii* tatsächlich auch in der Milch infizierter Ratten vorkommt. Unklar ist neben der Frage in welcher Form der Parasit über die Milch übertragen wird, auch die Frage der klinischen Konsequenz und Relevanz einer Transmission, insbesondere für den Menschen. Im Falle von HIV weiß man um das Risiko einer Infektion des Neugeborenen über die Muttermilch und wägt daher Nutzen und Risiko des Stillens für das Kind ab. In der Literatur findet sich lediglich ein Fall, in dem vom Auftreten einer Toxoplasmose in einem gestillten Kind berichtet wird, dessen Mutter an einer Erstinfektion mit *T. gondii* erkrankt war (Bonametti et al., 1997). Langer musste 1963 seinen Bericht über den Nachweis von *T. gondii* in der Muttermilch infizierter Frauen revidieren, nachdem sich herausstellte, dass eine Kontamination durch Pollen vorlag (Langer, 1963). Immer wieder wird auf eine Infektion mit *T. gondii* im Menschen durch den Konsum frischer Ziegenmilch hingewiesen. Sacks berichtete vom Auftreten einer

akuten Toxoplasmose in zehn von 24 Familienmitgliedern nach dem Verzehr roher Ziegenmilch und schlussfolgerte daraus eine Übertragung von *T. gondii* von der Ziege über ihre Milch auf den Menschen. Doch ist es nicht auch möglich, dass die Milch mit Zysten oder Oozysten von herumstreunenden Katzen kontaminiert war? Feststeht, der Parasit *T. gondii* findet sich in der Milch vieler Säugetiere und ließ sich nun auch in der Rattenmilch nachweisen. Unbeantwortet bleibt jedoch die Frage der Konsequenz im Falle einer Übertragung auf die Nachkommen.

5. Zusammenfassung

Toxoplasma gondii, der Erreger der Toxoplasmose, ist der weitverbreitetste Parasit des Menschen. Die Infektion mit dem Erreger verläuft in der Regel inapparent, außer bei in utero infizierten oder immunsupprimierten Individuen, wo sie sogar einen letalen Ausgang nehmen kann. Konsum maternaler Milch ist in einigen Tierarten als Infektionsweg beschrieben, jedoch sind die Mechanismen der Transmission und ihre immunologischen Konsequenzen weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden im Versuchstier Ratte Erregertransmission über die Muttermilch und deren immunologische Konsequenzen analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Rattenmilch als labordiagnostisches Medium eignet, wobei der direkte visuelle Parasitennachweis mit dem Lichtmikroskop aufgrund des hohen Fettanteils und der vielen zellulären Bestandteile der Milch erfolglos blieb, wie auch die visuelle Erfassung geringer Mengen experimentell zugegebener Tachyzoiten. Selbst Zytospin-Zentrifugation und Giemsafärbung, sowie Ficoll-oder Percolldichtegradienten zur Parasitenanreicherung, erlaubten keinen direkten Nachweis geringer Parasitenkonzentrationen.

Mittels der PCR konnte das B1-Gen von *T. gondii* in DNA, die aus mit Tachyzoiten versetzter Milch extrahiert wurde, nachgewiesen werden, jedoch nicht in DNA, die aus nachweislich *T. gondii* positiver Milch oral infizierter Ratten extrahiert wurde. Daher eignete sich auch die PCR für unsere Versuche nicht als Nachweismethode.

Als geeignete und sensitive Methode für den Parasitennachweis in Rattenmilch stellte sich die Anzucht auf humanen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellkultur), ein allgemein etabliertes Verfahren zur Anzucht von *T. gondii,* heraus, wobei bereits zwei Tachyzoiten, die in vitro zu Milch nicht infizierter Tiere gegeben wurden, ausreichten, um eine HFF-Zelle zu infizieren. Die Milch oral und i.v. mit *T. gondii* inokulierter Ratten wurde mittels HFF-Zellkulturen analysiert; im Falle der oral inokulierten Muttertiere gelang es, Parasitenwachstum in der Zellkultur nachzuweisen und somit mittels einer einfachen Methode zu beweisen, dass Milch akut infizierter Tiere, Parasiten enthalten und als Transmissionsweg für *T. gondii* dienen könnte.

