

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Studiengebiete

#### 3.1.1 Favela Vicente Pinzón II

Die Studien wurden in Morro do Sandra's, einem Teilgebiet des Armenviertels Vicente Pinzón II in Fortaleza, der Hauptstadt des Staates Ceará im Nordosten Brasiliens sowie in dem Fischerdorf Balbino, ca. 60 km südlich von Fortaleza, an der Atlantikküste gelegen, durchgeführt.

Das Armenviertel (brasilianisch Favela) Morro do Sandra's liegt auf einer Sanddüne, nahe der Atlantikküste in einem Randbezirk der Millionenstadt (Abb. 3). In den fünfziger Jahren begannen Flüchtlinge aus dem Hinterland diese Düne zu besetzen und die ersten Häuser zu errichten. Heute hat Morro do Sandra's rund 1500 Einwohner. Tungiasis ist in dieser Favela hyperendemisch (Wilcke *et al.* 2002).

Sechzig Prozent der Bewohner haben ein monatliches familiäres Einkommen von weniger als zwei Mindestlöhnen (ein Mindestlohn entspricht etwa 60 €). Analphabetentum ist unter den Erwachsenen weit verbreitet (30%), die Arbeitslosenrate ist hoch und Verbrechen jeglicher Art gehören zum Alltag. Siebenundneunzig Prozent der Haushalte sind an das städtische Stromnetz angeschlossen, ungefähr sechzig Prozent der Gebäude haben Zugang zu fließendem Wasser (Family-Health-Program 1999). Die Häuser sind häufig improvisierte Konstruktionen aus einer Vielzahl von Materialien. Die wenigsten haben, ebenso wie die Wege und Straßen, einen zementierten oder anderweitig befestigten Boden. Die Abfallentsorgung wird durch die Stadt am Rande der Favela durchgeführt. Gleichwohl liegt im gesamten Gebiet Müll herum und die hygienischen Verhältnisse sind völlig unzureichend. Es besteht kein Anschluss an das öffentliche Abwassersystem.

Es gibt eine Vielzahl von streunenden Hunden und Katzen, viele Familien halten sich diese auch als Haustiere. Nagetiere sind in großer Anzahl vorhanden und Ratten (*Rattus rattus*) können sogar während des Tages beobachtet werden, wie sie in dem achtlos weggeworfenem Abfall außerhalb der Häuser nach Nahrung suchen.

### 3.1.2 Fischerdorf Balbino

Balbino (Gemeinde Cascavel) ist ein traditionelles Fischerdorf, typisch für den Nordosten Brasiliens. Es liegt direkt an der Atlantikküste südlich von Fortaleza (Abb. 4).

Die Haupteinnahmequelle der 620 Einwohner ist immer noch der Fischfang, aber in zunehmendem Maße gewinnt der Wochenendtourismus, genährt durch die nahe gelegene Hauptstadt, an Bedeutung.

Es herrschen ähnliche Lebensverhältnisse wie in der Favela. Die Bewohner sind arm, die Straßen in der Regel aus Lehm oder Sand. Fünfundsechzig Prozent der Häuser bestehen aus Ziegelsteinen oder verputzten Lehmsteinen, die restlichen Unterkünfte sind aus unverputztem Lehmstein oder aus mit Palmenblättern verschlossenen Holzgerüsten gefertigt. Die Fußböden der Häuser sind in der Regel befestigt, nur 8% bestehen aus Sand (Muehlen *et al.* 2003).

Die sozialen und familiären Strukturen sind hier gefestigter als in der Favela. Die Häuser sind geräumiger und stehen auf relativ großen Grundstücken. Die zahlreichen Müllbehälter der Gemeinde werden von den Einwohnern genutzt und zweimal wöchentlich durch städtische Mitarbeiter geleert. Es liegt nur wenig Müll herum, dafür ist aber der Anteil an Tieren deutlich höher. Neben den auch hier zahlreich vorkommenden Hunden und Katzen gibt es Esel, Pferde, Rinder und Schweine, die jedoch größtenteils in Pferchen gehalten werden.

Nahezu alle Häuser sind an das Stromnetz angeschlossen, die Wasserversorgung geschieht über öffentliche und private Brunnen, das Schmutzwasser wird in Sickergruben geleitet.



