

## 4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden im ersten Abschnitt (Kapitel 4.1) die Penetrationscharakteristika von *T. penetrans* bei der Wistarratte, im zweiten Abschnitt (Kapitel 4.2) der natürliche Krankheitsverlauf, die entomologische Entwicklung sowie die Pathologie und im dritten Abschnitt (Kapitel 4.3) die Immunreaktion beschrieben.

### 4.1 Experimentelle Infektion von Wistarratten mit *T. penetrans*

#### 4.1.1 Käfigmodell

Um herauszufinden, ob es möglich ist, Ratten unter Versuchsbedingungen mit *T. penetrans* zu infizieren, wurden ca. 60 lebend gefangene Sandflöhe in mit Baumwolltüchern verschlossenen Käfigen (Käfig A und B) platziert (Kapitel 3.2). In jedem Käfig wurden vier Ratten exponiert. In den Käfigen A und B hatten sich insgesamt sieben von acht exponierten Ratten (87,5%) innerhalb von 24 Stunden mit *T. penetrans* infiziert. Der Median der Läsionen pro Ratte betrug in beiden Käfigen 2 und die maximale Anzahl der Penetrationen pro Ratte 4 (Käfig A) bzw. 3 (Käfig B). Die Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Penetrationsraten von *T. penetrans* bei der Wistarratte im Käfigmodell

Käfig (Anzahl Ratten)	Anzahl infizierter Ratten n (%)	Expositions- Dauer (h)	Anzahl Läsionen (gesamt)	Anzahl Läsionen/ Ratte (Median)	Maximale Anzahl Läsionen/ Ratte
A (n = 4)	4/4 (100)	24	10	2	4
B (n = 4)	3/4 (75)	24	7	2	3

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Käfigen bezüglich der Anzahl der Läsionen insgesamt und der Läsionen pro Ratte festgestellt werden.

### 4.1.2 Feldversuch

In dem Fischerdorf Balbino wurden sechs Gitterkäfige an sechs unterschiedlichen Standorten mit jeweils durchschnittlich fünf Ratten aufgestellt. Die Beschreibungen der Käfiglokalisationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Beschreibung der Käfigstandorte im Fischerdorf Balbino

Käfig	Standort	Boden- beschaffenheit	Anzahl Personen/ Haushalt	Art der Tiere/ Haushalt	Organisches Material	Sonnen- einstrahlung
1	Unter Mangobaum	tiefer Sand	7	Hund, Katzen, Hühner	wenig	Halb- schatten
2	Haus- schatten	tiefer Sand	6	Katze, Hühner	mittel	Schatten
3	Offene Küche hinter Haus	flacher Sand	6	Katze, Hühner	viel	Schatten
4	Haus	flacher Sand	keine	keine	wenig	Schatten
5	Hinter Wohnhaus	tiefer Sand	5	nachts Hunde, Hühner	mittel	Schatten
6	Küche (innerhalb)	flacher Sand	10	Katze, Hühner	viel	Schatten

Nach zwei Wochen wurden die Ratten aus den Käfigen entnommen und die Anzahl der Läsionen dokumentiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Penetrationsraten von *T. penetrans* bei der Wistarratte im Feldversuch

Käfig	Anzahl Ratten (n)	Anzahl der infizierten Ratten	Anzahl der Läsionen (pro Käfig)	Läsionen/ Ratte (Median)	Minimale/Maximale Anzahl der Läsionen/ Ratte
1	6	5/6 (83,3%)	11	2	0/3
2	5	2/5 (40%)	2	0	0/1
3	5	4/5 (80%)	11	1	0/7
4	5	0/5 (0%)	0	0	0/0
5	5	5/5 (100%)	48	7	4/17
6	4	0/4 (0%)	0	0	0/0

53,3% der ausgesetzten Ratten hatten sich mit *T. penetrans* infiziert. Die Penetrationsrate in den einzelnen Käfigen schwankte erheblich. Die Anzahl der Penetrationen pro infizierter Ratte lag zwischen einer und siebzehn Läsionen. Es war weiterhin eine Abhängigkeit der relativen Häufigkeit infizierter Ratten von dem Standort der Käfige auszumachen: Während es innerhalb eines Hauses (Standort 4 und 6) zu keiner und direkt am Haus (Standort 2) lediglich zu zwei erfolgreichen Penetrationen kam, wurden in den Käfigen, die im Freien platziert waren (Käfig 1 und 3) jeweils 11 und im Käfig 5 sogar 48 penetrierte Sandflöhe im Wirtstier gezählt (s. Abb. 7,  $p < 0,01$ ):

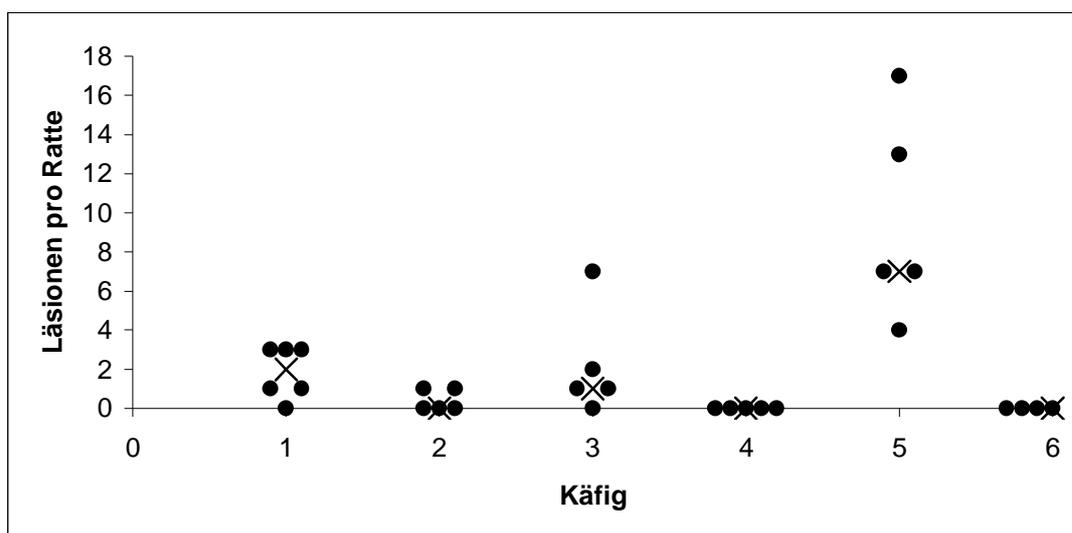


Abb. 7: Darstellung der Anzahl der *T. penetrans* Läsionen pro Wistarratte in Abhängigkeit von den Käfigstandorten (die Kreuze stellen den Median dar, die Charakteristika der Käfigstandorte sind in Tabelle 3 beschrieben)

Bezogen auf alle beobachteten Tiere unterschieden sich auch die Anzahl der Läsionen pro Ratte ( $p < 0,01$ ) und die maximale Anzahl der Läsionen pro Ratte ( $p < 0,01$ ) in den beiden Standorten signifikant voneinander.