Immunisierungsexperimente wurden durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die im Serum von Jungtieren nachgewiesenen Toxoplasma-spezifischen Immunglobuline über die Muttermilch aufgenommen worden sein könnten. Hierzu wurden Ratten mit Toxoplasma-Antigen immunisiert und als Ammen für die Nachkommen nicht-infizierter Ratten benutzt. Es gelang, in Milch und Serum der Ammen, sowie im Serum der Jungtiere, *T. gondii* spezifische Immunglobuline nachzuweisen.

Die Transmission des Parasiten als freier Tachyzoit wurde in dieser Arbeit simuliert. Tachyzoiten von *T. gondii* wurden in verschiedener Dosierung in Rattenmilch angereichert und 48 Stunden alten Ratten oral verabreicht. Die humorale und zelluläre Immunantwort wurde getestet, ferner ein Bioassay in Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Tachyzoiten, die über die Milch aufgenommen wurden, eine Infektion auslösen können. Die gelegentliche Diskrepanz zwischen dem Auftreten einer humoralen oder zellulären Immunantwort und einer echten Infektion sowie die uneinheitliche Reaktion der Ratten auf das Verabreichen gleicher Parasitenzahlen wurde mit dem Phänomen der oralen Toleranz erklärt.

Zuletzt wurden Ratten auf natürlichem Wege über Milch mit *T. gondii* infiziert, die humorale Immunantwort bestimmt und der Gehalt der infizierten Rattenmilch an Immunglobulinen überprüft. Als Ammen dienten Ratten, denen oral Zysten oder i.v. Tachyzoiten appliziert wurden und deren Milch nachweislich mittels HFF und Bioassay positiv auf *T. gondii* getestet worden war. Von diesen Ammen gesäugte naive Nachkommen wurden auf die humorale Immunantwort getestet, ihre Gehirne auf Zysten untersucht und die Infektionsrate bestimmt. Die Antikörperkonzentration in Serum und Milch der Ammen zeigten eine deutliche Korrelation und im Serum der Nachkommen, fand sich IgG2b, das nach acht Wochen rückläufig war. IgM konnte nur bei den Jungtieren nachgewiesen werden, die die Milch der i.v. infizierten Mütter getrunken hatten. Zeichen einer Infektion fanden sich aber nicht.

Die Rattenmilch kann also *Toxoplasma gondii* und toxoplasmaspezifische Immunglobuline enthalten, die von Nachkommen aufgenommen werden. Den Mechanismus der Parasitenübertragung und die Rolle maternaler parasitenspezifischer

Immunglobuline für Infektion und parasitenspezifische Immunantwort der Nachkommen gilt es jedoch noch zu klären.

6. Literaturverzeichnis

Araujo F. G., Barnett E. V., Gentry L. O. and Remington J. S. (1971). False-positive anti Toxoplasma fluorescent-antibody tests in patients with antinuclear antibodies. Applied Microbiology *22*, 270-275.

Arvola M., Gustafsson E., Svensson L., Jansson L., Holmdahl R., Heyman B., Okabe M. and Ragnar M. (2000). Immunglobulin-Secreting Cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. Biol Reprod *63*, 1817-1824.

Barragan A. and Sibley L. D. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. J Exp Med *195,* 1625-1633.

Barta J. R., Jenkins M. C. and Danforth H. D. (1991). Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other Apicomplexan protozoa: monophyly of the apicomplexa is supported. Mol Biol Evol *8*, 345-355.

Benenson U. W., Takafugi E. T., Lemon S. M., Greenup R. L. and Sulzer A. J. (1982). Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. New Engl. J. Med. *307,* 666-669.

Bitter-Suermann D. (1994). Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, Seite 189-254

Bobic B., Sibalic and Djurkovic-Djakovic O. (1991). High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. Gynecol Obstet Invest *31*, 182-184.

Bonametti A. M., Passos J. N., Koga da Silva E. M. and Macedo Z. S. (1997). Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. J Trop Pediatr *43*, 116.

Burg J. L., Grover C. M., Pouletty P. and Boothroyd J. C. (1989). Direct sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii,* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol *27*, 1787-1792.

Camargo M. E., Leser P. G. and Rocca A. (1972). Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti Toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. Rev Inst Med Trop Sao Paulo *14*, 310-313.

Cazenave J., Forestier F., Bessiere M. H., Broussin B. and Begueret J. (1992). Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Prenatal Diagnosis *12*, 119-127.

