

6.1 "Natürliche Infektion durch den Stichkanal": Ein Modell

Die intakte Haut gilt generell als nicht passierbar für die Flagellaten und somit als sicherer Schutz. Ein bekannter Infektionsweg über die Haut besteht aber darin, daß Trypanosomen durch zufällig bereits bestehende kleine Schürfwunden, Schnitte oder Risse eindringen können. Es gibt – wenn Trypanosomen nach Ausscheidung durch den Vektor mit der Haut in Berührung kommen – zumindest immer eine kleine Läsion in der Nähe: Den Stichkanal der Wanze, eine minimale Verletzung der Dermis, die durch die Mundwerkzeuge des Insektes entstanden ist. Es ist relativ unwahrscheinlich, daß die Wanze ihren Kottropfen direkt auf diesen Punkt setzt, so daß die Flagellaten aus dem Tropfen heraus und in diese "vorbereitete" Mikroläsion einwandern bzw. mit Wanzenfäzes als Medium einschwimmen. Wahrscheinlicher ist, daß die Wanze den Kottropfen während ihres Rückzuges über die Stichöffnung zieht. Die Parasiten haben aber noch eine weitere Möglichkeit, in den Stichkanal zu gelangen: Auf einige Inhaltsstoffe des Wanzenspeichels und auf das Histamin im Kot reagieren die meisten Menschen innerhalb weniger Minuten mit einer allergischen Reaktion (Harrington 1958, Costa et al. 1981). Juckreiz entsteht und die betreffende Person beginnt unwillkürlich, sich zu kratzen. Dabei ist es nun schon sehr wahrscheinlich, daß infizierter Wanzenkot in den Stichkanal eingerieben wird. Bei den Versuchen mit Mäusen war zu beobachten, daß sich dieser Stichkanal nicht sehr schnell verschloß: Auch Mäuse, die zunächst vom Tisch in eine Feuchtekommer umgelagert wurden und deren Stichkanäle erst nach etwa fünf Minuten mit einer Flagellatensuspension betropft wurden, bekamen im Rahmen der jeweiligen Versuche normale Parasitämien. Da bei Mäusen – im Gegensatz zum Menschen – in der Haut eine stabile Lage von Keratinozyten über den elastischen Schichten fehlt, bleibt der Stichkanal in der humanen Haut vermutlich noch länger offen (vergl. Kap. 5.3.2 und Bucher & Wartenberg 1989c). Eine oberflächliche Verletzung der Haut durch Aufkratzen ist demnach nicht erforderlich, um eine Eintrittspforte zu schaffen.

Die Flagellaten gelangen – mit dem Wanzenkot als Vehikel – bei diesem Vorgang vermutlich nicht gleich bis in das subkutane Gewebe. Bei der ermittelten Eindringtiefe der Wanzenmaxillen (ca. 3 mm) scheint es allerdings möglich, da die Insekten bei dem Anstich menschlicher Haut nicht nur bis zu den dermalen Kapillar-Loops, sondern durchaus bis in tiefere

Gewebsschichten gelangen können. Diese Art der Infektion spielt beim (unbehaarten) Menschen sicherlich eine wesentlich bedeutendere Rolle als in der Tierwelt.

In dem Modell für eine "natürliche Infektion über den Stichkanal" wurde versucht, die Übertragung der Trypanosomen durch den Stichkanal der Wanze in die Haut des Säugetierwirtes zu imitieren. Der grundsätzliche Aufbau war folgender: Ein Säugetierwirt – die Maus – wurde von Wanzen in einem definierten Hautareal angestochen und dann ein Tropfen Wanzenfäzes mit einer möglichst den natürlichen Verhältnissen entsprechenden Anzahl von *T. cruzi* auf diesen Stichkanal getropft, aber kaum eingerieben. Mit Hilfe von Modifikationen dieser Auftropfversuche und dem Vergleich mit Injektionsversuchen wurde dann untersucht, welche bereits im natürlichen System vorhandenen Faktoren das Infektionsgeschehen beeinflussen. In den notwendigen Injektionsversuchen wurde eine intradermale Injektionstechnik angewendet, um sich den natürlichen Verhältnissen auch bei Infektion mit einer Kanüle möglichst anzunähern.

Bei ähnlichen Auftropfversuchen verwendeten Soares & Marsden (1986) ebenfalls ein natürliches Parasit-Vektor-System, den Trypanosomenstamm Iulu gehalten in *Dipetalogaster maximus*. Man ließ Mäuse im Bereich der Schwanzwurzel von Wanzen anstechen, markierte die Stichstelle mit Tinte und betropfte sie mit 50 µl infiziertem Wanzenkot. Der Tropfen wurde bei 54%iger Luftfeuchte 45 min dort belassen und dann mit Alkohol abgespült, um eine orale Infektion der Mäuse zu verhindern. Der Versuch resultierte in einer Infektionsrate von 23%. Diese Infektionsrate wurde als zu niedrig angesehen, um dem Übertragungsweg über den Stichkanal Bedeutung beizumessen. Da die Experimentatoren zudem davon ausgingen, daß die Wanze in der Natur mit ihrem Kottropfen so gut wie nie genau die Einstichstelle trifft, wurde diese Infektionsmöglichkeit als vernachlässigbar beurteilt.

Nach dem von anderen Autoren beschriebenen Defäkationsmuster bestimmter Wanzen ist es jedoch gar nicht unwahrscheinlich, daß die Wanze ihren Kottropfen noch während oder kurz nach der Nahrungsaufnahme in der Nähe des Stichkanales absetzt (s. Kap. 2.3.3.5) und dieser dann eingerieben wird (Harington 1958, Costa et al. 1981). Des weiteren lag die Infektionsrate (=Morbidity) bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit jedoch immerhin zwischen 60 und 100%. Betrachtet man nun die Stichhäufigkeit, der die gefährdeten Personengruppen in Endemiegebieten ausgesetzt sind, muß nicht jeder Stich eine Infektion nach sich ziehen, um die gegebene Infektionsrate von über 60% bei allen Personen unter 18 Jahren in bestimmten

Gebieten hervorzurufen (Rabinovich et al. 1990). Zudem könnte im Versuch von Soares & Marsden die Morbiditätsrate experimentell reduziert worden sein, weil die Mäuse nach einer bestimmten Zeitspanne mit Alkohol abgewaschen wurden: Durch fettlösende Eigenschaften und Kapillarkräfte könnte dieses Desinfektionsmittel auch in die Stichkanäle gelangt sein und dabei die dort befindlichen Flagellaten zumindest zum Teil abgetötet haben.

6.2 Die Maus: Ein geeignetes Tiermodell?

Im vorliegenden Modell wurde mit Mäusen gearbeitet, weil sie preisgünstig, platzsparend zu halten und leicht zu handhaben sind. Darüber hinaus ist diese Tierart in der Literatur das am häufigsten beschriebene Versuchstier für experimentelle *Trypanosoma cruzi*-Infektionen. Für neue Experimente bestand daher die Möglichkeit, auf eine breite Palette bereits gewonnener Erkenntnisse zurückzugreifen und darauf aufzubauen.

Geeignete Mäuse für das gewünschte Modell zu finden, wurde – wie im WHO-Report von 1984 bereits erwähnt – durch die Vielzahl der angebotenen Laborstämme erleichtert. Für die vorliegenden Versuche konnten ein mäßig suszeptibler, immunkompetenter Stamm und ein immundefizienter Stamm passend ausgewählt werden: Bei der Arbeit mit dem Trypanosomenstamm Chile 5 nahmen C57 Bl/6 Mäuse eine mittlere Position ein zwischen den für diesen Trypanosomenstamm resistenteren Balb/c und dem sehr suszeptiblen 129 SV-Stamm (Hölscher, pers. Mitteilung). Auch Hoft et al. (1993) machten die Beobachtung, daß bei der Arbeit mit dem Tulahuén-Stamm C57 Bl/6 Mäuse suszeptibler reagierten als Balb/c Mäuse. In der Literatur sind Bl/6 Mäuse sonst häufig als relativ resistent beschrieben worden, dies galt jedoch meist in Bezug auf andere Trypanosomen-Stämme (Brennessel et al. 1985, Murfin et al. 1989, Russo et al. 1989).

Dennoch ist die Maus nicht das optimale Tier für ein Modell der "natürlichen Übertragung über die Haut", beim Menschen: Zum einen ist die Haut einer Maus sehr viel dünner (0,4-0,6 mm im Rückenbereich der Maus; s. Kap. 5.3.2) als im gleichen Hautareal des Menschen (ca. 5 mm; Bucher & Wartenberg 1989a). Zudem ist sie anders strukturiert: Mäuse besitzen keine Keratinschicht. Es ist also möglich, daß die Flagellaten bei den beiden Spezies unterschiedlich tief eindringen und demzufolge auch eine unterschiedliche Entwicklung innerhalb der ersten Stunden der Infektion durchmachen. Bei der Maus könnten sie z.B. sehr

viel schneller die Dermis passiert haben und in die subkutan beginnenden Lymphbahnen gelangen, während sie sich beim Menschen vielleicht länger intradermal aufhalten.

Zum anderen fehlen bei der Maus die Allergiereaktionen, die beim Menschen durch Wanzenkot und -speichel hervorgerufen werden. Die Maus ist kein "Histamintier"; sie zu sensibilisieren ist nicht leicht. Wiederholte Injektionen von Wanzenkot oder wiederholte Wanzenstiche haben bei dieser Spezies keine Abwehrreaktion zur Folge (Volf et al. 1993). Um eine kutane Abwehrreaktion auf Wanzenkot oder -speichel zu provozieren, wäre eventuell eine Sensibilisierung mit Hilfe eines Adjuvans erfolgreich gewesen. Oder man hätte eine zelluläre Reaktion, die der gewünschten Typ IV-Allergie ähnelt, auch noch auf andere Weise induzieren können: Mit der Injektion von Talkum oder Paraffin hätte ein Granulom erzeugt werden können in genau dem Hautareal, in das später die Trypanosomen inokuliert wurden. Ein solch artifizielles Vorgehen hätte das Modell jedoch weit von den natürlichen Verhältnissen entfernt.

Die kleine Hautverdickung bei nur einer Maus (Abb. 12) kann in keinem Fall durch eine Allergie auf Wanzenspeichel verursacht gewesen sein, da die stechende Wanze salivarektomiert war. Beim Menschen findet dagegen nach wenigen Kontakten mit Wanzenfäzes oder -speichel fast immer eine heftige Sensibilisierung statt. Es folgen sowohl Allergiereaktionen vom Soforttyp, die starken Juckreiz auslösen, wie auch Allergie Typ IV- Reaktionen, die über mehrere Tage bestehen bleiben (Lumbreras et al. 1959, Costa et al. 1981). Das hat zur Folge, daß beim Menschen in der Frühphase der Infektion die verschiedensten Immunzellen in großer Zahl am Infektionsort sind und dort möglicherweise deren Beginn beeinflussen: Ein nicht zu unterschätzender Faktor, der bei der Maus völlig fehlt.