## 4.2 Natürlicher Krankheitsverlauf

### 4.2.1 Verteilung und Topographie der Penetrationen

Um den natürlichen Krankheitsverlauf der Tungiasis und die Penetrationslokalisationen bei der Ratte beschreiben zu können, wurden 141 Läsionen an 59 Ratten in einem Zeitraum von vier Monaten beobachtet und schriftlich sowie fotografisch dokumentiert. Die Mehrzahl dieser Läsionen mit 56,7% (80/141) wurden an Tieren beobachtet, die in Balbino exponiert waren, die restlichen 43,3% (61/141) an Ratten, die sich in der Favela Vicente Pinzón II infiziert hatten.

Von diesen Penetrationen fanden 140 an einer der vier Extremitäten der Ratte statt. Nur ein Mal war eine andere Körperregion, nämlich der Schwanz der Ratte, betroffen. Zu 85,1% (120/141) fanden die Penetrationen an einer Stelle statt, an der sich noch keine Läsion befand, nur in 14,9% (21/141) der Fälle kam es zu einer lokalen Kumulation (Clusterbildung).

Bezogen auf die Extremitäten kam es zu folgender topographischer Verteilung der Penetrationen (Tabelle 5): 50,7% (71/140) der Flöhe penetrierten in die hintere rechte und 38,6% (54/140) in die hintere linke Extremität, während an den vorderen Gliedmaßen links 5,7% (8/140) und rechts 5,0% (7/140) der Flöhe penetrierten. Diese Verteilung zeigt eine eindeutige Bevorzugung der hinteren Extremitäten durch *T. penetrans* ( $p < 0,01$ ). Zwischen den beiden Endemiegebieten traten bezüglich dieser Penetrationscharakteristika keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 5: Penetrationslokalisationen von *T. penetrans* bei der Wistarratte

Extremität	Anzahl der Läsionen Favela (in %)	Anzahl der Läsionen Balbino (in %)	Anzahl der Läsionen beide Orte (in %)
Vorne links	5 (8,3)	3 (3,8)	8 (5,7)
Vorne rechts	4 (6,7)	3 (3,8)	7 (5,0)
Summe vorne	9 (15,0)	6 (7,5)	15 (10,7)
Hinten links	22 (36,7)	32 (40,0)	54 (38,6)
Hinten rechts	29 (48,3)	42 (52,5)	71 (50,7)
Summe hinten	51 (85,0)	74 (92,5)	125 (89,3)
Summe gesamt	60	80	140

Die topographische Verteilung der Penetrationslokalisationen an den einzelnen Extremitäten ist in Tabelle 6 dargestellt. Die einzelnen Phalangen und der Ballen waren ähnlich häufig betroffen. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der in Balbino und der in der Favela exponierten Gruppe.

Tabelle 6: Topographische Verteilung der Penetrationslokalisationen von *T. penetrans* an der Extremität der Wistarratte

Region der Extremität	Anzahl Penetrationen Favela (Anteil in der Favela %)	Anzahl Penetrationen Balbino (Anteil in Balbino %)	beide Orte (Anteil Gesamt %)
1. Phalanx	10 (16,7)	21 (26,3)	31 (22,1)
2. Phalanx	4 (6,7)	3 (3,8)	7 (5,0)
3. Phalanx	7 (11,7)	1 (1,3)	8 (5,8)
4. Phalanx	6 (10,0)	12 (5,0)	18 (12,9)
5. Phalanx	10 (16,7)	18 (22,3)	28 (20,0)
Ballen	23 (38,4)	25 (31,3)	48 (34,3)
Summe	60	80	140

#### 4.2.2 Beziehung zwischen Klinik, Pathologie und morphologische Beschreibung im direkten Vergleich

Der Krankheitsverlauf wurde anhand des klinischen Befundes, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, dokumentiert. Das histopathologische und entomologische Bild wurde exemplarisch an jeweils einer Biopsie für jeden der 16 Untersuchungszeitpunkte beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 detailliert zusammengefasst, die wichtigsten Befunde am Ende dieses Kapitels fotografisch dargestellt.

Nachdem der Parasit eine geeignete Lokalisation am Körper des Wirtes gefunden hatte, begann er mit den kranialen Anteilen voran in die Epidermis zu penetrieren. Bereits drei Stunden nach Beginn des Penetrationsvorganges war eine leichte Schwellung der vorderen Abdominalsegmente zu beobachten (Abb. 17 und 40). Diese Schwellung beinhaltete in der Regel die ersten vier Abdominalsegmente und wird als Neosom bezeichnet. Das Eindringen in die Epidermis begann in einem Winkel von etwa  $45^\circ$  (Abb. 16), anschließend richtete der Floh sich auf und erreichte vor Ende der eigentlichen Penetration eine rechtwinklige Stellung im Bezug auf die Hautoberfläche (Abb. 18 bis 20). Nach Abschluss der Penetration -12 Stunden nach Beginn des Penetrationsvorganges- überragten die letzten drei bis vier Abdominalsegmente die Hautoberfläche (Abb. 22). Jetzt befand der Flohkörper sich nahezu komplett intraepidermal. Um den penetrierten Floh hatte sich ein leichtes Erythem gebildet. Die Schwellung der ersten Abdominalsegmente nahm deutlich zu, allerdings ließen sich innerhalb der ersten zwei Tage noch keine Eier im Flohkorpus darstellen. Unterhalb der Basalmembran ließ sich zu diesem Zeitpunkt ein granulozytäres Infiltrat nachweisen (Abb. 58, 58a, 58b und 59). Am fünften Tag hatte sich das Infiltrat verstärkt und es kam zu einer Zerstörung der Basalmembran (Abb. 62 und 64). Dies war auch der Moment an dem die ersten Eier, die nach drei Tagen im Neosom schon als Vorstufen nachzuweisen waren, vom Parasit ausgeschieden wurden.

Bei der anschließenden Entwicklung hob sich der Floh mit seinen kaudalen Anteilen deutlich über das Hautniveau hinaus. Intestinale Bewegungen ließen sich durch -zumeist radiär angeordnete- schwarze Streifen erkennen (Abb. 30). Es begann die Ausscheidung von Faeces (Abb. 27).