Channon J. Y., Seguin R. M. and Kasper L. H. (2000). Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. Infect Immun *68*, 4822-4826.

Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A., and Weiner H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science *265*, 1237-1240.

Chiari Cde A., and Neves D. P. (1984). Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk. Mem Inst Oswaldo Cruz *79*, 337-340.

Clement J., Leyva-Cobian, F., Fernandez M. et al. (1986). Intrazellular immunoglobulins in human milk macrophages: ultrastructural localization and factors affecting the kinetics of immunologlobulin release. Int Arch Allergy Appl Immunol *80*, 291-299.

Conley F. K., Jenkins K. A. and Remington J. S. (1981). *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Hum Pathol *12,* 690-698.

De Medeiros B. C., De Medeiros C. R., Werner B., Loddo G., Pasquini R., Bleggi-Torres L F. (2001). Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. Transpl Infect Dis *3*, 24-28

De Melo E. J. and De Souza W. (1997). A cytochemistry study o the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii.* Parasitol Res *83*, 252-6.

Department of Health and Social Security (1977). The composition of mature human milk. Report 12. London, Her Majesty's Stationery Office.

Desmonts G. (1965). Étude epidemiologique sur la toxoplasmose: l'influence de la caisson des viands de boucherie sur la frequence de l'infection humaine. Revue Francaise d'Études Cliniques et Biologiques *10*, 952-958.

Desmonts G. (1987). Toxoplasmose in France. Asean J Clin Sci *7*, 89-109.

Desmonts G. and Couvreur J. (1974). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull. N. Y. A. Sci. *50*, 146

Dickinson B. L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J. C., Zhu X., Simister N. E., Blumberg R. S., Lencer W. I. (1999). Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. J Clin Invest *104*, 903-911.

Diosi P., Babusceac L., Nevinglovschi O. and Kun-Stoicu G. (1967). Cytomegalivirus infection associated with pregnancy. Lancet *7525*, 1063-1066.

Dubey J. P. (1994). Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc *205*, 1593-1598

Dubey J. P. (1996). Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. J Parasitol 82, 951-956.

Dubey J. P. (1997). Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii.* J Eukaryo Microbiol *44*, 592–602.

Dubey J. P. (1988). Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Res *49*, 910-913.

Dubey J. P. (1998a). Reexamination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitol *116*, 43-50.

Dubey J. P. and Beattle. C. P. (1988). Toxoplasmosis of animals and man (Boca Raton Fla, CRC Press Inc).

Dubey, J. P., Brake R. J., Murrell K. D., et al., (1986). Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. Am J Vet Res *47*, 518-522.

Dubey J. P. and Frenkel (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and development of Toxoplasma cysts. J Protozol *23*, 537-546.

Dubey J. P. and Frenkel (1998). Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology.
Vet Parasitol *77*, 1-32.

Dubey J. P., Kotula A. W., Sharar A., et al. (1990). Effect of high temperature on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork. J Parasitol *76*, 201-204.

Dubey J. P., Lindsay D. S. and Speer C. A. (1998b). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev *11*, 267-299.

Dubey J. P., Miller N. L. and Frenkel J. K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J Am Vet Med Assoc *157*, 1767-70.

Dubey J. P. and Shen S. K. (1991). Rat model of congenital toxoplasmosis. Infect Immun *59*, 3301-3302.

Edelhofer R. (1994). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria-an evaluation of data from 1982 and 1992. Parasitol Res *80*, 642-644.

Ehrlich, P. (1892). Über Immunität durch Vererbung und Säugung. Z Hyg Infektionskr, *12*, 183-203.

Eichenwald H. (1948). Experimental toxoplasmosis. Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. Am J Dis Child *76*, 307-315.

Enders G. (1991). Toxoplasmose in der Schwangerschaft. In: P. M. Shah, W. Stille. Infektionen durch *Toxoplasma gondii*. Socio-medico Verlag, Gräfelfing

Ferguson D. J. and Hutchison W. M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res *73*, 483-491.

Fichera M. E. and Roos D. S. (1997). A plastid organella as a drug target in apicomplexan parasites. Nature *390*, 407-9.

Fishaut J. M., Murphy D.,Neifert M. et al. (1981). The brochomammary axis in the immune response to respiratory syncytial virus. J Pediatr *99*, 186-191.