Eine mögliche Lösung diese Problems wäre die Arbeit mit Meerschweinchen, deren Hautaufbau und Hautreaktionen denen des Menschen sehr ähnlich sind (Bacherach-Buhles, pers. Mitteilung). Die Haltung einer größeren Anzahl dieser Tiere war jedoch nicht möglich.

6.2.1 Klinik

Die in den Ergebnissen beschriebenen Krankheitssymptome der Mäuse waren bis auf die Lähmungserscheinungen unspezifisch. Zu einem frühen Zeitpunkt auftretende "Infektionsanämien" – wie z.B. bei einer Maus aus Gruppe 12.4. (Abb. 40) – sind bereits im Zusammenhang mit der Chagas-Krankheit beschrieben worden. Es wurden aber ebenfalls durch die Trypanosomen bedingte, hämolytische Effekte vermutet (Seah et al. 1974). Die etwas später

einsetzende Kachexie und Dehydratation war auf eine krankheitsbedingte Überlastung des gesamten Organismus zurückzuführen (Marsden & Hagstrom 1968, Teixeira et al. 1983, Russo et al. 1989).

Im Verlauf der Erkrankung kam es offenbar zu leichten Störungen in der Blutgerinnung und damit zu längerem Nachbluten an der Stelle der Blutentnahme. Dies könnte zu Superinfektionen geführt haben bei Tieren, die an verschmiertem Blut leckten. Die Gefahr einer oralen Superinfektion bestand auch, wenn Einzeltiere besonders früh verstarben und über Nacht von ihren Artgenossen verzehrt wurden. Da die Auswirkung solcher Reinfektionen nicht verfolgt werden konnte, wurden sie nicht berücksichtigt. Für die deutlich verlängerte Präpatenzzeit eines einzelnen Tieres (ca. eine Woche) im Vergleich zu den anderen derselben Gruppe wäre diese Art der Superinfektion allerdings eine mögliche Erklärung: Ohne einen weiteren Infektionsschub wäre das betreffende Tier vielleicht latent erkrankt geblieben (z.B. eine Maus in Gruppe 12.4., Abb. 40). Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Variabilität in den Krankheitsverläufen auf die normale biologische Varianz der Immunreaktionen einzelner Tiere zurückzuführen war. Diese Varianz war vermutlich auch der Grund für die verschiedenen Parasitämieverläufe der Gruppen 14.2. und 18.4. (Abb. 48 und 14), in denen sich jeweils zwei Untergruppen gebildet hatten, deren Parasitämien sehr ähnlich, aber zeitlich versetzt verliefen.

Ein unregelmäßige Auftreten von Lähmungen bei gleichen Versuchsbedingungen wurde schon von Goble (1952) beschrieben. Ob die Lähmungen allerdings muskulär oder nervös begründet waren, würde weitere Untersuchungen erfordern: Bei Mäusen, die für myotrope *T. cruzi*-Stämme suszeptibel sind, kommt es einerseits zum Befall der quergestreiften Muskulatur und damit einhergehend zu Gewebsnekrosen, andererseits zu einem starken Abfall der Acetylcholin-Esterase und dadurch zu einer neuronal bedingten Paralyse (Brennessel et al. 1985). Vermutlich werden bei der Zerstörung von Wirtszellen der Trypanosomen Antigene frei, die an Neurone anheften und diese somit angreifbar für Antikörper machen. Die Zerstörung der Nervenzellen wäre demnach eine Folge autoimmuner Reaktionen (Ribeiro dos Santos & Hudson 1981). Neben dem direkten Befall der Muskulatur kommt es in vielen Fällen zu einer starken Degeneration der lumbalen Ganglien (Köberle 1968). Ein Befall der glatten Muskulatur – wie von Melo & Brener (1978) beschrieben – könnte weiterhin die Lähmungen der Sphinkteren bei einigen Mäusen erklären.

Spezielle pathologische Symptome für die chronische Chagas-Krankheit – Megaorgane oder kardiologische Veränderungen – hätten nur bei den wenigen Tieren mit längerer Überlebensdauer auftreten können, waren jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu erfassen.

6.2.2 Sekundärinfektionen

Die bei den Nacktmäusen so häufig aufgetretenen Koinfektionen, die bei den Tieren Darmvorfälle und Abszesse auslösten, hatten keinen sichtbaren Einfluß auf die Infektionsverläufe der betroffenen Tiere. Bei einzelnen Gruppen kann vielleicht der Eindruck entstehen, daß die Zweiterkrankung eine etwas kürzere Präpatenz, ein höheres Maximum oder den früheren Tod des jeweiligen Tieres zur Folge hatte. Da aber ebenso verzögerte Parasitämien etc. vorkamen, können diese Abweichungen nicht sinnvoll interpretiert werden. Edgcomb (1973) machte bei der Untersuchung von wild gefangenen infizierten Ratten entsprechende Beobachtungen: Seine Tiere wiesen die verschiedensten Zweiterkrankungen auf (Bronchioektasie, Nephritiden, Befall mit Darmparasiten), die aber alle von der Trypanosomen-Infektion unabhängig verliefen.

Im Gegensatz dazu standen die massiven Begleitsymptome der Tiere, die subkutan mit *T. cruzi* in 0,1 ml Wanzenfäzes infiziert worden waren (Abb. 56). Die Abwehrreaktion auf den Wanzenkot war im Vergleich zu den hier besprochenen Koinfektionen viel großflächiger und heftiger und beeinflusste deswegen den gesamten Organismus und den Verlauf der Trypanosomen-Infektion.

6.2.3 Geschlecht und Alter des Säugetierwirtes

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß männliche Tiere empfänglicher für eine *T. cruzi*-Infektion sind als weibliche (Hauschka 1947, Goble 1952, Bice & Zeledon 1970). Diese These würde bestätigt im Vergleich 5.1.4. C (Abb. 9 und 10), dort waren die Präpatenzzeiten der Männchen deutlich kürzer. Die Präpatenzen und Kurven der Mäuse aus Abb. 10 entsprachen sogar denen einer weiblichen Gruppe, die mit einer um eine Zehnerpotenz höheren Dosis infiziert worden waren (vergl. Abb. 42); dies würde tatsächlich auf eine deutlich höhere Empfänglichkeit der männlichen Gruppen hindeuten. Im Vergleich 5.1.4. E (Abb. 14-16) ist in geringerer Ausprägung der gleiche Effekt zu finden. Derartige Unterschie-

de waren in anderen Versuchen jedoch überhaupt nicht festzustellen, Präpatenzen oder Kurvenverläufen glichen sich nach gleichem Versuchsansatz bei beiden Geschlechtern sehr (Vergleiche 5.1.4. A, B und D, Abb. 5-8 und 11-13). Aus der vorliegenden Untersuchung kann also nicht klar darauf geschlossen werden, daß Geschlechtshormone die Infektion mit *T. cruzi* beeinflussen. Die offensichtlich höhere Resistenz stärkerer bzw. dominanterer Männchen im Vergleich mit schwächeren männlichen Tieren desselben Käfigs könnte auch darauf beruhen, daß untergeordnete Tiere stärker gestreßt waren, und es bei ihnen deshalb schneller zu einem Krankheitsausbruch kommen konnte.

Der Einfluß der Geschlechtshormone in der Trächtigkeit müßte dagegen weiter untersucht werden. Meine Beobachtungen deuten darauf hin, daß Gestagene möglicherweise gut vor dem Ausbruch einer latenten Infektion schützen.

Um die in der Literatur erwähnte altersbedingte Beeinflussung der Infektionsverläufe zu umgehen, wurde nur mit "immunologisch erwachsenen" Mäusen ab einem Alter von acht Wochen gearbeitet. Die drei Mäuse aus Gruppe 7.1. (Abb. 5), die mehr als doppelt so alt waren wie alle anderen, hatten keine wesentlich anderen Parasitämien. Ihr Immunsystem war also nicht weiter gereift als das der jüngeren Tiere. Nach Culbertson & Kessler (1942) nimmt die Suszeptibilität bei Jungmäusen während der Entwicklung mehr und mehr ab und bleibt ab einem Alter von zwanzig Tagen stabil.

6.2.4 Beurteilung der Parasitämiebestimmungs- und -nachweismethoden

Die verwendeten Zählmethoden für die Bestimmung der Parasitämien wurden ausgewählt, weil sie gut zu handhaben und auch mit sehr kleinen Blutmengen durchzuführen waren. Für die Methode der Blutanreicherung in Hämatokritröhrchen, die schon bei geringeren Flagellatenkonzentrationen sensitiv ist, stünde bei Mäusen nicht genug Blutvolumen zur Verfügung. Die Methode der standardisierten Zählkammer-Bestimmung war bei niedrigen Flagellatenkonzentrationen zu unsensibel, daher deckten die gewonnenen Daten nicht den gesamten Kurvenverlauf ab. Die Daten der Objektträger-Zählung, die in der gesamten Zeitspanne der Versuche durchgeführt werden konnte, mußten also umgerechnet werden. Die sonst so häufig angewendete Methode von Brener (1962) erschien dafür kaum geeignet: Auch eine definierte

Menge Blut verteilte sich unter dem Deckglas niemals ganz gleichmäßig. An den Rändern und in dem Bereich, in dem der Tropfen aufgesetzt wird, entstand immer eine dickere Schicht als in den anderen Arealen. Man konnte also nicht ohne weiteres - ausgehend von dem Volumen des eingesetzten Tropfens und der Menge an Gesichtsfeldern des gesamten Deckglases - die Anzahl der Flagellaten in den ausgezählten Gesichtsfeldern in eine Anzahl pro Volumen umrechnen. Eine weitere Einschränkung dieser Methode ergab sich dadurch, daß es oft keine Möglichkeit zur Abnahme einer standardisierten Blutmenge gab. Das Blut der Mäuse dickte mit Fortschreiten der Erkrankung stark ein und war immer schwerer zu gewinnen. Bei den Nacktmäusen mußte das Blut im fortgeschrittenen Krankheitsstadium geradezu aus dem Schwanz ermolken werden und der erste gewonnene Tropfen war manchmal schon geronnen, bevor der Mäusesschwanz wieder durchblutet war. Da auch in jedem gewonnenen Blutstropfen einer gesunden Maus sofort die Gerinnung einsetzte, konnte es im gesamten Versuchsverlauf nach geringsten Verzögerungen des Arbeitsablaufes beim Verdünnen der Proben zu Fehlern beim Resuspendieren der Flüssigkeit kommen. Mit der in Kap. 4.14 und 4.16 dargestellten Bestimmungsmethode wurde versucht, die Versuchsergebnisse so standardisiert und vergleichbar wie möglich darzustellen.