Die Ratte entlastete die betroffene Extremität zunehmend und reagierte auf Berührung mit einer Abwehrbewegung. Das deutlich ausgebildete Erythem und Ödem fand ihr Korrelat in einer von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten geprägten dermalen Entzündungsreaktion (Abb. 30 und 68).

Um den zehnten Tag nach Penetration begann der neosomale Anteil des Parasiten die kaudalen Flohanteile zu überragen, so dass sich eine zentrokonkave, peripher konvexe Formation darstellte (Abb. 31).

In den folgenden Tagen kam es zu einer weiteren Größenzunahme der ersten vier Abdominalsegmente, einer Flüssigkeitsekretion und regelmäßiger Eiabgabe. Parallel dazu waren klinische und histopathologische Entzündungszeichen wie Erythem, Ödem, Schmerzäußerungen und ein zunehmendes granulozytäres Infiltrat zu beobachten.

Mit der Entwicklung der Läsion begann die umgebende Haut nekrotisch zu werden. Abnehmende intestinale Bewegungen, eine bräunliche Verfärbung des Parasiten sowie eine Reduktion der Ei- und Flüssigkeitsabgabe ließen einen Vitalitätsverlust erkennen (Abb. 32 linke Läsion). Die Histologie zeigte zu diesem Zeitpunkt weiterhin das Bild einer akuten Entzündungsreaktion. In den folgenden Tagen nahm das Volumen des Parasiten ab und es mehrten sich dunkle, nekrotisch aussehende Anteile (Abb. 33 und 34 linke Läsion).

Die Involution wurde von einer Schrumpfung und weiteren Dunkelfärbung des Flohkörpers begleitet, bis sich schließlich der Parasit völlig schwarz verfärbt hatte und alle Vitalitätszeichen fehlten (Abb. 34 rechte Läsion und Abb. 35). In der Umgebung der Läsion bestanden weiterhin klinische Entzündungszeichen. Das Infiltrat hatte eine Veränderung zugunsten einer chronischen Charakterisierung erfahren, es waren jetzt vornehmlich Lymphozyten und Plasmazellen vorhanden (Abb. 73a und Abb. 73b). Bevor der Floh aus dem Gewebe herausfiel, war er in der Regel erheblich deformiert (Abb. 56) und in der Umgebung waren die Entzündungszeichen zurückgegangen (Abb. 36). Nach der Ablösung aus der Wirtshaut blieb ein kraterförmiger, epithelialer Defekt, unter dem sich die Basalmembran wieder geschlossen hatte (Abb. 73). Als Hinweis auf die Infektion zeigten sich in der Dermis Reste des Chitinskeletts, die von Fremdkörperriesenzellen umgeben wurden (Abb. 74).

Tabelle 7 fasst die klinischen, histopathologischen und entomologischen Beobachtungen zusammen.

Tabelle 7: Zusammenfassung des klinischen, histopathologischen und entomologischen Merkmale der Tungiasis bei der Wistarratte

Zeit nach Beginn Penetration	Parasit	Klinik	Histopathologie
3-4 h	Der Kopf ist mit den Schneidewerkzeugen in das Stratum corneum eingedrungen (Abb.16), die Beine strecken sich entlang der Körperachse nach hinten. Die Größenzunahme der Abdominalsegmente beginnt (Abb. 17, 39 und 40)	Nachdem der Floh sich einen geeigneten Platz zum Penetrieren gesucht hat, dringt er in einem Winkel von ca. 45 Grad in die Haut ein (Abb. 16). Gelegentlich tritt ein leichtes Erythem auf (Abb. 15)	Parasit liegt intraepidermal keine histopathologischen Veränderungen
6-7 h	Kopf und Thoraxanteile sind penetriert, die kranialen Abdominalsegmente sind leicht vergrößert (Abb. 41)	Penetration schreitet fort in einem Winkel von 45-90°, geringgradiges Erythem (Abb. 18 und 19)	keine histopathologischen Veränderungen, Parasit liegt intraepidermal
8-9 h	Kopf, Thorax und die ersten vier Abdominalsegmente sind penetriert und nehmen weiter an Größe zu (Abb.42)	Penetrationsstellung ca.90°, geringgradiges Erythem (Abb. 20)	Parasit liegt intraepidermal keine histopathologischen Veränderungen
11-12 h	Kopf, Thorax und die ersten sechs Abdominalsegmente sind penetriert, die ersten vier Abdominalsegmente nehmen weiter an Größe zu (Abb.43 und 44)	Floh hat Penetration weitgehend abgeschlossen, die kaudalen Anteile überragen die Hautoberfläche (Abb.22), Erythem	Parasit liegt intraepidermal keine histopathologischen Veränderungen (Abb. 57)
18 h	Kopf, Thorax und die ersten sechs Abdominalsegmente sind penetriert, die ersten vier Abdominalsegmente nehmen weiter an Größe zu (Abb. 45)	Penetration abgeschlossen, Erythem (Abb. 23)	Parasit liegt intraepidermal keine histopathologischen Veränderungen
24 h	Floh bis auf die letzten drei bis vier Abdominalsegmente penetriert, die ersten vier Abdominalsegmente sind hypertrophiert (Abb.46)	Penetration abgeschlossen (Abb. 25 und 47), deutliches Erythem	Parasit liegt intraepidermal keine histopathologischen Veränderungen
2 d	Die ersten vier Abdominalsegmente hypertrophiert (Abb. 48), im LM keine Eier im Floh nachweisbar	In der hellen, dünnen Haut des Rattenfußes ist der Penetrationsort durch einen zentralen dunklen Punkt gekennzeichnet. Diesen Punkt umgibt ein weißlicher Saum sowie ein deutliches Erythem. Das Tier reagiert auf lokalen Druck mit Abwehrbewegungen (Abb. 26)	Parasit intraepidermal Granulozytäres Infiltrat, Basalmembran intakt (Abb.58, 58a, 58b und 59)