Foulet A., Zenner L., Darcy F., Cesbron-Delauw M-F., Capron A. and Gosselin B. (1994). Pathology of *Toxoplasma gondii* infection in the nude rat. An experimental model of toxoplasmosis in the immunocompromised host? Pathol Res Pract *190*, 775-781.

Frenkel J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. BioScience *23,* 343-352.

Frenkel, J. K. (1990). Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc *196*, 233-240.

Frenkel J. K., Ruiz A., and Chinchilla M. (1975). Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. Am J Trop Med Hyg *24*, 439-443.

Gazzinelli R. T., Hakim F. T., Hieny S., Shearer G. M. and Sher A. (1991). Synergistic role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in IFN-γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol *146*, 286-292.

Gopalan C.and Belavady B. (1961). Nutrition and Lactation. Fed Proc *20* (Suppl 7), 177-184.

Guerina N. G., Hsu H. W., Meissner H. D. et al. (1994). Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. N Engl J Med *330*, 1858-1863.

Hamprecht K., Vochem M., Boniek M., Speer C. P. and Jahn G. (1998). Detection of cytomegalviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR. J Virol Meth *70*, 167-176.

Hellbrügge T., Spiegler W. und Grewing W. (1956). Klinische, morphologische und serologische Befunde bei der generalisierten Toxoplasmose der Ratte. Zent Bakt Infekt Hyg *165*, 496-506.

Holliman R. E., Johnson J. D., Savva D. (1990). Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction. Scand J Infect Dis *22*, 243-244.

Jacobs L. and Jones F. E. (1950). The parasitemia in experimental toxoplasmosis. J Infect Dis *87*, 78-89.

Jacobs L., Remington J. S. and Melton M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol *46*, 11-21.

James G. S., Sintchenko V. G., Dickeson D. J. and Gilbert G. L. (1996). Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensivity. J Clin Microbiol 34, 1572-1575.

Janeway C. A. and Travers P. (1997). Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

Janku J. (1923). Pathogenesa a pathologicaá anatomie tak nazavaného vrozeného kolobomu zluté skurny v oku normálne velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sitnici. Cas Lék Ces *62*, 1021- 1027.

Kempf M-C., Cesbron-Delauw M-F., Deslee D., Gross U., Herrmann T. and Sutton P. (1999). Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and Lew rats. Med Microbiol Immunol (Berl) *187*, 137-142.

Kimball A. C., Kean B. H. and Fuchs F. (1974). Toxoplasmosis: risk variations in New York City obstetric patients. Am J Obstet Gynecol *119*, 208-214.

Kohler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webster P., Wilson R. J., Palmer J. D. and Roos D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin an Apicomplexan parasites. Science *275*, 1485-9.

Langer H. (1963). Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii.* Obstet Gynecol *21*, 318-329.

Levine N. D. (1977). Taxonomy of *Toxoplasma*. J Protozool *24*, 36-41.

Lewis W. P. and Markell E. K. (1958). Acquisition of immunity to toxoplasmosis by the newborn rat. Exp Parasitol *7*, 463-467.

Liesenfeld O., Press C., Montoya J. G. et al. (1997). False-positive results in immunoglobulin M (IgM) Toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia toxo IgM test. J Clin Microbiol *35*, 174-178.

Lindsay D. S., Dubey J. P., Butler J. M. and Blagburn B. L. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet Parasitol *73*, 27-33

Löffler G. und Petrides P. E. (1998). Biochemie und Pathobiochemie 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York Seite 1057-1086

Luft B. J., Hafner M. D., Korzun A. H. et al. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the aquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med *329*, 995-1000.

Luft B. J. and Remington J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis *15*, 211-222.

Marth T. and Zeitz M. (1999). Mechanismen und Anwendung oraler Toleranz. Z Gastroenterol *37*, 33-52.

Mayes J. T., O´Conner B. J., Avery R., Castellani W. and Carey W. (1995). Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. Clin Infect Dis *21*, 511-515.

Mc Auley J., Boyer K. M., Patel D., et al. (1994). Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. Clin Infect Dis *18,* 38-72

Mele A., Paterson P. J., Prentice H. G., Leoni P. and Kibbler C. C. (2002). Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. Bone Marrow Transplant *29*, 691-698

Mine N. (1908). Observation on potozoan parasites in Japan. Gun-I-Dan Zasski 27 Suppl. 1.

Montoya J. G. (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis *185 (Suppl) 1,* 73-82.