Für die Überprüfung resistenter Tiere zeigte sich, daß der Nachweis inapparenter Infektionen mit Cyclophosphamid abzulehnen ist: Der Wirkstoff ist an sich sehr toxisch und die behandelten Mäuse unterlagen einer starken Belastung; die Tiere magerten stark ab und fühlten sich sichtlich unwohl. Aus diesen Gründen wurde ein solcher Test im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nur ein einziges Mal durchgeführt und der Xenodiagnose der Vorzug gegeben. Bei sehr geringgradiger Infektion mit Trypanosomen bestand zudem die Gefahr, daß die immunsupprimierten Tiere noch vor dem Aufblühen einer starken Parasitämie an Sekundärinfektionen starben (Calabrese et al. 1991). In der Xenodiagnose wurde *Rhodnius prolixus* verwendet, weil zu diesem Zeitpunkt keine anderen Wanzen in ausreichender Menge verfügbar waren. Die erhaltenen Negativergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, daß diese Wanzenart nicht der passende Vektor für den eingesetzten *T. cruzi*-Stamm war. Dies ist aber unwahrscheinlich, da *T. cruzi* normalerweise so anpassungsfähig ist, daß im positiven Fall zumindest eine geringgradige Infektion zu erwarten gewesen wäre. Marsden et al. (1976) berichteten über unterschiedliche Suszeptibilität von *Rhodnius prolixus* und *Triatoma infestans* in der Xenodiagnose, in ihren Versuchen waren aber bei beiden Wanzenarten Infektionen festzustellen.

Das positive Ergebnis zweier Mäuse im "Mouse-protection-test" ließ darauf schließen, daß bei ihrer ersten Infektion im Versuch ein technischer Fehler unterlaufen war oder sie eine ungewöhnliche Immunität besaßen. Beide Tiere wurden bei der Auswertung der Versuche nicht berücksichtigt.

6.3 Einflüsse des Erregers auf die Infektion

6.3.1 Generelle Entwicklung des Erregers in Mäusen

Anhand der Parasitämieverläufe ließ sich die Entwicklung der Parasiten im Säugetierwirt nachvollziehen: Alle Mäuse hatten erst eine mehr oder weniger lange Präpatenzzeit, in der noch keine Parasitämie meßbar war. Danach stiegen die Kurven bei beiden Mausstämmen an, flachten jedoch nach wenigen Tagen zunächst wieder ab. Erst dann stiegen die Parasitämien gleichmäßig an. Bei den C57 Bl/6 Mäusen wiesen die Kurven deutlich erkennbare Wellen auf, ihre Steigung verringerte sich oft schon vor Erreichen des Maximums und bei einigen Mäusen waren die Parasitämien schließlich sogar rückläufig. Die Kurven der Nacktmäuse stiegen im Vergleich dazu immer früher und wesentlich steiler an und endeten bei Erreichen des Maximums mit dem Tod des Tieres.

Die Wellen bzw. Schübe in vielen der Verlaufskurven der C57 Bl/6 Mäuse sind zum Teil gemäß dem Entwicklungsschema von Cover et al. (1978) zu erklären. Sie traten immer dann auf, wenn viele Trypanosomen synchron ihre intrazelluläre Vermehrungsphase abgeschlossen haben und gleichzeitig freigesetzt wurden. Das erste Auffinden eines Flagellaten im Blut fiel aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem Beginn eines solchen Schubes zusammen, daher wurden immer zuerst schlanke Formen sichtbar. In der vorliegenden Untersuchung waren die Wellen in den Parasitämieverläufen aber nicht regelmäßig, und schon der zweite gefundene Flagellat war zumeist vom kurzen Typ. Beide Beobachtungen deuten darauf hin, daß sich die Entwicklungszyklen mit der Zeit mehr und mehr überlappen. Da für die Versuche meist kleine Infektionsdosen verwendet wurden, kam es zu langen Präpatenzzeiten, nach denen kein klares Schema mehr erkennbar war (Howells & Chiari 1975). Diese Erklärung reicht für die Kurvenverläufe jedoch nicht aus, denn dann hätten die Parasitämien der Nacktmäuse, die ja kürzere Präpatenzen hatten, ebenso deutlich erkennbare Wellen aufweisen müssen. Bei den C57 Bl/6 Mäusen setzte jedoch als "Störfaktor" für die Entwicklung der Flagellaten nach einiger Zeit eine Immunreaktion mit Antikörperbildung ein, die ihrerseits für Schwankungen

im Parasitämieverlauf sorgte. Die antikörpervermittelte Komplement-Lysis ist der bei weitem wirkungsvollste Mechanismus, um Flagellaten aus dem Blut zu eliminieren, bei einigen C57 Bl/6 Mäusen kam es daher sogar zu einem Rückgang der Parasitenzahlen wie z.B. in Abb. 78 (Trischmann et al. 1978, Miura & Takeuchi 1986).

Die höheren Maxima in den Kurvenverläufen der Balb/c nu/nu Mäuse sind darin begründet, daß es eine antikörpervermittelte Immunabwehr bei Nacktmäusen nicht gibt. Dennoch hatten die Parasitämien einiger Nacktmäuse eine relativ lange, flache Anfangsphase über weit mehr als vier Tage, also über die Zeitspanne eines Entwicklungszyklusses (z.B. eine Maus aus Abb. 9 mit einer Präpatenz von 23 Tagen), und die Morbidität lag auch in den Gruppen dieser Tiere nicht immer bei 100%. Auch bei diesen Mäusen scheinen also (unspezifische) Abwehrmechanismen zu wirken, die dann später von der heftigen Vermehrung der Flagellaten "überrollt" werden. Eine sehr geringe Infektionsdosis konnte durch diese Mechanismen in einigen Fällen offenbar gleich zu Beginn so erfolgreich bekämpft werden, daß die betroffenen Mäuse nicht erkrankten. Die wenigen Fälle, in denen bei Nacktmäusen nur für eine sehr kurze Zeit einige wenige Flagellaten nachzuweisen waren und dann keine mehr, sind jedoch nicht ohne weiteres zu erklären. Beispiel dafür ist eine Maus aus Gruppe 13.5. (Abb. 46) mit einer Präpatenz von 22 Tagen, die an Tag 23 und 24 je einen Flagellaten pro 100 Gesichtsfelder zeigte und dann für den verbleibenden Versuchszeitraum negativ blieb. Eine mögliche Erklärung wäre, daß diese Tiere von ihren in jedem Fall gemischtem Elternpaaren zwar die Erbanlagen für die Haarlosigkeit übernommen haben, die Depletion der Thymusanlage jedoch nicht vollständig war. Für den Beweis einer solchen These müßten im Serum der betroffenen Nacktmäuse Antikörper nachgewiesen werden.

6.3.2 Infektionsverläufe nach Infektion mit unterschiedlichen Trypanosoma cruzi-Stämmen

C57 Bl/6 Mäusen wurden für einen Vergleich der in unserem Institut vorhandenen *T. cruzi*-Stämme jeweils mit Flagellaten des Stammes Chile 5 und des Stammes Tulahuén intradermal bzw. subkutan infiziert. Die daraus resultierenden Infektionen verliefen sehr unterschiedlich (Vergleich 5.2.1., Abb. 17 und 18): Die Präpatenzzeiten der beiden Gruppen unterschieden sich um 12 Tage (22,5 Tage nach der Infektion mit Stamm Chile 5 gegen 9,8 Tage nach Infektion mit dem Tulahuén-Stamm). Diese Differenz ist erheblich verglichen mit der Variation der Präpatenzzeiten der übrigen Versuche, die alle nur unter Verwendung eines Stammes

durchgeführt wurden. Dieser Unterschied ist mit Sicherheit nicht auf die verschiedenen Injektionstechniken zurückzuführen (s. Kap. 6.5). Die Parasitämieverläufe der beiden mit Trypanosomen unterschiedlicher Stämme infizierten Gruppen entsprachen sich weitgehend; bei fast allen Tieren stiegen die Kurven auf Maxima von 5000-8000 Fl/ μ l und endeten dann mit dem Tod der Mäuse. Die Kurven der mit Stamm Tulahuén infizierten Mäuse verliefen zwar – die Überlebensdauer betreffend – wesentlich inhomogener als die der Vergleichsgruppe, dieser Unterschied ist aber nicht aussagekräftig: Mit einer hohen Dosis von Chile 5 infizierte Mäuse zeigten in Gruppe 4.1. (Abb. 31) ähnlich inhomogene Verläufe. Bei der intradermalen bzw. subkutanen Infektion verhält sich der Tulahuén-Stamm also bei C57 Bl/6 Mäusen aggressiver als der Stamm Chile 5. (Das Verhältnis scheint sich jedoch umzukehren, wenn man die Infektion in einem Auftropfversuch vornimmt: Im Modell der "natürlichen Infektion" sind die Präpatenzzeiten bei Tulahuén-Infektionen länger. Die Kurvenverläufe entsprechen sonst den oben beschriebenen Parasitämien (Schuster, pers. Mitteilung).)

Auch im klinischen Verlauf bei Infektionen mit den unterschiedlichen *T. cruzi*-Stämmen zeigen sich Unterschiede: Die Lähmungserscheinungen, die sich im späteren Verlauf der Chile-5-Infektion bei einigen C57 Bl/6 Mäusen einstellten, wurden bei Infektionen mit Tulahuén-Flagellaten nie beobachtet. Dies könnte damit erklärt werden, daß der Tulahuén-Stamm als retikulotrop gilt, bei Chile 5 jedoch ein myotroper Histotropismus angenommen wird. (Zur Ätiologie der Lähmungserscheinungen s. Kap. 6.2.1). Da auch die Nacktmäuse nie Lähmungserscheinungen hatten, könnte man nun folgern, daß Chile 5 schon bei verschiedenen Mausstämmen unterschiedliche Histotropismen ausprägt. Wahrscheinlicher aber ist, daß die Infektionsdauer bei den Nacktmäusen nicht ausreicht, um die entsprechenden klinischen Symptome zu entwickeln. Diese Aussage deckt sich mit den Beobachtungen von Russo et al. (1989).