3 d	Floh vollständig penetriert, Größenzunahme des Neosoms (Abb. 49), im LM unreife Eivorstufen	Runder, dunkler Fleck mit umgebendem weißen Hof, Erythem, Ödem (Abb. 26), Schmerzäußerungen	Parasit intraepidermal Granulozytäres Infiltrat, Basalmembran intakt (Abb.60, 60a, 60b und 61)
4- 5 d	Größenzunahme des Neosoms, die distalen Segmente schieben sich teleskopartig zusammen und bilden die kaudale Konusformation. Im LM 80 reife Eier im Neosom In Abb. 50 sind Anteile der Mundwerkzeuge des Flohes dargestellt	Zentraler dunkler Konus mit weißem Hof (Abb. 28), Pulsationsphänomen , Fäkalbänder (Abb. 27), Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerungen	Parasit liegt intradermal Granulozytäres Infiltrat, Basalmembran durchbrochen, beginnende Neovaskularisation (Abb. 64).
7 d	Größenzunahme des Neosoms, kaudal deutlicher Konus	Zentraler dunkler Konus, weiß- brauner Hof (Ø 10 mm, Abb. 29), Flüssigkeitssekretion, Pulsationsphänomen, Fäkalbänder, Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerungen	Parasit intradermal, ausgeprägtes granulozytäres Infiltrat (eosinophile und neutrophile Granulozyten) in der Dermis (Abb. 66), das Infiltrat reicht bis in die Nähe des Knochens (Abb. 65).
9 d	weitere Größenzunahme des Neosoms, welches die kaudale Konusformation überragt.	Zentronkaver kaudaler Anteil, Pulsationsphänomen, Flüssigkeitssekretion Fäkalbänder, Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerung (Abb. 30)	Bild einer akuten und chronischen Entzündung mit granulozytären und lymphozytären Zellen sowie Riesenzellen in der Dermis, Basalmembran ist durchbrochen (Abb. 67 und 68).
11-12 d	deutlich ausgeprägtes Neosom (Abb.52), es ist eine kaudale Konusformation vorhanden.	Bräunliche Verfärbung der Läsion mit begleitender konkaver Verformung, Flüssigkeitssekretion, Pulsationsphänomen, Fäkalbänder, Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerung (Abb. 31)	Parasit intradermal, dermales Infiltrat aus Granulozyten und Lymphozyten
15-16 d	Das Neosom hat weiter an Größe zugenommen.	braun- schwarze Verfärbung der Läsion (Abb. 32 links, Abb. 33), Pulsationsphänomen, Fäkalbänder, Flüssigkeitssekretion Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerung.	Epidermale und dermale Infiltrationen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, (Abb. 69 und 70), die bis in die Nähe des Knochens reichen (Abb. 71). Hyper- und Parakeratose, dermale Fibrosierung (Abb. 72)
17-19 d	Großes, mit Eiern gefülltes Neosom, welches die kaudalen Abdominalsegmente invaginiert (Abb.53 und 54)	braun- schwarze Verfärbung der Läsion, Konsistenverlust(Abb.34 links), Flüssigkeits-Sekretion Pulsationsphänomen, Fäkalbänder, Eiabgabe, Erythem, Ödem, Schmerzäußerung	Epidermale und dermale Entzündung mit granulozytärem Zellmuster (v.a. neutrophile und eosinophile Granulozyten)
20-21 d	Abgestorbener, geschrumpfter Parasit	Nekrose, umgeben von einem Ödem und Erythem (Abb. 34 rechts und Abb. 35)	Reste des Chitinskeletts, Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen, Histiocyten Mastzellen in der Dermis

---

28- 30 d	Kein Sandfloh mehr vorhanden	Kraterförmiger epidermaler Defekt ohne makroskopisch sichtbare Entzündungszeichen (Abb. 38)	Reste des Chitinskeletts, Fremdörperriesenzellen, Hyperkeratose (Abb. 73, 73a, 73b und 74)
----------	---------------------------------	---	---

---

LM= Lichtmikroskop

### 4.2.3 Stadieneinteilung analog der Fortaleza- Klassifikation

Analog der Fortaleza- Klassifikation (s. Kapitel 2.4) wurde die Dauer der einzelnen Stadien nach klinischen Gesichtspunkten festgelegt. Für diesen Versuch wurden 141 Läsionen an 59 Ratten schriftlich und fotografisch festgehalten (s. Tabelle 8). Die Anzahl der Ratten und damit der beobachteten Läsionen nahm mit der Fortdauer der Beobachtung ab. Zum einen wurden die Parasiten von den Ratten durch Nagen und Kratzen aus der Haut entfernt, zum anderen verstarben die Ratten während der Versuchsperiode oder wurden zwecks Biopsieentnahme euthanasiert.

Das Stadium I, das Penetrationsstadium war in allen 141 beobachteten Fällen nach 24 Stunden abgeschlossen.

Das Stadium II, welches durch einen braun-schwarzen Punkt (Durchmesser von 0,5-2 mm), umgeben von einem roten Erythem charakterisiert ist, wurde bei 68 Läsionen beobachtet und dauerte im Median 1 Tag (min. 1 Tag, max. 3 Tage).

Das Stadium III dauerte im Median 12 Tage (min. 11 Tage, max. 19 Tage). Das Stadium IIIa konnte bei 50 Läsionen ausgewertet werden und dauerte im Median 5 Tage (min. 3 Tage, max. 9 Tage). Das Stadium IIIb konnte bei 27 Läsionen dokumentiert werden und dauerte im Median 7 Tage (min. 5 Tage, max. 13 Tage).

Stadium IV konnte nur bei 7 (IVa), respektive 5 (IVb) Läsionen vollständig beobachtet werden und hatte eine Dauer von 14 Tagen im Median (min. 11 Tage, max. 17 Tage), wovon das Stadium IVa im Median 6 Tage (min. 4 Tage, max. 9 Tage) und das Stadium IVb 8 Tage (min. 5 Tage, max. 9 Tage) lang zu beobachten war.

Ohne das Stadium V der Fortaleza- Klassifikation, welches die Veränderung an der Haut des Wirtes nach Eliminierung des Parasiten beschreibt, ergibt sich von der Penetration bis zur Ablösung des toten Flohes aus dem Wirtsgewebe im Median eine Dauer von 28 Tagen (min. 22 Tage, max. 32 Tage).

Tabelle 8: Vergleichende Übersicht der Stadieneinteilung und des Zeitverlaufes der Tungiasis bei der Wistarratte und beim Menschen

Stadium	Dauer (Tage) der Stadien beim Menschen nach Beginn der Penetration	Dauer (Tage) der Stadien bei der Wistarratte nach Beginn der Penetration	Dauer (Tage) bei der Wistarratte nach Beginn der Penetration (Median)	Anzahl ausgewerteter Läsionen Wistarratte
I	3- 7 h	1 *	1	141
II	1- 2	2- 4	2	68
IIIa	2- 6	6- 12	7	50
IIIb	6- 21	11- 21	14	27
IVa	21- 28	17- 24	20	7
IVb	28- 35	24- 32	28	5

\* das Stadium I war in allen beobachteten Fällen nach 24 h abgeschlossen

### 4.3 Zytokinkonzentrationen in experimentell mit *T. penetrans* infizierten Wistarratten

#### 4.3.1 Zytokinkonzentrationen im Serum während des natürlichen Krankheitsverlaufes

Um herauszufinden, ob es bei mit *T. penetrans* infizierten Wistarratten zu einer Änderung der Serumkonzentration wichtiger Zytokine kommt, wurden vor Penetration, sowie zu bestimmten Zeitpunkten nach Penetration, die Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CINC, IL-4 und IL-10 bestimmt (vgl. Kapitel 3.5.2).