Montoya J. G. and Remington J. S. (1995). Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. Clin Infect Dis *20,* 781-789.

Mordue D. G., Monroy F., Regina M., Dinarello C. A., and Sibley L. D. (2001). Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. J Immunol *167,* 4574-4584.

Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond H. W., Griedlin M. A. and Coffman R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol *136,* 2348-57

Mowat A. M. (1987). The regulation of immune responses to dietary protein antigens. Immunol Today *8,* 93-98.

Naot Y., Desmonts G. and Remington J. S. (1981). IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital Toxoplasma infection. J Pediatr *98,* 32-36.

Newell M.-L., Gray G. and Bryson Y. J. (1997). Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection. AIDS *11* (Suppl A), 165-172.

Nguyen T. D., De Kesel M., Bigaignon G., Hoet P., Pazzaglia G., Lammens M., Delmee M. (1996). Detection of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in Blood, Urine and Brain of Infected Mice. Clin Diagn Lab Immunol *3,* 635-639.

Nichols B. A. and Chiappino M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii.* J Protozool *34,* 217-226.

Nichols B. A., Chiappino M. L. and O′ Connor G. R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasions. J Ultrastruct Res *83,* 85-98.

Nicolle C. and Manceaux L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C R Hebd Séances Acad Sci *148*, 763-766.

Nicolle C. and Manceaux L. (1909). Sur un protozaire nouveau de Gondi, Toxoplasma. Arch Inst Pasteur (Tunis) *2*, 97-103.

Ockert G. (1991). Epidemiologie der Toxoplasmose. In P. M. Shah, W. Stille. Infektionen durch *Toxoplasma gondii*. Socio-medico Verlag, Gräfelfing

Ogra S. S. and Ogra P. L. (1978). Immunologic aspects of human colostrum and milk. I. Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after the onset of lactation. J Pediatr *92*, 546-549.

Omata Y., Taka A., Terada K., Koyama T., Kanda M., Saito A. and Dubey J. P. (1997). Isolation of coccidian enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* from the intestinal mucosa of cats by Percoll-density gradient centrifugation. Parasitol Res *83*, 574-577.

Opal S. M. and De Paulo V. A. (1999). Anti-inflammatory cytokines. Chest 2000 *117(4)*,1162-1172

Orskov F. and Sorenson K. B. (1975). Escherichia coli serogroupsin breast-fed and bottle-fed infants. Microbiol *83*, 25-30.

Pettersen E. K. (1984). Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (B) *92*, 175-176.

Pfefferkorn E. R. (1984). Interferon-γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. Proc Natl Acad Sci USA *81*, 908-912.

Pinkerton H. and Weinman D. (1940). *Toxoplasma* infection in man. Arch Pathol *30*, 374-392.

Pittard W. B., Polmar S. H. and Fanaroff A. A. (1977). The breast milk macrophage: potential vehicle for immunoglobulin transport. J Reticuloendothel Soc *22*, 597-603.

Powell C. C., Brewer M. and Lappin M. R. (2001). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. Vet Parasitol *102*, 29-33.

Radke J. R. and M. W. White. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the *Herpes simplex* virus thymidine kinase. Mol Biochem Parasitol *94*, 237-247.

Rammensee H. G. (1995). Chemistry of Peptides associated with MHC class I and class II molecules. Curr Opin Immunol *7*, 85-96.

Rassin D. K. (Ph.D.), Garofalo R. P. and Ogra P. L. (2001). Human Milk. In Infectious diseases of the fetus and newborn infant.; Remington J. S. and Klein J. O. 5. Auflage, W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 169-203.

Remington J. S., Mcleod R., Thulliez P. and Desmonts G. (2001). Toxoplasmosis. In Infectious diseases of the fetus and newborn infant.; Remington J. S. and Klein J. O. 5. Auflage, W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 205-346.

Remington J. S. and Melton M. L. (1961). Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. J Infect Dis *108*, 163-173.

Riemann H. P., Meyer M. E., Theis J. H., Kelso G. and Behymer D. E. (1975). Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. J Pediatr *87*, 573-576.

Rodgers C. T. (1995). Practical aspects of milk collection in the rat. Laboratory Animals *29,* 450-455

Roghmann M. C., Faulkner C. T., Lefkowitz A., Patton S., Zimmerman J. and Morris J. G. Jr. (1999). Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. Am J Trop Med Hyg *60*, 790-792.