Von den beiden genannten Flagellaten-Stämmen ist nur der Tulahuén-Stamm aus der Literatur bekannt. Mit Hilfe dieses "Referenzstammes" können die Charakteristika anderer unbekannter Stämme im Vergleich besser eingeordnet werden können. Aber auch bei Arbeiten mit diesem bestimmten *T. cruzi*-Stamm und ähnlichen Versuchsansätzen kam zu sehr unterschiedlichen Resultaten, wenn sie von unterschiedlichen Arbeitsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen wurden: Hoft et al. (1993) führten einen Infektionsversuch durch, der fast identische Voraussetzungen hatte wie der gerade besprochene Tulahuén-Versuch der vorliegenden Untersuchung: Flagellatenstamm und -stadien, Alter, Geschlecht und Stamm der Mäuse und sogar Infektionsroute und Dosis waren gleich. In diesem Versuch wurden weibli-

che, 6-8 Wochen alte C57 Bl/6 Mäuse subkutan mit 1×10^3 metazyklischen Tulahuén-Trypomastigoten aus der Wanze infiziert. Die Flagellaten waren allerdings nicht – wie in der vorliegenden Untersuchung – in *Triatoma infestans*, sondern in *Dipetalogaster maximus* passagiert worden. Die Ergebnisse unterschieden sich erheblich von denen aus der vorliegenden Untersuchung: Die Infektion der Mäuse in dem Versuch von Hoft et al. ergab eine Präpatenz von 10-12 Tagen. Die Parasitämien stiegen bis zum 21. Tag p. inf. auf Maxima um $1,8 \times 10^4$ Fl/ml und fielen dann bis zum Versuchsende an Tag 28 wieder auf Werte unter $1,5 \times 10^4$ Fl/ml ab. Die C57 Bl/6 Mäuse der vorliegenden Untersuchung (Abb. 18) hatten mit $9,8 \pm 1,1$ Tagen ähnliche Präpatenzzeiten, ihre Parasitämien stiegen jedoch bis zu weit höheren Maxima von $5-8 \times 10^6$ Fl/ml an und die meisten Tiere verstarben zwischen Tag 27 und 39 auf dem Parasitämiepeak. Nur ein Tier überlebte die Versuchsdauer von 40 Tagen mit einer wesentlich geringeren Flagellatenkonzentration im Blut.

Da der Verlauf von *Trypanosoma cruzi*-Infektionen von einer ganzen Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst wird, sind derartige Unterschiede bei "gleichen" Versuchen, die aber nicht im gleichen Institut und zur gleichen Zeit vorgenommen wurden, nicht allzu überraschend. Neben den augenfälligen Einflußfaktoren wie dem verwendeten Parasit-Vektor-Wirt-System, den Flagellatenstadien, Alter und Geschlecht der Mäuse, Infektionsroute und -dosis können sich viele Feinheiten auf die Versuchsergebnisse auswirken. Dazu gehören z.B. die Zusammensetzung des Flagellatenstammes aus verschiedenen Subklonen, Art und Dauer seiner letzten Passagierung, die genaue Zuchtlinie der Mäuse, ihr Immunstatus und ihre Haltungsbedingungen. Die Ergebnisse verschiedener Arbeiten über *Trypanosoma cruzi* sollten also nur mit großer Vorsicht generalisiert werden, und auch von "Referenzstämmen" kann im eigentlichen Sinn nicht die Rede sein. Im vorliegenden Modell wurde mit dem Stamm Chile 5 weitergearbeitet, da diese Trypanosomen zusammen mit den *Triatoma infestans* unserer Zucht einem natürlichen, domestischen System entstammten und damit eindeutig als potentielle Überträger der Chagaskrankheit in Frage kamen.

Veränderungen der Stammcharakteristik von Chile 5 innerhalb einer Zeitspanne von zwei Jahren wurden grundsätzlich nicht festgestellt. Nur bei einem Versuch (Abb. 66 und 67) traten einmal deutlich stärkere Lähmungserscheinungen auf, das Krankheitsbild und die Parasitämieverläufe bei den Infektionen blieben sonst weitgehend gleich. Warum in diesem

Versuch so viele Mäuse von den Lähmungen betroffen waren, bedarf weiterer Untersuchungen. Es wäre möglich, daß der Erreger bei der Entwicklung in axenisch gehaltenen Wanzen seine Stammcharakteristik verändert oder daß sich bei diesen Insekten die Fäzeszusammensetzung ändert, so daß sich dadurch ein anderes oder in bestimmten Bereichen verstärktes klinisches Bild entwickeln könnte. Dies erscheint aber bei nur einer Passage und verteilt auf immerhin 35 Wanzen sehr unwahrscheinlich.

Chile 5 ist zwar ein ungeklonter Stamm, aber im Rahmen der Passagierung wurde darauf geachtet, eine möglichst stabile Charakteristik zu bewahren: Wanzen wurden erst im späteren Parasitämieverlauf an Mäusen infiziert. Auf diese Weise werden auch Subklone weiter übertragen, die sich möglicherweise etwas verzögert im Säugetierwirt entwickeln. Entsprechend dazu wurden auch die Wanzen bereits im ersten Larvenstadium infiziert und *T. cruzi* erst im vierten oder fünften Larvenstadium – also viel später – aus ihnen gewonnen. Es wurde zudem regelmäßig in verschiedenen Wirten passagiert (Wanze – Maus), so daß sich die Flagellatenpopulationen nicht an nur einen der Wirte adaptieren konnten, also keine einseitige Selektion erfolgte. All dies kommt einem natürlichen *T. cruzi*-Vektor-Wirt-System schon sehr nahe und eignete sich daher gut für das gesuchte Modell zu einer "natürlichen Infektion" mit dem Parasiten.

6.3.3 Infektionsverläufe nach Verwendung von Flagellaten aus unterschiedlichen Passagierungen

Als in der vorliegenden Untersuchung einer Gruppe von *C57 Bl/6* Mäusen 1×10^3 Wanzen-Trypomastigote (Stamm Tulahuén) und der anderen Gruppe die gleiche Dosis an Tulahuén-Flagellaten aus der Kultur subkutan injiziert wurden, hatten die mit *T. cruzi* aus der Wanzenpassage infizierten Mäuse einen wesentlich fulminanteren Parasitämie- und Krankheitsverlauf als die mit Kulturstadien infizierten Tiere: Ihre Präpatenzzeiten waren kürzer und ihre Parasitämiemaxima lagen wesentlich höher als die der Vergleichsgruppe. Fast alle diese Tiere starben, während die mit Kulturstadien infizierten Tiere die Versuchsdauer alle mit einer sehr geringen Parasitämie überlebten.

Entsprechende Ergebnisse sind auch in der Literatur beschrieben: In einem Versuch mit *Balb/c* Mäusen wurden Trypanosomen des Tulahuén-Stammes injiziert, die wochenlang in

Triatoma infestans oder in Kultur gehalten worden waren. Die Kulturstadien wurden in einer um zwei Zehnerpotenzen höheren (!) Dosis injiziert als die metazyklischen Stadien aus der Wanze (1×10^4 und 1×10^2 Flagellaten als Infektionsdosis) (Okanla et al. 1982). Bei ähnlichen Versuchen mit *Swiss* Mäusen wurden einer Gruppe 1×10^3 Tulahuén-Flagellaten vier Wochen nach einer Infektion von *Rhodnius prolixus* intraperitoneal injiziert, der anderen Gruppe entsprechend viele Flagellaten aus einer Passagierung in Kulturmedium (Villalta & Kierszenbaum 1987). In diesen beiden Versuchen unterschieden sich die Präpatenzen der jeweiligen Vergleichsgruppen nicht nennenswert, bei den *Balb/c* Mäusen lagen sie unter 6 Tagen, die Präpatenzzeiten der *Swiss* Mäuse lagen unter 10 Tagen. Dagegen war die Präpatenz der mit Wanzenstadien infizierten *C57 Bl/6* Mäuse der vorliegenden Untersuchung mit ca. 10 Tagen um gut 2 Tage kürzer als die der mit Kulturstadien infizierten Gruppe (13 Tage). Beim Vergleich der Parasitämieverläufe konnte jedoch in jedem Versuchsansatz das gleiche Phänomen beobachtet werden: Die mit Wanzenstadien infizierten *Balb/c* Mäuse hatten Parasitämiepeaks von 1×10^7 Fl/ml am Tag 26. Ihre Kurven waren danach zwar kaum rückläufig, aber alle Tiere überlebten bis zum Versuchsende an Tag 30. Die Maxima der Kulturstadien-Gruppe lagen mit 1×10^5 deutlich darunter, und schon nach dem 9.-14. Tag fielen die Kurven wieder ab, bis sie an Tag 21 nicht mehr meßbar waren (Okanla et al. 1982). Ähnlich verhielt es sich bei den *Swiss* Mäusen: Die Infektion mit Wanzenflagellaten erzeugte Maxima von 1×10^8 Fl/ml an Tag 15 und die Tiere verstarben mit nur wenig geringeren Flagellatenkonzentrationen bis Tag 19. Bei der mit Kulturstadien infizierten Gruppe kam es zu einer weit geringeren Maximalkonzentration von 1×10^4 Fl/ml, die sich bis zum Versuchsende an Tag 30 auf gleichem Niveau hielt oder wieder leicht abfiel (Villalta & Kierszenbaum 1987). Bei den *C57 Bl/6* Mäusen der vorliegenden Untersuchung lagen die Maxima der mit Wanzenstadien infizierten Gruppe mit $5-8 \times 10^6$ Fl/ml ebenfalls um fast zwei Zehnerpotenzen höher als die der Vergleichsgruppe mit $5-20 \times 10^4$ Fl/ml, und genauso wie in den anderen Versuchen wurden die Parasitämiepeaks von den mit Wanzenstadien infizierten Gruppe im Schnitt fast 10 Tage später erreicht.

Die unterschiedlichen Werte der einzelnen Parameter in den genannten Versuchen kommen dadurch zustande, daß nicht nur mit unterschiedlichen Infektionsrouten und -dosierungen gearbeitet wurde, sondern jeweils andere Maus- und Wanzen-Stämme verwendet worden

sind. Verschiedene Routen, Inokula und Erreger-Vektor-Wirt-Systeme können nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Dennoch reagierten alle diese Systeme im Prinzip gleich, es kam überall zu entsprechenden Verschiebungen in den Parasitämieverläufen. Es scheint, wie schon von Bice & Zeledon (1970) postuliert, bei der Passagierung in Kulturmedium zu einer starken Selektion der Subklone unter den Flagellaten-Stämmen zu kommen – oder zu einem gleichmäßigen Wachstum aller Klone des Stammes, die dann wiederum in der Maus oder Wanze in Konkurrenz treten oder selektiert werden würden –, so daß die Trypanosomen für die Entwicklung in ihren "normalen" Wirten ungeeigneter werden. Für ein Modell, das einen natürlichen Infektionsmechanismus abbilden soll, sollten Kulturstadien daher nicht verwendet werden.

Da in der vorliegenden Untersuchung bei der Anpassung des Tulahuén-Stammes an die wechselnde Passagierung in Mäusen und *Triatoma infestans* zudem mehrere Zyklen notwendig waren, um eine befriedigende und mit Chile 5 vergleichbare Infektionsdichte bei den Wanzen zu erreichen, kann man auch hier von einer langsam erfolgten Selektion ausgehen. Nur die Passagierung zwischen Vektor und Säugetier entsprach aber dem zu untersuchenden "natürlichen System" und kam für das gesuchte Modell in Frage.

6.3.4 Auswirkung verschiedener bzw. unterschiedlich behandelter Flagellatenstadien im Inokulum

In den Versuchen der vorliegenden Untersuchung wurden als Inokulum jeweils aufgereinigte Flagellaten (nur Trypomastigote) in PBS oder aber Trypanosomen (Trypo- und Epimastigote) direkt in ihrem natürlichen Medium, den Wanzenfäzes verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Zusammensetzung der Stadien, mit denen infiziert wurde, Auswirkungen auf die Parasitämieverläufe der Mäuse haben.