Abb. 3: Endemiegebiet Favela Vicente Pinzón II



Abb. 4: Endemiegebiet Fischerdorf Balbino



Abb. 5: Exposition von Wistarratten im Fischerdorf Balbino (Pfeil)



Abb. 6: Dokumentation des Sandflohbefalls von Wistarratten im Endemiegebiet Favela Vicente Pinzón II

### 3.2 Versuchstiere und Infektionsmodell

Für die Arbeit wurden männliche Wistarratten aus dem Tierlabor der pharmakologischen Abteilung der Bundesuniversität Ceará/ Fortaleza bezogen. Die Ratten hatten zu Beginn der Versuche ein Alter von durchschnittlich vier Wochen und ein Gewicht zwischen 180-200 g. Sie wurden in handelsüblichen Laborkäfigen (60x 45x 15 cm) aus Plastik auf Sägespänen gehalten, wobei die Käfige alle zwei Tage gereinigt und desinfiziert wurden.

Während der Exposition im endemischen Gebiet wurden die Ratten in Gitterkäfigen (60x 40x 25cm) gehalten, die so auf dem Boden platziert wurden, dass die Tiere in direktem Kontakt mit dem Sandboden waren (Abb. 5). Sowohl im Labor als auch im Expositionsgebiet wurden jeweils vier bis sechs Ratten in einem Käfig gehalten.

Nahrung (handelsübliches Hundefutter) und Wasser erhielten die Versuchstiere *ad libitum*.

Sie waren auch im Tierlabor ständig in einem nicht klimatisierten Raum. Dies bedeutete, dass die Tiere während des Untersuchungszeitraumes einer Lufttemperatur von ca. 27- 34° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60- 80% ausgesetzt waren. Die Ratten wurden zu keinem Zeitpunkt ungeschützt dem direkten Sonnenlicht exponiert.

Für die Platzierung der Käfige wurden Areale gewählt, die einen sandigen Boden hatten, im Schatten lagen und in deren Nachbarschaft die Einwohner häufig Tungiasis hatten.

Die klinische Untersuchung der exponierten Ratten fand in Abständen von 24 Stunden statt (Abb. 6). Um den Zeitpunkt der Penetration exakt feststellen zu können, wurden zusätzlich stündlich, auch nachts, Untersuchungen durchgeführt.

Dies geschah entweder direkt im Expositionsgebiet oder in einem zu diesem Zwecke entworfenen Käfigmodell. In diesem Modell wurde der Boden eines Laborkäfigs mit Sand bedeckt und die Gitteröffnung mit einem Baumwolltuch verschlossen, so dass sich die ca. 60 im Endemiegebiet gefangenen Flöhe nicht entfernen konnten. In einen solchen Käfig wurden dann drei bis vier Ratten gesetzt. Mit diesem Modell wurde eine höhere Infektionsrate erzielt als bei den Freilandversuchen und die Untersuchungen wurden logistisch einfacher.

Die Flöhe wurden von der Haut von Kindern und Erwachsenen sowie aus dem Fell von Hunden im Endemiegebiet gesammelt und in einem Glasbehälter, mit einem Baumwolltuch verschlossen, in das Tierlabor transportiert.

### 3.3 Klinische Untersuchungen

Die Ratten wurden am ganzen Körper, mit besonderem Augenmerk auf die Pfoten und den Schwanz, untersucht. Bei dem Verdacht eines penetrierten Flohes wurde die betreffende Stelle mit Wasser gereinigt und mit einer Lupe genauer betrachtet. Wenn die Ratten sich sehr unruhig zeigten, wurden sie zum Zwecke der besseren Untersuchungsmöglichkeit einer Äthernarkose zugeführt. Diese Narkose wurde in einem verschließbaren Glasgefäß, dem ein mit 50%igem Äther getränkter Wattebausch beigefügt wurde, durchgeführt. Die folgenden Eigenschaften einer Läsion wurden als typisches Merkmal einer Tungiasis gewertet:

Ein schwarzer Punkt in der Epidermis mit einem Durchmesser von 1-2 mm mit sichtbaren, posterioren Anteilen des Parasiten.

Eine Läsion, in der auf einem weißen Hintergrund (Durchmesser 3-10 mm) sich ein zentraler, dunkler Punkt, die posterioren Anteile des Flohes, abhob.

Eine zirkuläre, braun- schwarze Kruste mit oder ohne umgebende Nekrose (abgestorbener Floh). Zirkuläre Vertiefungen in der Epidermis, die die Form eines abgestorbenen und anschließend abgestoßenen Sandflohes erahnen ließen.