Da die Konzentrationen keiner Normalverteilung folgten und die Varianzen erheblich differierten, wurden der Median und der Interquartilabstand (IQR) als Mittelwert und Maß für die Streuung gewählt. Wegen der kleinen Stichprobenzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Kinetik der einzelnen Zytokine wurde in den Abbildungen 8- 13 dargestellt, die entsprechenden Legenden folgen im direkten Anschluss.

Die TNF- $\alpha$  Konzentration begann am sechsten Tag nach der Penetration des Flohes anzusteigen, erreichte nach zehn bis dreizehn Tagen ihren Höhepunkt und sank bis zum 20. Tag auf Werte im

Bereich der Ausgangskonzentration (Abb. 8). Am Tag 10 war die TNF- $\alpha$ - Konzentration fünfmal so hoch wie vor der Infektion.

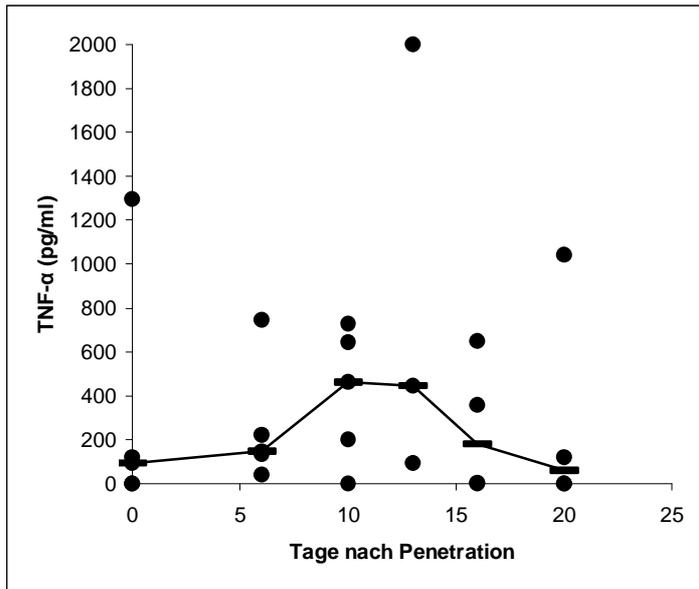


Abb. 8: Zeitverlauf der Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Der Konzentrationsverlauf von IL-1 $\beta$  zeigte eine ähnliche Kinetik wie TNF- $\alpha$  (Abb. 9), die Konzentration stieg bis zum 13. Tag hier um das Vierfache.

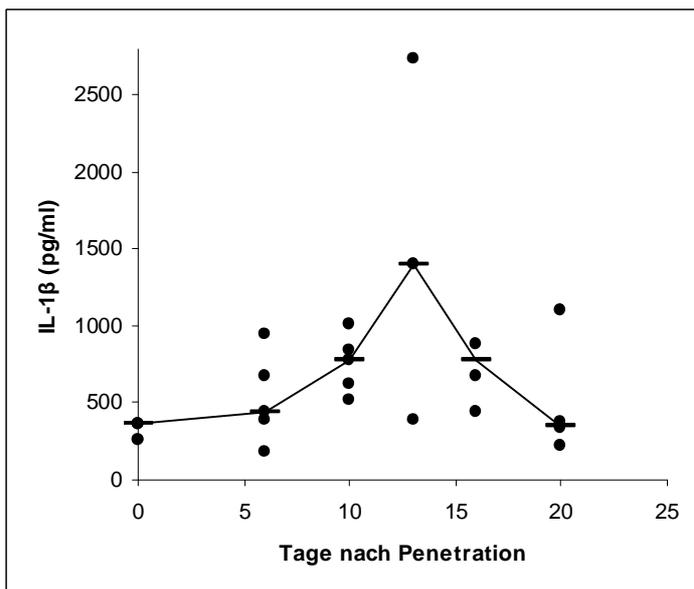


Abb. 9: Zeitverlauf der Serumkonzentration von IL-1 $\beta$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Im Gegensatz hierzu zeigte die Konzentration von IFN- $\gamma$  (Abb. 10) eine Abnahme der initialen Konzentration.

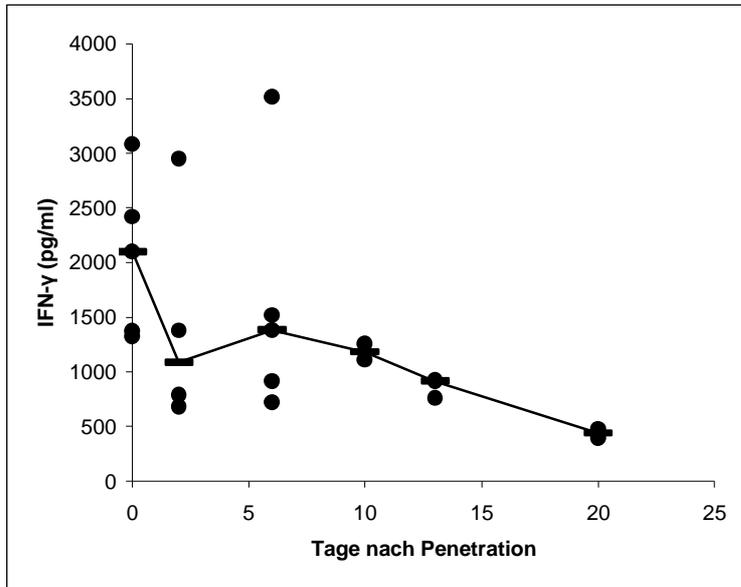


Abb. 10: Zeitverlauf der Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Die Kinetik von CINC zeigte starke Schwankungen mit einer Tendenz zu einer Konzentrationsabnahme über die Zeit (Abb. 11).