Die Angaben über die Infektionsdosen beziehen sich immer auf die Anzahl der Trypomastigoten, mit denen infiziert wurde. Für vergleichende Versuche wurde also davon ausgegangen, daß alle Flagellaten, die die DEAE-Säule passieren, als infektiös gelten. Die Parasiten setzten sich dann anteilmäßig aus Trypomastigoten und einem Teil der Übergangsstadien zusammen, die sich in der Entwicklung von der Epi- zur Trypomastigoten befinden. Bei einer Komplement-Lysis mit Humankomplement, die mit Flagellaten des Stammes Chile 5 nach einer Säulen-isolierung durchgeführt wurde, wurde jedoch immer noch ein geringer Anteil der

Flagellaten (8%) lysiert und muß somit als nicht infektiös gelten. Dieser geringe Prozentsatz wurde jedoch als vernachlässigbar angesehen in Hinblick auf den Spielraum, der den Dosierungsangaben in hohen Verdünnungen implizit ist. Andere Ergebnisse erbrachte die Aufreinigung von Tulahuén-Flagellaten: Die Epimastigoten scheinen hier eine andere Oberflächenstruktur zu besitzen, ein großer Teil von ihnen – auch Epimastigote – passierte die DEAE-Säule.

Die Vergleiche von Inokula mit aufgereinigten oder nicht aufgereinigten Flagellaten sind auch deswegen mit Vorsicht zu betrachten, weil die Passage der DEAE-Zellulose möglicherweise die Oberflächenladungen der Trypanosomen verändert (Kleffmann et al. 1998). Dies könnte sich auf die Interaktionen zwischen Flagellaten und Wirtszellen auswirken. Bei beiden Flagellatenstadien besteht zudem die Gefahr der Oberflächenveränderung durch "Shedding" (d.h. Abstoßung bestimmter Oberflächenmoleküle), wenn sie aufgrund der langen Versuchsdauer über Stunden in PBSG+P oder Wanzenfäzes aufbewahrt wurden; Hölscher, pers. Mitteilung). Es ist dann fraglich, ob die Infektion der spät am Abend behandelten Mäuse noch mit Flagellaten durchgeführt wurden, die mit denen der zuerst vorgenommenen Infektionen in ihrer Potenz identisch waren.

Bei fast allen Säugetieren sollte die Infektion mit Epimastigoten keine Erkrankung nach sich ziehen, weil diese Stadien von einem Bestandteil des unspezifischen Immunsystems, dem Komplementsystem, sofort lysiert werden. Bei Mäusen liegt eine besondere Situation vor, weil ihr Komplement zu dieser Lyse nicht fähig sein soll (Rubio 1956). (Ob diese Stadien bei Mäusen zu einer Infektion führen können, wurde in der Untersuchung leider nicht erwähnt). Tatsächlich war mit Serum von C57 Bl/6 Mäusen der vorliegenden Untersuchung eine partielle Komplement-Lyse möglich: Etwa ein Fünftel der vorhandenen Epimastigoten wurde zerstört. Wenn bei der Infektion von Mäusen Epimastigote eine Rolle spielen würden, würden sich in dem Vergleich 5.2.2. (Abb. 20-25) Unterschiede wie in den "Dosisversuchen" ergeben. Die Menge von 20-50% Epimastigoten im Wanzenkot und -urin, die ja bei der Dosierungsangabe nicht berücksichtigt wurde, würde die Infektionsdosis erhöhen und sich dementsprechend in den Parasitämieverläufen widerspiegeln. Aus den Vergleichen verschiedener Versuche, in denen mit aufgereinigten *T. cruzi* bzw. *T. cruzi* in Wanzenfäzes infiziert worden war, geht jedoch hervor, daß eine derartige Beeinflussung nicht der Fall ist: Präpatenzen und Kurvenverläufe sind in den Vergleichsgruppen fast identisch. Auch eine mögliche Beeinflussung der Flagellaten durch die Aufreinigung schien keine Rolle zu spielen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen die Isolierung von Flagellaten über eine DEAE-Säule zwar gut geeignet war, um die Trypanosomen von Kotpartikeln (bzw. den "Fäzes") zu trennen. Eine Aufreinigung im Sinne der Gewinnung von fast ausschließlich Trypomastigoten wäre aber nicht erforderlich gewesen.

6.4 Beurteilung der verwendeten Vektoren

Triatoma infestans aus der verwendeten Zucht würde aufgrund ihres Defäkationsverhaltens für die Übertragung von *T. cruzi* über die Haut in Frage kommen: Schaub und Lösch (1988) zeigten an infizierten Wanzen, daß etwa 5-7 min. nach der ca. 15-minütigen Saugzeit die erste Defäkation erfolgt. Diese Zeit ist kurz genug, um einen infizierten Kottropfen in der Nähe des Stichkanals abzusetzen, da sich die Wanzen nach der Blutmahlzeit nicht unbedingt sofort weit vom Ort ihres Anstiches entfernen.

Im Unterschied zu Arbeiten anderer Experimentatoren (Neal & McHardy 1977, McHardy & Neal 1979, Villalta & Kierszenbaum 1987, Lopez et al. 1995) wurden die eingesetzten Wanzen schon im ersten Larvenstadium infiziert und frühestens drei Monate später zur Gewinnung von Flagellaten genutzt. Auf diese Weise hatten die Trypanosomen mehr Zeit, sich an die Wanzen zu adaptieren. Bei *Triatoma infestans* hat dann der erste abgesetzte Fäzes-Tropfen ein durchschnittliches Volumen von 10 µl, besteht überwiegend aus "Kot" und enthält insgesamt ungefähr 46.000 *T. cruzi*, davon 28% (=12.000) Metazyklische (Schaub & Lösch 1988). Mit dieser Flagellatenkonzentration ist eine Infektion durch den Stichkanal – zumindest bei Mäusen – durchaus wahrscheinlich, da die Morbiditätsrate in der vorliegenden Untersuchung bei 60 bis 100% lag.

Entsprechend ihren Gewohnheiten im Feld griffen die Wanzen ihre Opfer abends williger an als tagsüber. Beide verwendeten Wanzenarten zeigten ein jeweils arttypisches Angriffsverhalten (Zeledon & Rabinovich 1981): *Triatoma infestans*, als Kulturfolger, war weniger aggressiv, ließ sich Zeit zum "Anpirschen" an den Wirt und war auch leicht zu stören. Anders dagegen *Dipetalogaster maximus*: Als Wüstenbewohner dazu gezwungen, jede Gelegenheit für die Nahrungsaufnahme zu nutzen, griff diese Art zügig an und ließ ihr Opfer nur ungern vor erfolgter Blutaufnahme wieder los. Vergleiche von Infektionsverläufen und Protokollen zeigten jedoch, daß durch "gewaltsames" Ablösen der Wanzen keine auffallend größere Läsion

in der Haut entstand, durch die sich die Eintrittspforte für die Flagellaten vergrößert hätte. Als Beispiel hierfür wäre eine Maus aus Abb. 13 zu nennen (mit der Präpatenz von 17 Tagen, die an Tag 23 verstarb), bei der sich die Wanze im Auftropfversuch nur schwer entfernen ließ. Der Infektionsverlauf bei diesem Tier unterschied sich nicht wesentlich von den anderen der Gruppe.

Das besonders intensive Saugverhalten der salivarektomierten Wanzen könnte darin begründet sein, daß die Tiere bei und nach der Operation aufgrund der Öffnung des Chitinskeletts Flüssigkeit verloren hatten und diesen Mangel auszugleichen suchten. Eine andere mögliche Erklärung wären neurologische Schäden, die durch das Aufklappen des Tergits und den arbeitstechnisch dabei entstehenden Druck auf den Kopf und Thorax des Insektes entstanden sein könnten. Ebenso war eine Beschädigung der ventral ziehenden Nerven beim Aufsuchen der Speicheldrüsen nicht immer auszuschließen.

Einige Wanzen akzeptierten Mäuse als Nahrungsquelle dagegen überhaupt nicht. Hierbei spielte die geringere Körpertemperatur narkotisierter Mäuse wahrscheinlich eine wichtige Rolle: Wanzen, die den Rücken der Mäuse nicht annehmen wollten, stachen sie bereitwillig im Bauchbereich oder in der Nase an. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Arthur (1976): Bei Mäusen gibt es zwischen den unterschiedlich gut durchbluteten Hautarealen Temperaturdifferenzen von 4°C, und von Wanzen werden die wärmeren Bereiche für den Anstich bevorzugt. Auch die Orientierung über Geruchsstoffe schien für die Wanzen manchmal schwierig zu sein: Viele "winkten" erst lange Zeit mit den Vorderbeinen und bewegten die Antennen, bis sie sich der Maus zuwandten.

Das Stichverhalten der Wanzen beeinflusste die Infektionsverläufe der Mäuse nur wenig. Kontakt der anstechende Wanze zur Blutbahn veränderte die Parasitämien in den Auftropfversuchen nicht. Es schien also nicht wichtig für die erste Phase der Infektion zu sein, ob der Stichkanal und damit die Eintrittspforte für die Erreger an einem Blutgefäß endet oder nicht. Beispiele dafür finden sich u.a. in den Gruppen 7.1. und 9.1. (Abb. 68 und 76). Entsprechendes gilt für die Verletzung von Hautgefäßen bei intradermaler Injektion. Auch die beiden Mäuse aus den Gruppe 18.1. und 18.2. (Abb. 12 und 15), bei denen sich eine kleine Hautverdickung bzw. ein winziges Hämatom während des Stiches gebildet hatten, zeigten keine Auffälligkeiten im Parasitämieverlauf.

Häufiges Umsetzen der Mundwerkzeuge bei salivarektomierten Wanzen könnte sich dagegen auf die Versuchsergebnisse ausgewirkt haben: Bei sehr "zerstochenen" Mäusen war nicht sicher gewährleistet, daß die aufgetropften Flagellaten nur eine einzige Eintrittspforte zur Verfügung hatten. Ein Beispiel ist die in Gruppe 9.1. (Abb. 76) erwähnte Maus, deren Parasitämie innerhalb ihrer Gruppe das höchste Maximum hatte. Bei diesem Tier könnte durch mehrere Stichkanäle die Infektionsdosis höher gewesen sein als bei den anderen.

6.5 Modifikationen der dermalen Infektion

Beim Vergleich verschiedener dermalen Infektionsmöglichkeiten wurde zunächst bei allen Versuchen die gleichen Flagellaten-Dosis eingesetzt. Die Präpatenzzeit der Mäuse-Gruppe, der die Erreger injiziert wurden, war um drei bis vier Tage kürzer als die der anderen Gruppen, denen *T. cruzi* auf die unblutig angeritzte Haut bzw. auf den Stichkanal von Wanzen (ohne Speicheldrüsen) aufgetropft worden ist. Die Präpatenzen der letztgenannten Gruppen unterschieden sich im Vergleich dazu nur wenig voneinander (s. Vergleich 5.4. A, Kap. 5.4). Ein derartiges Ergebnis kommt dadurch zustande, daß die eigentliche Infektionsdosis bei der Injektion der Flagellaten mit Sicherheit deutlich höher ist als bei den Auftropfversuchen, bei denen nur wenige Erreger den Weg durch kleine Läsionen in die Haut finden. Aktiv die Hautbarriere durchdringen können die Trypanosomen nicht (Marsden 1967b).