Der Zeitpunkt der Penetration, die Anzahl und die Lokalisation der Läsionen wurden notiert. Die Notizen wurden durch weitere Beobachtungen wie Erythem, Ödem, Superinfektion und Deformationen am betroffenen Glied ergänzt. Läsionen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einer Dental Eye II Kamera der Firma Yashica (Japan) fotografisch dokumentiert.

### 3.4 Histopathologische Untersuchungen

#### 3.4.1 Biopsien

Biopsien wurden zu festgelegten Zeitpunkten (3h, 6h, 8h, 12h, 18h, 1d, 2d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 12d, 15d, 16d, 17d, 18d, 20d, 21d, 28d) nach Penetration gefertigt. Dabei wurde für jeden Zeitpunkt eine Biopsie für die entomologische und eine für die pathologische Untersuchung entnommen.

Vor der Biopsieentnahme wurde bei den Ratten eine Äthernarkose durchgeführt (siehe oben). Anschließend wurde das Tier durch Frakturierung der Halswirbelsäule euthanasiert. Bei der Entnahme der Biopsien für die pathologische Untersuchung wurde mit Hilfe einer chirurgischen

Schere der Floh samt umliegenden Gewebe extirpiert. Für die entomologische Beurteilung wurde mit einer stumpfen Pinzette der Flohkörper aus dem Gewebe entnommen.

Lokalisation und Stadium der Läsionen wurde vor Biopsieentnahme schriftlich dokumentiert und mit der Dental Eye Kamera fotografiert.

Die Biopsien wurden für die pathologischen und entomologischen Versuche in Formaldehyd (10%) und für die rasterelektronenmikroskopischen in Glutaraldehyd (5%) überführt und gelagert.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden 21, für die Entomologie wurden 30 und für die Pathologie 31 Biopsien eingesetzt.

### **3.4.2 Histopathologie**

Die Biopsien, die zur Beurteilung der Gewebereaktion dienen sollten, wurden zur Aufarbeitung an die Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Antwerpen (Belgien) zu Professor Eric Van Marck geschickt. Hier wurden die Pfoten nach Standardverfahren aufgearbeitet und mit Hämotoxin-Eosin gefärbt. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte durch Professor Van Marck.

Insgesamt konnten 29 der 31 gesandten Biopsien ausgewertet werden.

## **3.5 Bestimmung der Infektionsparameter**

### **3.5.1 Serumgewinnung**

Die Ratten wurden nach Infektion zu jeder Blutentnahme in das Labor der pharmakologischen Abteilung der Bundesuniversität Ceará (UFC) in Fortaleza (Brasilien) gebracht. Dort wurden die Ratten, wie oben beschrieben, einer inhalativen Narkose zugeführt und anschließend auf dem Bauch liegend gelagert.

Vom medialen Rand der Augenhöhle wurde eine heparanisierte Pasteurpipette unter drehenden Bewegungen durch die Konjunktiven in die retroorbitale Vene eingeführt. Über die Pipette wurden 500 µl venöses Blut in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugierung mit 5000 U/min bei 5° C in der Zentrifuge 5804R der Firma Eppendorf (Deutschland).

Das Serum wurde in zwei Aliquots zu je 125 µl aufgeteilt und für einige Tage bei minus 20° C und anschließend bei minus 70° C gelagert. Es folgte der Transport der Seren auf Trockeneis in

die Laboratorien nach Berlin und Ribeirão Preto (s.u.), wo sie weiter bei minus 70° C gelagert wurden. So erhielt jedes Labor ein Aliquot aus demselben Experiment zur Zytokinbestimmung.

### 3.5.2 Bestimmung der Zytokine im Serum

Die Zytokine wurden im Labor der pharmakologischen Abteilung der Universität São Paulo in Ribeirão Preto (IL-1 $\beta$ , CINC-1, IL-10 und TNF- $\alpha$ ) sowie im Institut für Infektionsmedizin der Medizinischen Fakultät Charité/ Berlin (IL-4 und IFN- $\gamma$ ) mittels ELISA bestimmt.

Es wurden Mikrotiter Platten (Immunoplates, NUNC, Dänemark) mit 96 Vertiefungen eingesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden Lösungen und Substanzen der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Alle Mengenangaben beziehen sich, wenn nicht anders aufgeführt, auf eine Vertiefung.