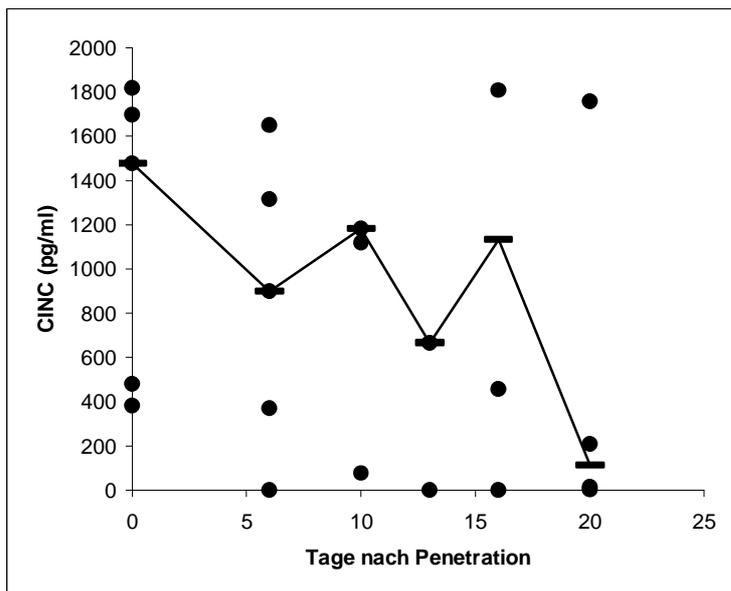


Abb. 11: Zeitverlauf der Serumkonzentration von CINC (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

IL-4 stieg bereits am zweiten Tag nach Penetration um nahezu das Dreifache der medianen Ausgangskonzentrationen, um dann zwischen dem 10. Tag und dem 20. Tag den Ausgangswert wieder zu erreichen (Abb. 12).

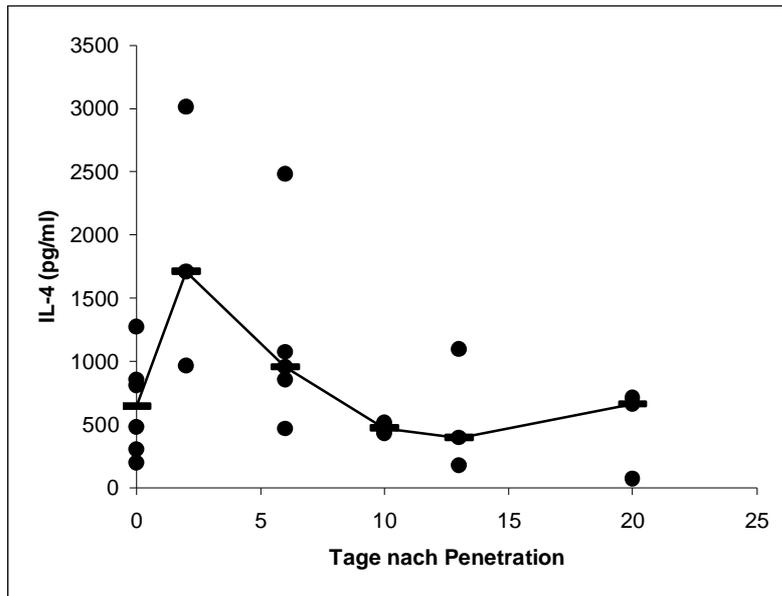


Abb. 12: Zeitverlauf der Serumkonzentration von IL-4 (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

IL-10 wies einen Anstieg zwischen dem 6. und dem 10. Tag auf, danach kam es zu einem langsamen Konzentrationsabfall und am 16. Tag nach Infektionsbeginn wurden die initialen Werte wieder erreicht (Abb. 13).

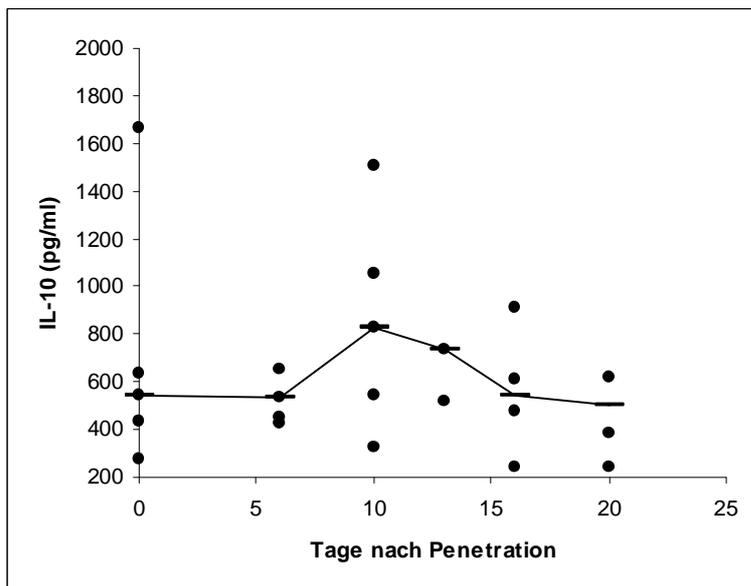


Abb. 13: Zeitverlauf der Serumkonzentration von IL-10 (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Im Folgenden sind die Legenden zu den Abbildungen 8-13 dargestellt:

Zu Abb.8: Verlauf der Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	6	10	13	16	20
1	120	746	730		6	0
2	0	148	462		0	0
3	94	222	644	2000	648	1042
4	1296	42	0	446		
5	0	136	200	94	358	122
Median	94	148	462	446	182	61

Zu Abb.9: Verlauf der Serumkonzentrationen von IL-1 $\beta$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	6	10	13	16	20
1		672	514		678	336
2		446	776		4226	370
3	258	952	838	1398	876	1098
4	360	176	620	2738		
5	358	384	1010	394	446	220
Median	360	446	776	1398	777	353

Zu Abb.10: Verlauf der Serumkonzentrationen von IFN- $\gamma$  (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	2	6	10	13	20
1	3078		3512			
2	2417	2948	1516			
3	2099	1378	1380		926	
4	1373	790	913	1257	913	479
5	1322	680	719	1108	758	395
Median	2099	1084	1380	1182,5	913	437

Zu Abb.11: Verlauf der Serumkonzentrationen von CINC (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	6	10	13	16	20
1	382	1316	5270		1808	14
2	1476	898	76		456	210
3	1818	370	1182	666	3294	1758
4	1698	1648	5002	9080		
5	480	0	1118	0	0	2
Median	1476	898	1182	666	1132	112

Zu Abb12: Verlauf der Serumkonzentrationen von IL-4 (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	2	6	10	13	20
1	200	965	466	512	175	71
2	855		2482			
3	810		1075			
4	479	3013	956		1095	712
5	304	1711	855	428	395	662
6	1270					
Median	644,5	1711	956	470	395	662

Zu Abb.13: Verlauf der Serumkonzentrationen von IL-10 (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

Ratte/d	0	6	10	13	16	20
1	438	2880	1058		476	622
2	278	536	546		240	384
3	540	450	1508	740	912	2596
4	1664	654	826	5474		
5	632	428	326	514	610	240
Median	540	536	826	740	543	503

Um zu sehen, ob sich das Verhältnis von proinflammatorischen zu antiinflammatorischen Zytokinen im Verlauf der Infektion veränderte, wurde in einem weiteren Versuch, dessen Aufbau dem vorangegangenen Versuch entsprach, die Quotienten der Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  zu IL-10, respektive von TNF- $\alpha$  zu CINC bestimmt (Abb. 14). Es wurde deutlich, dass die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  zunahm (bzw. die des antiinflammatorischen IL-10 abnahm) als der Floh sich in der hypertrophen Phase befand und sich das Verhältnis umkehrte, als die Läsion sich zurückzubilden begann. Im Gegensatz hierzu blieb der Quotient der proinflammatorischen Moleküle von TNF- $\alpha$  zu CINC unverändert.