Bei Nacktmäusen wurden die gleichen Versuche durchgeführt, es wurde aber ein sehr viel geringeres Inokulum injiziert. In diesem Fall unterschieden sich Präpatenzen und Infektionsverläufe nur wenig. Die höheren Maxima einer Gruppe (Abb. 36) können nicht auf speziell durch die Wanze verursachte Faktoren, sondern nur auf biologische Varianz zurückgeführt werden, da weder Wanzenspeichel noch Wanzenfäzes an diesem Versuch beteiligt waren.

Auch bei dem Vergleich der beiden *T. cruzi*-Stämme wurden geringfügig unterschiedliche Injektionstechniken angewendet: Ein Stamm wurde subkutan, der andere intradermal injiziert (Abb. 17 und 18). Da die Haut der Mäuse aber nur von sehr geringer Dicke ist, entstanden hierdurch keine besonderen Abweichungen im Infektionsverlauf: Generell unterschieden sich Parasitämien von Tieren, bei denen die intradermale Injektion nicht gut ausgeführt war – bei denen keine Quaddel in der Haut entstand, das Inokulum also in das subkutane Gewebe abgelaufen war – nicht von den Vergleichstieren. (Abb. 42 und 43). Entscheidend für die

dermale Infektion scheint also nicht die genaue Eindringtiefe der Trypanosomen in der Haut zu sein, sondern vielmehr die Anzahl der Parasiten, die die Hautbarriere überhaupt überwinden können.

6.6 Dosisversuche

Schon Marsden (1967b) hatte Vergleiche zwischen Auftropfversuchen mit angekratzter Haut und Injektionsversuchen mit verschiedenen Infektionsdosen gemacht und daraus geschlossen, daß durch solche Kratzer oder andere Mikroläsionen, die z.B. bei der Schur entstehen können, einige hundert Flagellaten in den Körper eindringen können und für eine patente Infektion ausreichen. Um nun herauszufinden, wie viele Flagellaten durch den Stichkanal einer Wanze eindringen können, sind in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls Auftropfversuche mit Injektionsversuchen verschiedener Dosierungen verglichen worden. Dafür wurden Nacktmäuse verwendet, da ihre Parasitämieverläufe nicht so stark durch Immunreaktionen beeinträchtigt werden.

Es ließ sich eindeutig erkennen, daß die Präpatenzzeiten – bei großen Dosisunterschieden – länger wurden, je kleiner die injizierte Flagellaten-Dosis war. Gleichzeitig stieg die Variabilität unter den Einzeltieren einer Gruppe. Entsprechend der Beobachtung von Kirchhoff & Hoft (1990) verhielten sich Parasitämiemaxima und Überlebenszeiten unabhängig von der Infektionsdosis. Kurvenverläufe und Maxima der Versuche entsprachen sich in etwa, daher waren die Präpatenzen für die Auswertung am aussagekräftigsten. Der gleiche Versuch wurde mit kleineren Dosisdifferenzen wiederholt und ergab dabei wesentlich geringere Abweichungen zwischen den Infektionsverläufen: Nur die Parasitämien nach einer Injektion von 1000 *T. cruzi* hatten noch deutlich kürzere Präpatenzen als die der anderen Gruppen. Die Präpatenzen der Gruppen, die mit 10-100 *T. cruzi* – also sehr geringen Dosen – infiziert wurden, unterscheiden sich dagegen fast nicht voneinander. Dieser Effekt entsteht vermutlich unter anderem dadurch, daß niedrige Dosierungen durch die statistische Verteilung der Flagellaten in sehr hohen Verdünnungen kaum genau einzustellen sind.

In beiden Ansätzen führt der Vergleich mit Auftropfversuchen zu dem Schluß, daß bei der Infektion mit *T. cruzi* durch den Stichkanal einer Wanze 10-100 Flagellaten in die Haut eindringen. Dieses Ergebnis bestätigte ein letzter Versuchsansatz, in dem die angenommene

Infektionsdosis von ca. 50 Flagellaten einer Gruppe von Nacktmäusen injiziert wurde, während der andern Gruppe *T. cruzi* auf den Wanzen-Stichkanal aufgetropft wurden: Die Präpatenzen und Kurvenverläufe beider Gruppen waren nahezu identisch.

Entsprechende Versuche wurden auch mit den immunkompetenten C57 Bl/6 Mäusen durchgeführt (Vergleiche 5.5.2.A und B, Abb. 49-54). Dabei zeigte sich, daß es zu ähnlichen Verschiebungen der Präpatenzen zwischen den zu vergleichenden Gruppen kommt. Auffallend ist jedoch, daß bei der Injektion von nur 10 Flagellaten die Morbidität nur 25% beträgt und die Tiere der letztgenannten Gruppe dabei einen chronischen Krankheitsverlauf mit sehr geringen Flagellatenkonzentrationen durchliefen (Abb. 54). Diese von den Nacktmäusen sehr verschiedene Reaktion zeigt, daß einige immunkompetente Mäuse bei sehr geringen Infektionsdosen in der Lage sind, die Parasitämie zu begrenzen oder sogar in der allerersten Infektionsphase so erfolgreich zu bekämpfen, daß es nicht zu einer Erkrankung kommt. Die Überprüfung der negativ gebliebenen Tiere durch Xenodiagnose zeigte, daß bei keiner der Mäuse eine latente Infektion vorlag. Die bei einer Infektion durch den Stichkanal eindringende Flagellatenanzahl scheint also doch größer als 10 zu sein: Die Morbidität in den Auftropfversuchen mit C57 Bl/6 Mäusen lag bei 60-100% und es kam nie zu chronischen Krankheitsverläufen.

Insgesamt lassen die Ergebnisse aller Dosisversuche also darauf schließen, daß bei Infektionen durch den Stichkanal einer ca. 15-17 mm großen Wanze 50-100 Flagellaten in die Haut eindringen. Diese Infektionsdosis ist sehr klein im Vergleich zu den Dosierungen, die zumeist in Laborversuchen verwendet wurden: Viele Infektionsversuche sind in der Literatur mit Inokula von 1×10^3 bis 1×10^6 Flagellaten beschrieben.

In der Präpatenztabelle zu den Dosisversuchen fällt auf, daß gleichartige Versuche nur gleiche Ergebnisse erbringen, wenn sie bei gleicher Umgebungstemperatur durchgeführt worden sind: In einer sehr heißen Phase im Sommer waren die Präpatenzen zwar kürzer (!), die Parasitämieverläufe aber weniger steil als bei vergleichbaren Versuchen im Winter. Bei solchen Versuchen (Abb. 53/54, 76-78, 42-46) verliefen die Parasitämien zum großen Teil nicht letal und die Flagellatenkonzentration nahm bei vielen Mäusen sogar wieder deutlich ab. Schon Machioldi & Rodriguez (1968) und Silva et al. (1987) hatten festgestellt, daß die Erkrankung ihrer Versuchstiere bei höheren Temperaturen milder verlief. Während bei 10°C gehaltene Mäuse an einer Infektion mit hoher Parasitämie starben, hatten bei 35°C gehaltene Vergleichsgruppen eine wesentlich flachere Parasitämie, machten eine hämatologische und sogar

histologische Clearance und "gesundeten". Bei so unterschiedlich gehaltenen Mäusen divergiert die Körpertemperatur um 3-4°C (Dimock et al. 1992). Obwohl bei aggressiveren Infektionsverläufen die Präpatenzen im allgemeinen kürzer sind, tritt bei kühleren Temperaturen der umgekehrte Effekt auf: Trotz fulminanterer Parasitämien sind die Präpatenzen verlängert. Ein solches Phänomen wurde auch schon bei anderen Trypanosomen beobachtet (Laveran & Mesnil 1902). Bei der Erhöhung der Körpertemperatur um einige Grad können alle Immunreaktionen genau wie in einer Fieberphase besser ablaufen. Zudem werden bei um einige Grad erhöhter Körpertemperatur von den Flagellaten selbst Hitzeschock-Proteine gebildet, die im Wirt eine gesteigerte humorale Antwort hervorrufen und somit immunogen zu sein scheinen (Dimock et al. 1992). Die Mäuse werden zudem nicht zusätzlich durch die im Winter notwendige Temperaturregulation geschwächt: Während sie in der vorliegenden Untersuchung bei gemäßigten Temperaturen in der Spätphase der Infektion immer eng aneinander und aufeinander gedrängt hockten, um Wärme zu sparen, schliefen die Tiere in besagtem heißen Sommer alle einzeln und vermieden jeden engen Körperkontakt. In der Natur tritt dieses Phänomen wahrscheinlich bei Höhlen- und Dachstuhlbewohnenden Fledermäusen auf, die z.T. trotz hohen Infektionsdrucks und guter Suszeptibilität erstaunlich geringe Infektionsraten aufweisen (Marinkelle 1982).

Jahreszeitliche Schwankungen mit steileren Parasitämien im Frühling und im Herbst sowie flacheren im Sommer und im Winter, wie sie Hauschka (1949) bei dem "WBH-Stamm" von *T. cruzi* feststellte, traten bei den Versuchen der vorliegenden Untersuchung nicht auf.

6.7 Begleitende Faktoren

Die Untersuchungen der ersten Infektionsphase bei Leishmanien haben einen gravierenden Einfluß von einem die Übertragung begleitenden Faktor – dem Insektenspeichel – ergeben, und ähnliche Mechanismen sind bereits bei anderen Parasit-Überträger-Wirt-Systemen bekannt. Für die "natürliche Übertragung" von *T. cruzi* kamen als begleitende Faktoren zum einen die Wanzenfäzes in Frage, die als Überträgermedium mit in den Stichkanal eingekratzt werden, zum anderen die in den Fäzes enthaltenen Symbionten oder Symbiontenreste und schließlich der Insektenspeichel, der sich durch den Wanzenstich bereits in der Läsion befindet.