#### **ELISA- Protokoll für IL-1 $\beta$ , CINC-1, IL-10 und TNF- $\alpha$ :**

50  $\mu$ l, mittels Immunaffinitätschromatographie gereinigte, polyklonale Antikörper vom Schaf plus 2  $\mu$ g/ml PBS Buffer wurden in jede Vertiefung gegeben und 24h bei 4° C inkubiert.

Die Antikörper für IL-1  $\beta$  und CINC-1 hatten eine Konzentration von 1 mg/ml, die von IL-10 von 0,50 mg/ml und die von TNF- $\alpha$  1,3 mg/ml.

Im Anschluss an die Inkubation wurde jede Vertiefung mit 100  $\mu$ l Waschpuffer viermal hintereinander gespült. Alle folgenden Waschvorgänge wurden nach diesem Schema und mit dieser Lösung durchgeführt.

Dann erfolgte die Zugabe und zweistündige Inkubation von BSA 1,00% (Sigma, London, England) gelöst in PBS, um unspezifische Reaktionen zu blockieren.

Wenn nicht anders erwähnt, fanden die folgenden Inkubationen bei Raumtemperatur statt.

In jede Vertiefung wurden 25  $\mu$ l unverdünntes Serum und 25  $\mu$ l PBS gegeben und für einen Zeitraum von 24h bei 4° C inkubiert.

Am Folgetag schloss sich an den Waschvorgang die Zugabe von 100  $\mu$ l biotinisierter Antikörper der Firma Peprotec (London, Großbritannien), plus 1,00% Schafserum gelöst in PBS, in jede Vertiefung an. Die Verdünnung der Antikörper gegen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  betrug 1:2000, die der Antikörper gegen IL-10 1:1000, und derer gegen CINC-1 1:500, jeweils gelöst in PBS.

Die Ausgangskonzentration war bei allen Antikörpern gleich (1,50 mg/ml).

Nach einstündiger Inkubation und anschließendem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Avidin Meerrettich Peroxidase (Avidin-HRP, Dako Ltd., England, Cat.No.P347), 1:5000 in PBS verdünnt, in jede Vertiefung. Auf eine fünfzehnminütige Inkubation folgte ein erneuter Waschgang und die Gabe von 50  $\mu$ l OPD (Orthophenyldiamine, Sigma)/ Vertiefung.

Die Inkubation des OPD fand im Dunkeln statt und wurde nach 20 Minuten durch die Zugabe von 100 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ Vertiefung beendet.

Die photometrische Bestimmung der Interleukinkonzentrationen wurde im Spectra Max 250<sup>®</sup> der Firma Molecular Devices (Sunnyvale, Kalifornien, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm vorgenommen. Die ersten 12 Vertiefungen einer jeden Platte wurden für die Erstellung einer Standardkurve genutzt. Die Konzentration des Referenzserums betrug bei IL-1β, TNF-α und IL-10 1 µg/ml, bei CINC-1 5 µg/ml. Die Proben für die Standardbestimmung wurden von 4 ng/ml (bei IL-1β, TNF-α und IL-10) bzw. 10 ng/ml (bei CINC-1) in der ersten Vertiefung bis zur elften Vertiefung jeweils um die Hälfte mit PBS verdünnt. Die letzte Vertiefung wurde als Negativkontrolle genutzt. Da die Standardkurve für eine Menge von 50 µl Serum ausgelegt war, wurden die Ergebnisse im Anschluss an die Messung mit zwei multipliziert.

### **ELISA Protokoll für IL- 4 und IFN-γ:**

Die Bestimmung fand unter Verwendung kommerzieller ELISA- Kits (rat IFN-γ optEIA, rat IL-4 optEIA; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) statt. Hierbei wurden die Platten über Nacht mit 100 µl des Antikörpers inkubiert. Anschließend fand ein Waschvorgang statt, ehe durch die Zugabe von BSA unspezifische Reaktionen geblockt und 100 µl der Serumproben hinzugegeben wurden. Nach zwei Stunden Einwirkzeit wurden 100 µl des sekundären Antikörpers hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklung der Proben fand durch Zugabe von 100 µl Avidin Meerrettich Peroxidase und Substrat statt. Die photometrische Bestimmung wurde bei 450/570 nm vorgenommen. Die Zytokinkonzentrationen wurden durch die Verwendung von Referenzkurven für rekombinierte Rattenzytokine bestimmt.