Rojas R. and Apodaca G. (2002). Immunglobulin transport across polarized epithelial cells. Nature Reviews *3*, 1-12.

Ruchman I and Fowler J. C. (1951). Localization and persistence of *Toxoplasma* in tissues of experimentally infected white rats. Proc Soc Exp Biol Med *76*, 793-796.

Ruchman I and Johansmann R. J. (1948). Biological properties of a strain of *Toxoplasma* recovered from a fatal case of congenital toxoplasmosis. Am J Trop Med Hyg *28,* 687-695.

Ruiz A. and Frenkel J. K. (1981). Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg *29*, 1161-1166.

Ryning F. and Remington J. S. (1978). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. Infect Immun *20*, 739-743.

Sabin A. B. and Feldman H. A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite. Science *108*, 660-663.

Sacks J. J., Roberto R. R. and Brooks N. F. (1982). Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. Jama *248,* 1728-1732.

Santoro F., Auriault C., Leite P., Darcy F. and Capron, A. (1987). Infection of the athymic rat by *Toxoplasma gondii*. C R Acad Sci III *304*, 297-300.

Savva D., Morris J. C., Johnson J. D. and Holliman R. E. (1990). Polymerase Chain Reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. J Med Microbiol *32*, 25-31.

Schlüter D., Hein A., Dorries R. and Deckert-Schlüter M. (1995). Different subsets of T cells in conjunction with Natural Killer Cells, Macrophages andactivated microglia participate in the intracerebral immune response to *Toxoplasma gondii* in athymic nude and immunocompetent rats. Am J Pathol *146*, 999-1007

Sepúlveda Arias J.C. (2003).The rat model of toxoplasmosis: Study of humoral and cellular immune responses and their role in the control of the infection. PhD. Thesis, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg.

Sharma S. P. and Dubey J. P. (1981). Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and trypsin solutions. Am J Vet Res *42*, 128-130.

Sheffield H. G. and Melton M. L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii.* J Parasitol *54*, 209-26.

Sibley L. D. and Boothroyd J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature *359*, 82-85.

Siegal S. E., Lunde M. N. and Gelderman, A. H. (1971). Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. Blood *37,* 388-394.

Simister N. E. and Mostov K. E. (1989). An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. Nature *337*, 184-187.

Slavin M. A., Meyers J. D., Remington J. S. and Hackman R. C. (1994). *Toxoplasma gondii* infection in marrow transplant recipients: a 20 year experience. Bone Marrow Transplant *13*, 549-557.

Smith C. W. and Goldman A. S. (1968).The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions. Pediatr Res *2*, 103-109.

Smith J. E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii.* Int J Parasitol *25*, 1301-1309.

Splendore A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d´una malattica che ricorda il moltipunti in Kalazar dell´vomo. Rev Soc Sci Sao Paulo *3,* 109-112.

Stepick-Bieck P., Thulliez P., Araujo F. G., Remington J. S. (1990). IgA-Antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J Infect Dis *162,* 270-3.

Sumuyen M. H., Garin Y. J. and Derouin F. (1995). Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. J Parasitol *81*, 327-329.

Suzuki Y. and Kobayashi A. (1990). Induction of tolerance to *Toxoplasma gondii* in newborn mice by maternal antibody. Parasitol Res *76*, 424-427.

Tenter A. M., Heckeroth A. R. and Weiss L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. J Parasitol *30*, 1217-1258.

Teusch S. M., Juranek D. D., Sulzer A., et al. (1979). Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. N Engl J Med *300*, 695-699

Thulliez P., Remington J. S., Santoro F., Ovlaque G., Sharma S. and Desmonts G. (1986). A new agglutination test for the diagnosis of acute and chronic Toxoplasma infection. Pathol Biol *34*, 173-7.

Tomley F. M. and Soldati D. S. (2001): Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. Trends Parasitol *17*, 81-88.

Van de Perre P. (2003). Transfer of antibody via mother's milk. Science *21*, 3374-3376.

Van de Perre P., Simonon A., Msellati P., et al. (1991). Postnatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 from mother infant: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda. N Engl J Med *325*, 593-598.

Van de Zypen E. and G. Piekarski. (1967). Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. A morphological analysis. Z Parasitenkd *29,* 15-35.