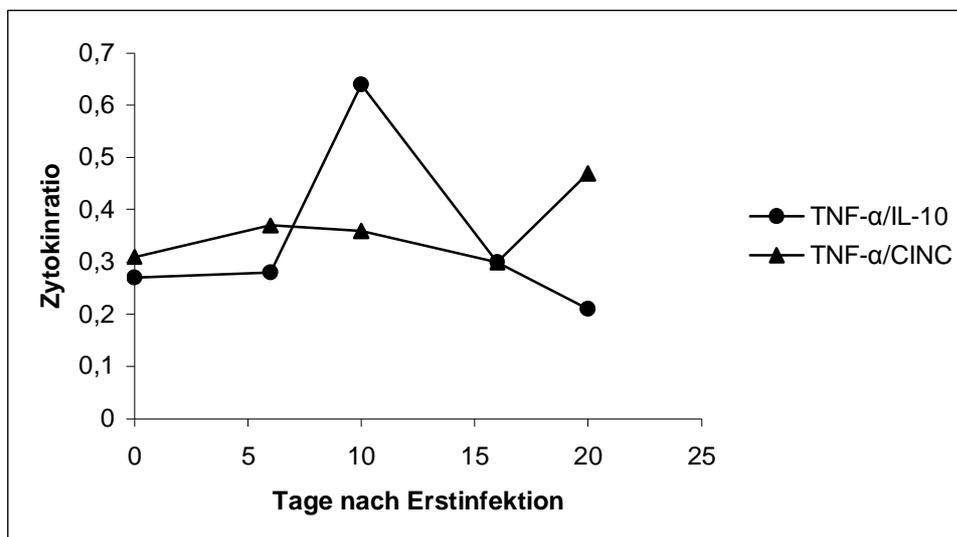


Abb. 14: Der Quotient der Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-10 respektive von TNF- $\alpha$  und CINC in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans*

In Tabelle 9 sind die der Zytokinratio zugrunde liegenden Serumkonzentrationen aufgeführt. Die entsprechenden Quotienten der Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  zu IL-10, respektive von TNF- $\alpha$  zu CINC sind in Tabelle 10 dargestellt:

Tabelle 9: Die, der Zytokinratio zugrunde liegenden Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-10 und CINC (pg/ml) in Wistarratten nach Infektion mit *T. penetrans* (es ist der Median dargestellt).

Interleukin/Tag	0	6	10	16	20
TNF- $\alpha$ (pg/ml) (n=5)	103	143	474	172	48
IL-10 (pg/ml) (n=5)	382	511	741	565	234
CINC (pg/ml) (n=5)	337	550	1316	571	102

Tabelle 10: Zytokinratio von TNF- $\alpha$  und IL-10, respektive TNF- $\alpha$  und CINC, bei der Tungiasis der Wistarratte während des natürlichen Krankheitsverlaufes

Interleukin- Quotient/ Tag	0	6	10	16	20
TNF- $\alpha$ / IL-10	0,27	0,28	0,64	0,30	0,21
TNF- $\alpha$ / CINC	0,31	0,37	0,36	0,30	0,47

#### 4.3.2 Zytokinkonzentrationen im Serum nach Silikonölapplikation

Bei sechs Wistarratten wurde im Abstand von sechs Stunden jeweils ein Tropfen niedrigvisköses Silikonöl auf Läsionen mit einem Alter von einem Tag bis zu sechs Tagen appliziert.

Makroskopisch resultierte dies in einer bräunlichen Verfärbung und einer Schrumpfung des Parasiten innerhalb der nächsten drei Tage als Hinweis darauf, dass die normale Entwicklung des Parasiten unterbrochen war. Dieser Prozess wurde von einem Zytokinmuster begleitet, das sich im Vergleich zum Zytokinmuster von den Tieren, bei denen keine Behandlung stattfand zu unterscheiden scheint (Tabelle 11). Als Kontrolle dienten die Ergebnisse des in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Versuches.

Tabelle 11: Veränderung der Zytokinkonzentrationen bei unbehandelten, mit *T. penetrans* infizierten Wistarratten, im Vergleich zu Wistarratten, die mit Silikonöl behandelt wurden (es ist jeweils der Median dargestellt)

Zytokin (pg/ml)	Keine Therapie			Therapie		
	Tag 0	Tag 13	Quotient*	Tag 0	Tag 13	Quotient*
TNF- $\alpha$	94	446	4.74	127	5	0.04
IL-1 $\beta$	360	1398	3.88	346	336	0.97
CINC	1476	666	0.45	898	536	0.60
IL-10	540	740	1.37	336	226	0.67

\* Konzentration Tag 13/ Konzentration Tag 0

Am Tag 0 ähnelten sich die Zytokinkonzentrationen beider Gruppen, während der Anstieg von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 dreizehn Tage nach Penetration bei unbehandelten Tieren im Kontrast zu dem Abfall dieser Werte bei den mit Silikonöl behandelten Wistarratten zu stehen schien.

Zusammenstellung der Abb. 15 bis 74 (in Klammern das Stadium nach Fortaleza- Klassifikation; die Zeitangabe bezieht sich auf den Penetrationsbeginn)



Abb. 15 (I, 3h): Ballen unterhalb der zweiten Zehe, Penetration (Pfeil, 4x).



Abb. 16 (I, 3h): Ballen, Penetration im Winkel von ca. 45° zur Hautoberfläche (40x).



Abb. 17 (I, 3h): Ein aus dem Gewebe entfernter Parasit, mit beginnender Hypertrophie der kranialen Abdominalsegmente (40x).



Abb. 18 (I, 6-7 h): Ballen unterhalb der zweiten Zehe, Penetrationswinkel ca. 70° (3x).



Abb. 19 (I, 7h): Penetrationswinkel 80 bis 90° (40x).



Abb. 20 (I, 9h): Ballen unterhalb der zweiten Zehe, Penetration in einem Winkel von etwa 90° (vgl. Abb 15, 6x).