## **3.6 Morphologische Beschreibung**

### **3.6.1 Entomologische Methoden**

Die entomologischen Untersuchungen wurden im entomologischen Labor der Bundesuniversität von Minas Gerais (UFMG) in Belo Horizonte (Brasilien) durchgeführt.

Durch die entomologischen Untersuchungen sollte in erster Linie die Hypertrophie des Sandflohweibchens beschrieben und die Flohspezies bestimmt werden. Die Speziesidentifikation erfolgte nach definierten morphologischen Kriterien für *T. penetrans* (Linardi 2000). Das Ausmaß der Hypertrophie wurde durch die Beschreibung der morphologischen Veränderungen der Abdominalsegmente beschrieben.

Zusätzlich erfolgte die Beschreibung des Penetrationsvorganges an wenigen Stunden alten Läsionen. Einige Flohpräparate wurden mit einer feinen Kanüle seziert und unter der entomologischen Lupe betrachtet.

Die Bestimmung der entomologischen Charakteristika erfolgte durch Professor Pedro Linardi (Belo Horizonte).

Die frühen Läsionen wurden mit einem Fotomikroskop (Olympus SZ-PT, Tokio, Japan) fotografiert.

### **3.6.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde im Labor der Firma Eye of Science (Reutlingen, Deutschland) durchgeführt. Mit der REM sollte die Veränderung der Morphologie des Flohes während seiner Entwicklung gezeigt werden. Um die Proben dem für die Präparierung notwendigem Critical Point Drying (CPD) zuführen zu können, wurden die in Glutalaldehyd (5%) transportierten Proben einstündig in destilliertem Wasser gespült und anschließend durch die Zuführung von Äthanol entwässert.

Die Entwässerung wurde durch einstündige Inkubationen in Äthanollösungen erreicht, wobei in aufsteigenden Konzentrationen (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%) vorgegangen wurde. Der letzte Schritt wurde dabei dreimal wiederholt.

Das CPD wurde im Crytical Point Dryer der Firma Polaron (Uckfield, Großbritannien) durchgeführt.

Hierbei wurde das sich in den Zellen befindliche Äthanol schrittweise durch Kohlendioxid ersetzt. Dieser Prozess ist notwendig, weil dem Rasterelektronenmikroskop nur absolut trockene Proben zugeführt werden dürfen. Nach dem CPD befindet sich in den Zellen nur noch gasförmiges Kohlendioxid. Zur Befestigung der Biopsien auf dem Probenhalter wurde der Graphitkleber Leit- C<sup>®</sup> der Firma Plano (Marburg, Deutschland) verwendet.

Die anschließende Goldbeschichtung der Probe wurde in der Sem Coating Unit E 5100<sup>®</sup> der Firma Polaron (Uckfield, Großbritannien) vorgenommen.

Die Goldbeschichtung ist notwendig, um die elektrische Leitfähigkeit des Materials für die REM zu erhöhen.

Die rasterelektromikroskopischen Aufnahmen wurden in einem Amray 1610 Turbo (Amray Inc., Bedford, Massachusetts, USA) mit einer Beschleunigungsspannung von 14- 17 KV ausgeführt.

Genutzt wurden die Aufnahmen des Sekundärelektronendetektors, über dessen Bild zur besseren topographischen Darstellung der Flöhe digital die Bilder zweier Rückstrahlelektronendetektoren gelagert wurden.

### **3.7 Datenverwaltung und statistische Auswertung**

Die Daten der klinischen Untersuchung der Ratten wurden in die Statistikprogramme Epi Info (Version 6.04d, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) und SPSS (Version 9) eingegeben und mit diesen ausgewertet. Die Konzentrationen der Zytokine waren nicht normalverteilt und die Varianzen unterschieden sich deutlich voneinander, so dass der Median und der Interquartil Range benutzt wurden, um den Mittelwert und die Streuung der Daten darzustellen. Der Vergleich der Zytokinkonzentrationen fand mit dem Wilcoxon- Test für gepaarte Stichproben statt. Relative Häufigkeiten wurden mit dem Chi- Quadrat- Test verglichen. Statistische Signifikanz lag bei p- Werten  $< 0,05$  vor.

### **3.8 Ethik**

Das Studienprotokoll der vorliegenden Arbeit wurde von der zuständigen Ethikkommission der Bundesuniversität Ceará (UFC) in Fortaleza (Brasilien) am 6.8.2002 genehmigt.