6.7.1 Beeinflussung der Infektion mit *Trypanosoma cruzi* durch Wanzenfäzes

Die Injektion von *T. cruzi* in Wanzenfäzes als Trägermedium ergab folgendes: Wurde eine größere Menge von Wanzenfäzes mit den Flagellaten injiziert, kam es zu einem wesentlich flacheren Parasitämieverlauf, nachdem die Kurven anfänglich genauso steil anstiegen wie die der Vergleichsgruppe (Abb. 55 und 56). Bei den Mäusen traten schwere klinische Begleiterscheinungen auf, die wahrscheinlich auf eine immunologische Auseinandersetzung mit den Fremdproteinen und anderen Inhaltsstoffen des Wanzenkotes zurückzuführen sind. Da es im Rahmen einer so massiven Reaktion zu einer allgemeinen Stimulation des Immunsystems kommt, wurde auch die Entwicklung der Flagellaten beeinträchtigt. Injizierte man eine sehr viel kleinere Kot- und Urinmenge mit den Parasiten in die Haut, so fand – wenn überhaupt – eine lokale Reaktion statt, der Allgemeinzustand der Mäuse wurde dadurch nicht beeinträchtigt. (Auch Mäuse, denen uninfizierter Wanzenkot injiziert worden war, zeigten keine lokalen Entzündungsreaktionen oder systemische Begleiterscheinungen). Während die Präpatenzen der mit Fäzes behandelten Gruppe einmal deutlich verlängert waren, trat dieser Effekt in einem anderen gleichartigen Versuch nicht auf. Die Kurvenverläufe der Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich. Bei den Gruppen, denen *T. cruzi* nur mit oder ohne Wanzenfäzes aufgetropft wurden, ergaben überhaupt keine Unterschiede.

Man kann also folgern, daß Wanzenfäzes, in einer geringen Menge injiziert, nur noch einen geringen Einfluß auf das frühe Infektionsgeschehen haben. Sind die Fäzes nur noch in einer so geringen Dosierung an der Infektion beteiligt, wie es der natürlichen Übertragung entspricht, haben sie gar keinen Einfluß auf die erste Infektionsphase.

Kirchhoff & Hoft (1990) fanden bei ihren Immunisierungsversuchen dagegen eine deutliche Beeinflussung des Infektionsverlaufes durch Wanzenurin. Sie verabreichten Mäusen intravenös 300 µl Urin von *Dipetalogaster maximus* im Abstand von zwei bis drei Wochen. Die Parasitämien der ersten Gruppe erreichten nach oraler Infektion mit 500 *T. cruzi* (Tulahuén-Stamm) zwar die gleichen Maxima wie die der nicht immunisierten Vergleichsgruppen, waren aber schneller rückläufig und zwanzig Tage früher als die anderen nicht mehr meßbar. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, daß Wanzenurin normalerweise die Entwicklung der Trypanosomen fördert – also bei natürlicher Infektion immunsuppressiv wirkt. Daher könnte durch eine "Impfung" mit Urin (und damit induzierter Antikörperbildung gegen diesen Faktor) vielleicht erreicht werden, daß die infizierten Mäuse die Parasitämie schneller begrenzen. Diese immunologische Reaktion kann sich allerdings nicht auf die Frühphase der Infek-

tion beziehen, da die Mäuse des beschriebenen Versuches zunächst genauso hohe Parasitämien entwickelten wie die Vergleichsgruppe. Eine andere – wahrscheinliche – Erklärung für die Resultate von Kirchhoff & hofst wäre, daß es bei Einsatz einer so großen Menge von Wanzenurin (und damit auch Fremdproteinen) ähnlich wie bei dem Versuch mit einer großen Fäzesmenge (Abb. 56) zu einer allgemeinen Immunstimulation (Para-Immunisierung) gekommen war, der Wanzenurin die Entwicklung der Trypanosomen also gar nicht spezifisch beeinflußt hatte.

6.7.2 Symbionten als Einflußfaktor

Einige Nocardienarten vermehren sich im Säugetierwirt intrazellulär in Makrophagen, bis wachstumsbedingt eine mycelartige Struktur entsteht, die die Wirtszelle sprengt und interzellulär weiterwächst. Diese Keime provozieren dabei eine lokale granulomatöse Immunreaktion, es bilden sich in der Haut oder in den inneren Organen des Patienten multiple kleine Abszesse. Die Erreger zeigen eine Affinität zu Lunge und Gehirn, Niere und Nebenniere; es kann durch hämatogene Streuung aber auch zu einer weiten Dissemination im ganzen Körper kommen (Beaman et al. 1980, Rolle & Mayr 1993). Einige Spezies von Nocardia können Makrophagen dabei intrazellulär beeinflussen, sie können die Fusion von Phago- und Lysosomen verhindern oder die Zusammensetzung der lysosomalen Enzyme verändern. Es kommen sogar Übertritte in das freie Zellplasma vor, in dem die Nocardien sich dann ungestört entwickeln. In einem solchen Fall ist der Wirtsorganismus nicht in der Lage, die Erreger vollständig zu eliminieren (Beaman & Beaman 1994). Bei anderen Arten ist hingegen beobachtet worden, daß mycolsäurehaltige Zucker der Nocardien-Zellwand die Interferon- γ -Produktion in Lymphozyten anregen und die Makrophagenaktivierung in einer Weise induzieren, wie man es bisher nur von Mykobakterien kannte (Kaneda et al. 1986, Izumi et al. 1986). Bei Injektion in Tumoren konnte durch eine derartige Immunstimulation der tumorassoziierten Makrophagen sogar das Tumorstadium partiell inhibiert werden (Ogura et al. 1986).

Viele verschiedene Bakterienendotoxine können als Immunstimulatoren wirken (Krause & Lew 1988). Auch in Bezug auf *T. cruzi*-Infektionen wurde festgestellt, daß z.B. bei gleichzeitiger Behandlung von infizierten Makrophagenkulturen mit rekombinantem Tumor-Nekrose-Faktor und Bakterienendotoxin von *Escherichia coli* die Vermehrung der Flagellaten in den Zellen teilweise gehemmt werden konnte (Wirth & Kierszenbaum 1988). Aufgrund dieser

Ergebnisse kam die Frage auf, ob die von den Wanzen mit dem Kot ausgeschiedene Nocardien oder Rhodococcus-Bakterien, die gleichzeitig mit den Flagellaten an den Inokulationsort gelangen, dort vielleicht ihrerseits immunstimulierend oder -hemmend wirken und so die erste Infektionsphase beeinflussen. Da sich Symbionten bei den Wanzen im Bereich der Cardia und des Magens vermehren und in den weiteren Abschnitten des Darmtraktes verdaut werden, gelangen nur wenige von ihnen lebend bis ins Rektum. Der Kottropfen einer Wanze enthält nur wenige koloniebildende Einheiten (Eichler, pers. Mitteilung). Fraglich ist jedoch, ob auch die Zellwandbestandteile der Bakterien vollständig zersetzt werden; sie könnten möglicherweise noch immunogen wirken.

Bei Versuchen, in denen *T. cruzi* zusammen mit einer großen Menge an Nocardien bzw. in sterilen Wanzenfäzes aufgetropft wurden, zeigte sich jedoch, daß es zumindest zu keinen unterschiedlichen Parasitämieverläufen kam. Die Präpatenzzeiten der Gruppen "mit Nocardien" sind allerdings um gut zwei Tage nach hinten verschoben, was eine tendenzielle Beeinflussung der frühen Infektion bestätigen würde. Diese könnte tatsächlich die Folge einer geringen Immunstimulation durch die Symbionten sein. Die etwas verminderte Erkrankungsrate einer Gruppe (Abb. 67) aber ist vermutlich nicht auf die Nocardien zurückzuführen, da eine der Mäuse mit sehr hoher Nocardieninfektion zwar die kürzeste Präpatenz und das höchste Kurvenmaximum hatte, die andere gleichbehandelte Maus jedoch gar nicht erkrankte. Die Infektionsverläufe der Gruppe, in denen die Flagellaten in "normalen" Wanzenfäzes aufgetropft wurden, dauerten u.a. deswegen länger als die der erstgenannten Gruppen, weil bei ihnen keine schweren Lähmungserscheinungen auftraten und die Tiere deswegen nicht frühzeitig getötet werden mußten. (Ein Zusammenhang dieser klinischen Symptome mit den Symbionten ist nicht weiter untersucht worden, erschien aber unwahrscheinlich). In der vorliegenden Untersuchung ergab sich also kein nennenswerter Einfluß der Symbionten oder anderer, in "normalen" unsterilen Fäzes vorhandener Bakterien, auf die Infektionsverläufe.

6.7.3 Beeinflussung der Infektion durch Wanzenspeichel

Bei der Übertragung von anderen Protozoen – den Leishmanien – kommt es durch den Speichel der übertragenden Sandmücke zu einer starken Beeinflussung der frühen Parasitenentwicklung in der Haut. Auch diese Insekten besitzen Substanzen in ihrem Speichel, die ihnen die Blutmahlzeit erleichtern (Ribeiro 1987b). Darüber hinaus gibt es aber noch weitere

Faktoren, die den wenigen injizierten Parasiten ihre Etablierung im nächsten Wirt ermöglichen. Es wurde festgestellt, daß schon 5-10% einer Phlebotomus-Speicheldrüse ausreichen, um eine sichere Infektion mit nur ca. 10 Erregern zu gewährleisten. Diese Anzahl, 10-100 Erreger, wird beim Stich von der Sandfliege übertragen, kann sich aber ohne die Unterstützung der Speichelfaktoren kaum entwickeln (Warburg & Schlein 1986, Theodos et al. 1991). "Leishmania-enhancing-factors" setzen die erste unspezifische und sogar die erste spezifische Immunantwort aus: Sie verhindern die Stickoxydproduktion der Makrophagen und machen sie refraktär gegenüber TNF α und Interleukin1, so daß sich diese ersten Wirtszellen von Leishmania auch nicht mit einem Respiratory-Burst gegen die eindringenden Flagellaten wehren können. Die Beeinflussung der immunologischen Abwehr geht sogar noch weiter: Normalerweise wird die spezielle Immunantwort gegen die "Eindringlinge" dadurch ausgelöst, daß befallene Makrophagen zirkulierenden T-Zellen das zu bekämpfende Antigen präsentieren. Der "Leishmania-enhancing-factor" verhindert diesen Mechanismus aber zumindest für eine Dauer von vier Tagen, also für eine Zeitspanne, die genau einem Vermehrungszyklus des Parasiten entspricht! Danach sind ausreichend Erreger vorhanden, um die Infektion zu garantieren. Der sogenannte "Leishmania-enhancing-factor" ähnelt dem Molekül CGRP (calcitonin-gene-related-peptide) aus dem Säugerstoffwechsel. Experimentell eingesetzt hat dieses Molekül sogar fast die gleiche Wirkung wie die Substanz aus dem Phlebotominenspeichel, letztere ist aber bis zu 1000fach wirksamer. Verglichen mit der experimentellen Injektion durch den Menschen ist die Wirkung nochmals stärker, wenn man die Sandfliege ihren Speichel selbst injizieren läßt. Man kann also davon ausgehen, daß das natürliche System noch wesentlich komplexer ist. CGRP ist nicht bei allen Phlebotomosarten in gleicher Menge vorhanden, dennoch fördert aber jeder Sandfliegen-Speichel jede Leishmanie. Die genannten Mechanismen funktionieren bei allen getesteten Mausstämmen, unterschiedliche Wirkungsgrade sind dabei unabhängig von der genetischen Resistenz der Mäuse (Theodos et al. 1991)!