Von Harnack und Koletzko (1997). Kinderheilkunde Springerverlag *10*, 108.

Weiler I. J., Hickler W. and Sprenger R. (1983). Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. Am J Reprod Immunol *4*, 95-98.

Wirt D. P., Adkins L. T., Palkowetz K. H., et al. (1992). Activated-memory T-lymphozytes in human milk. Cytometry *13*, 282-290.

Wolf A. and Cowen D. (1937). Granulomatous enzephalomyelitis due to an encephalitozooan (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. Bull Neurol Inst N Y *6*, 306-371.

Wong S. Y. and Remington J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS *7*, 299-316.

Yagil R., Etzion Z. and Berlyne G. M. (1976). Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature. Lab Anim Sci *26,* 33-37.

Yap G. S. and Sher A. (1999). Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. Immunobiol *201*, 240-247.

Yoshida M., Claypool S. M., Wagner J. S., Mizoguchi E., Mizoguchi A., Roopenian D. C., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2004). Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells. Immunity *20*, 769-783.

Zenner L., Darcy F., Capron A. and Cesbron-Delauw M. F. (1998). *Toxoplasma gondii*: Kinetics of the Dissemination in the Host Tissues during the Acute Phase of Infection of Mice and Rats. Experimental Parasitol *90*, 86-94.

Zenner L., Darcy F., Cesbron-Delauw M. F. and Capron A. (1993). Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chroic infection. Infect Immun *61*, 360-363.

Zenner L., Estaquier J., Darcy F., Maes P., Capron A. and Cesbron-Delauw M. F. (1999). Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted secreted antigens as vaccine commponents. Parasite Immunol *21*, 261-272.

Ziegler J. B., Cooper D. A., Johnson R. O., et al. (1985). Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. Lancet *1*, 896-898.

Zhou L., Yoshimura Y., Huang Y. Y., Suzuki M., Yokoyama M., Okabe M. and Shimamura M. (2000). Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. Immunology *101*, 570-581.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrom
ANA	antinukleäre Antikörper
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster od Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritic Cells
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
h	Stunde
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
i.m.	intramuskulär
inkl.	inklusive
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
l	Liter
LK	Lymphknoten
µ	mikro
m	milli
M	Molar
MHC	Major histocompatibility complex

min	Minute
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
p.i.	post infectionem
p.p.	post partum
RF	Rheumafaktor
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
PCR	Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SC	Secretory Component
sog.	sogenannt(e)
s.u.	siehe unten
TH	T-Helfer Zelle
U	Units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Herrmann für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Unterstützung bei meiner Doktorarbeit. Er war stets ein geduldiger Lehrer, der immer ein offenes Ohr für anstehende Probleme hatte und zu dem ich mit allen Fragen zu jeder Zeit kommen konnte.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team der Arbeitskreise Herrmann und Hünig für die hervorragende Zusammenarbeit, Hilfe und nette Atmosphäre danken.

Danken möchte ich insbesondere auch Stefan Wiehr für seine kompetente und geduldige Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen, sowie Hilfe bei computertechnischen Problemen.

Lebenslauf

Judith, Nußbaumer
Ludwig-Erhard-Str. 96
65199 Wiesbaden
Tel.: 0611/ 3605127
J.Nussbaumer@gmx.de

Persönliche Daten:

Geburtsdatum:	01.12.1978
Geburtsort:	Mutlangen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

09/1985-07/1989	Eichenfeldgrundschule Neunheim
09/1989-06/1998	Hariolf – Gymnasium Ellwangen Allgemeine Hochschulreife

Studium:

04/1999-03/2006 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Humanmedizin

Prüfungen:

Physikum:	April 2001
1. Staatsexamen:	März 2002
2. Staatsexamen:	September 2004
3. Staatsexamen:	Mai 2006

10/2004-09/2005 **Praktisches Jahr**:

1. Tertial: Innere Medizin	Medizinische Universitätsklinik Würzburg
2. Tertial: Neurologie	Universitätsklinik Inselspital Bern, Schweiz
3. Tertial: Chirurgie	Chirurgische Universitätsklinik Würzburg / St. Clare´s Mercy Hospital, Health Sciences Centre St. John´s, Canada / Neufundland

Berufstätigkeit

seit 15.07.06 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin I
Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken GmbH
CA Prof. Dr. med. M. Sigmund

Wiesbaden, 09.12.2006