Solche Schutzmechanismen für zu übertragende Erreger könnten auch für *Stercoraria* von Bedeutung sein, da auch sie möglicherweise den Stichkanal des Vektors als Eintrittspforte benutzen (Titus & Ribeiro 1990). Die vorliegende Untersuchung ergab allerdings keine Ergebnisse, die auf ähnliche Mechanismen bei der Übertragung von *T. cruzi* hindeuten würden: Wenn Mäuse vor dem Auftropfen von *T. cruzi* von unbehandelten *Dipetalogaster maximus* (L4) angestochen worden waren und sich somit der Speichel dieser Wanzenart im Stichkanal befand, wurden im Vergleich zu Auftropfversuchen mit salivarektomierten Wanzen keine Unterschiede in den Präpatenzen und Infektionsverläufen festgestellt. Mäuse, die

dagegen vor dem Auftropfen von *T. cruzi* von unbehandelten *Triatoma infestans* angestochen wurden, reagierten anders: Es zeigte sich bei wiederum beiden Mausstämmen, daß die Gegenwart von *Triatoma*-Speichel sowohl zu etwas längeren Präpatenzen als auch zu flacheren Parasitämieverläufen führt. Letzteres Phänomen war besonders bei den C57 Bl/6 Mäusen ersichtlich, diese Mäuse überlebten fünf bis zehn Tage länger als die der Vergleichsgruppe.

Ein solcher Unterschied könnte durch die Spezies-spezifischen Unterschiede in der Zusammensetzung des InsektenSpeichels bedingt sein: Während *Dipetalogaster maximus* an Reptilien adaptiert ist (Ryckman & Ryckman 1963), hat sich *Triatoma infestans* im Verlauf der Evolution vollständig an Säugetiere angepaßt. Es wäre aber auch möglich, daß durch verschiedene Durchmesser der Wanzenrüssel unterschiedlich große Eintrittspforten entstehen und dadurch auch die Infektionsdosis variierte. Um dies auszuschließen, wurden Auftropfversuche mit kleineren Stadien von *Dipetalogaster* wiederholt. Eine Vermessung der Mundwerkzeuge ergab, daß die Größe der Maxillen von *Dipetalogaster* (L3) der von *Triatoma* (L5) entspricht. Aber auch bei dieser Variante kam es zu mildereren Krankheitsverläufen, wenn bei der Infektion *Triatoma*-Speichel anwesend war. Der Speichel von *Triatoma infestans* scheint also tatsächlich – zumindest in diesem Parasit-Vektor-Wirt-System – den Infektionsverlauf zu beeinflussen. Im Gegensatz zu der Wirkung von *Phlebotomos*-Speichel auf *Leishmanien* handelt es sich hier jedoch nicht um Immunsuppression, sondern um einen immunogenen Effekt. Anders als bei anderen Parasiten scheint für die Entwicklung von *Trypanosoma cruzi* eine Beeinflussung der primären Immunreaktionen des Säugetierwirtes durch vektorbedingte Faktoren völlig gleichgültig zu sein.

Eine Beeinflussung des Infektionsgeschehens durch Speichel von *Triatoma infestans* fand auch Sherlock & Sadigursky (1997). Er infizierte eine Gruppe von Mäusen mit 100 Flagellaten des Y-Stammes intraperitoneal, eine zweite Gruppe von acht Mäusen mit 100 Flagellaten und dem gesamten Inhalt einer Speicheldrüse dieser Wanzenart. Bei allen Mäusen der ersten Gruppe entwickelte sich eine diffuse Myokarditis, bei den Tieren der zweiten Gruppen traten einige diffuse und einige fokale Myokarditiden auf. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, daß Inhaltsstoffe des *Triatominenspeichels* den Verlauf der Infektion beeinflussen. Diese Schlußfolgerung kann jedoch angezweifelt werden, da nur zwei kleine Gruppen untersucht wurden. Die Abweichung der pathologischen Befunde beider Gruppen erscheint sehr gering und könnte in der immunologischen Variabilität der Einzeltiere begründet sein, die sich auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit immer wieder gezeigt hat. Fraglich ist zudem, ob

Inhaltsstoffe des InsektenSpeichels intraperitoneal die gleiche Wirkung entfalten würden wie in Haut und Schleimhäuten, da sie dort viel mehr verdünnt würden als in einer Eintrittspforte in der Haut und weil sich intraperitoneal qualitativ und quantitativ andere Immunzellen befinden.

6.7.4 Ist bei der Chagaskrankheit eine Immunisierung gegen den Überträger möglich?

Titus & Ribeiro (1990) formulierten sinngemäß: Je besser die Einzelheiten der Übertragungsmechanismen im Parasit-Vektor-Säugetierwirt-System bekannt werden, umso eher wird vielleicht eine Möglichkeit gefunden, nicht gegen die Parasiten, sondern gegen die Vektoren zu immunisieren. Dieser Ansatzpunkt könnte von Bedeutung sein, da die Entwicklung einer Vakzine gegen die Erreger selbst bis jetzt keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielte.

Gemäß den Ergebnisse der im vorhergehenden Kapitel diskutierten Versuche scheint sich bei der Übertragung von *Trypanosoma cruzi* allerdings kein solcher Ansatzpunkt zu bieten: Selbst wenn Inhaltsstoffe aus dem WanzenSpeichel oder -urin eine immunsuppressive Wirkung entfalten können, so ist diese offensichtlich aufgehoben, wenn die Stoffe in einer so geringen Konzentration an der Infektion beteiligt sind, wie sie bei der "natürlichen Infektion" über die Haut besteht. Bei den "Begleitfaktoren" Wanzenfäzes, -speichel und Symbionten konnte kein oder nur ein geringgradiger immunogener Effekt beobachtet werden. Eine Immunisierung mit einem dieser Faktoren zu versuchen, um damit die Etablierung der Infektion nach erfolgter Übertragung zu verhindern, erscheint also in Bezug auf die Chagaskrankheit – anders als bei Leishmaniasis – nicht sinnvoll. Zusätzlich wäre zu bedenken, daß sich eine *T. cruzi*-Infektion nicht unbedingt am Inokulationsort etablieren muß, da einige der Flagellaten nach dem Eintritt in die Haut offensichtlich sehr schnell durch die Lymphdrainage abgeschwemmt werden (Bijovsky et al. 1984).

6.8 Standardisierung

Im Verlauf der Diskussion der Ergebnisse wie auch schon in der Literaturübersicht hat sich gezeigt, wie viele Variablen bei der Beurteilung einer *Trypanosoma cruzi*-Infektion berücksichtigt werden müssen. Bei der Arbeit mit dem Erreger sollte daher versucht werden, die

große Zahl der vorhandenen Variablen so weit wie möglich einzuschränken (Phillips 1959, Marsden 1967a, Deane et al. 1984a, WHO 1984).

In dem vorliegenden System waren als fixe Faktoren vorgegeben

- der Erreger-Stamm mit seinen bestimmten Eigenschaften wie z.B. seinem Histotropismus im verwendeten Mäusestamm;
- der Vektor, der mit seinem arttypischen Angriffsverhalten, seinem Defäkationsmuster und seiner Nahrungsakzeptanz als "natürlicher Vektor" in Frage kam;
- die Mäusestämme mit einer bestimmten Suszeptibilität dem Erreger gegenüber.

Alle anderen Faktoren waren variabel. Beeinflußbar waren

- den Erreger betreffend z.B. die Auswahl der Stadien;
- den Vektor betreffend die Auswahl gleich großer Individuen;
- bei den Mäusen Alter und Geschlecht.

Zu den nicht zu beeinflussenden Faktoren gehören u.a.

- die individuelle immunologische Reaktionsfähigkeit der Mäuse und ihr Immunstatus in Bezug auf Sekundärinfektionen;
- die Umgebungsbedingungen wie Temperatur, Tageslichtlänge und Luftfeuchtigkeit in der Versuchstierhaltung.

In Anbetracht so vieler nicht oder nur teilweise standardisierbarer Faktoren müßte eigentlich mit sehr großen Versuchsgruppen gearbeitet werden, um Schwankungen in den Ergebnissen zu verringern. Leider war dies aus verschiedenen Gründen nicht möglich: Die Verfügbarkeit an Wanzen und Mäusen passenden Alters und Geschlechtes war zuweilen begrenzt, und die Haltung von mehr Tieren gleichzeitig wäre in den gegebenen Räumlichkeiten nicht akzeptabel gewesen. Die Zahl der tatsächlich vorhandenen Versuchstiere verringerte sich weiter dadurch, daß durch die Sekundärerkrankungen wiederholt Tiere ausfielen. Eine zusätzliche Einschränkung war durch die Dauer der Versuchsansätze gegeben: Schon bei fehlerfrei nach Protokoll durchgeführten Versuchen summierten sich etliche Stunden. Hinzu kam fast immer, daß sich die eingesetzten Wanzen nicht sehr willig zeigten, die Mäuse wie gewünscht anzustechen, obwohl sie vorher gehungert hatten.

Eine Verbesserungsmöglichkeit wäre vielleicht die Arbeit mit gepaarten Versuchen gewesen. Hierbei besteht aber das Risiko der fehlenden Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen. Diese hätten sich zusätzlich zu der biologischen Variabilität der Immunreaktionen der Einzeltieren ausgewirkt, und möglicherweise wäre es dadurch zu einer noch größeren Streuung als in den durchgeführten Versuchen gekommen. Zudem entwickeln sich neue Versuchspläne mit der Auswertung der vorangegangenen Versuche. Eine gepaarte Versuchsanlage würde dabei zu viel Zeit kosten, da die gesamte Versuchsdauer für nur einen Ansatz jeweils zwischen einem und drei Monaten betrug.

In der vorliegenden Arbeit ist also nur ein ganz bestimmtes Parasit-Vektor-Wirt-System beschrieben worden. Vergleichbar mit anderen, in der Literatur beschriebenen Versuchen ist es wegen der vielen Variablen im eigentlichen Sinne nicht. Bei dem Vergleich vom T. cruzi-Stamm Chile 5 mit dem Stamm Tulahuén kann man auch nicht von einem Vergleich eines unbekanntes Stammes mit einem bekannten "Referenzstamm" sprechen. Die von mir beobachteten Verhaltensweisen des Tulahuén-Stammes können vielleicht in einigen Punkten mit beschriebenen Ergebnissen übereinstimmen. Da die Charakteristik der Flagellatenstämme aber unter verschiedenen Bedingungen durchaus veränderlich ist, fallen diese Ergebnisse nicht zwingend so aus.

Nachdem für die "natürliche Übertragung durch den Vektor" festgestellt werden konnte, daß es zu keiner Beeinflussung der frühen Infektionsphase durch einen der begleitenden Faktoren kommt, wurden noch einige Untersuchungen auf zellulärer Ebene über die allererste Infektionsphase in der Haut vorgenommen.