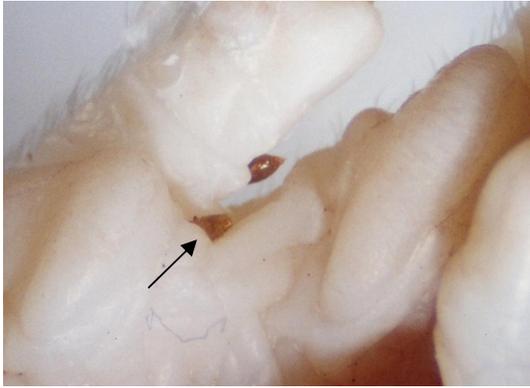


Abb. 21 (I, 9h): Ballen unterhalb der ersten Zehe, Penetration (Pfeil), im Hintergrund blutsaugender männlicher Floh (6,7 x).



Abb. 22 (I, 12h): Distales Ende zweiter Zeh, die Penetration ist abgeschlossen, die kaudalen Abdominalsegmente überragen die Hautoberfläche (Pfeil, 15x).



Abb. 23 (II, 18 h): Ballen, Penetration abgeschlossen, deutliches Erythem (2x).



Abb. 24 (II, 18 h): Schwellung der kranialen Abdominalsegmente (Parasit aus Wirtsgewebe entfernt, 40x).



Abb. 25 (II, 1 Tag): Die kaudalen Abdominalsegmente überragen die Hautoberfläche (40x).

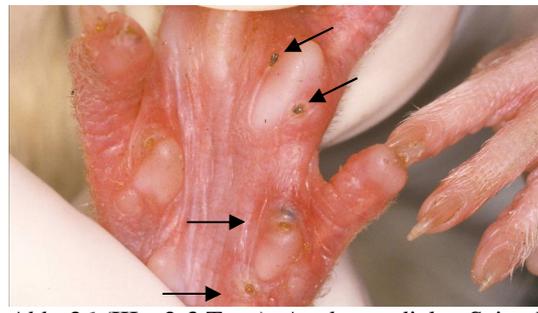


Abb. 26 (IIIa, 2-3 Tage): An der medialen Seite des Ballens befinden sich mehrere Läsionen (Pfeile), die oberen sind 2 Tage, die unteren 3 Tage alt (2x).



Abb. 27 (IIIa, 4 Tage): Zweiter Zeh distal, Auscheidung eines Fäzesfadens (Pfeil), Ödem, Erythem (14x).



Abb. 28 (IIIa, 5 Tage): Ballen, leichtes Erythem und Ödem (vgl. Abb. 15 und Abb. 20, 2x).



Abb. 29 (IIIa, 7 Tage): Fünfter Zeh distal, Erythem und Ödem, Pulsationsphänomen (s. Tabelle 1) bei neun Uhr (Pfeil, 2x).

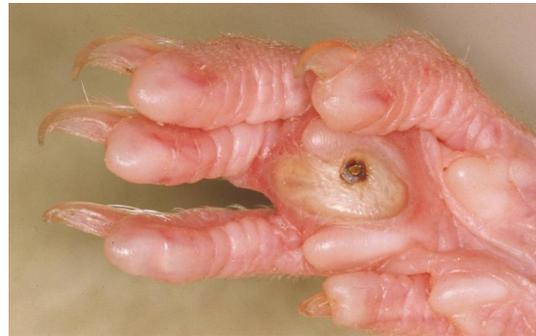


Abb. 30 (IIIb, 9 Tage): Ballen, deutliche Volumenzunahme des Flohs, ausgeprägtes Ödem; prallelastische Konsistenz, radiäre Streifen (2x).



Abb. 31 (IIIb, 11 Tage): Ballen, zunehmende Veränderung der Konsistenz, Ausbildung einer zentralen Konkavität (4x).



Abb. 32 (IIIb, 15 und 7 Tage): Ausgeprägtes Ödem beidseits, bei der älteren Läsion (links) zeigt sich eine Desquamation und Nekrotisierung im Randbereich. Rechts deutliches Pulsationsphänomen auf vier Uhr (4x).



Abb. 33 (IVa, 16 Tage): Zunehmende Schwarzfärbung als Zeichen einer Devitalisierung des Flohes (2x).



Abb. 34 (IVa, 17 und 20): Rechts die ältere Läsion. Trotz avitaler Parasiten deutliche Entzündungszeichen, proximal beidseits starke Ödeme und nekrotisches Gewebe.



Abb. 35 (IVb, 22 Tage): abgestorbener Parasit (2x).



Abb. 36 (IVb, 26 Tage): Reste der Flöhe und nekrotische Hautanhangsgebilde, keine Entzündungszeichen mehr (2x).



Abb. 37 (V, 26 Tage): Läsion im Bereich des distalen Ballens, kein Parasit mehr vorhanden, auf dem Grund befinden sich noch Eier (4x).



Abb. 38 (V, 30 Tage): Zirkuläre Vertiefung im Bereich des medialen Ballens (Pfeil, 2x).

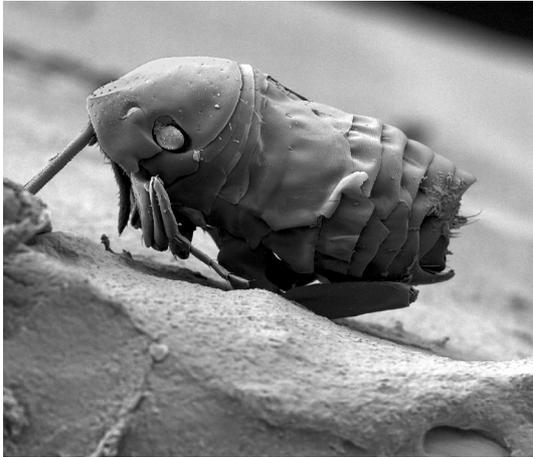


Abb. 39 (I, 3h): Beginn der Größenzunahme der kranialen Abdominalsegmente (120x).

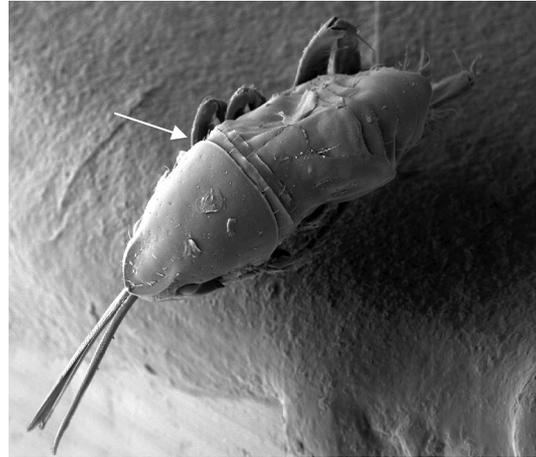


Abb. 40 (I, 3h): Beginnende Hypertrophie der kranialen Abdominalsegmente (Pfeil, 140x).

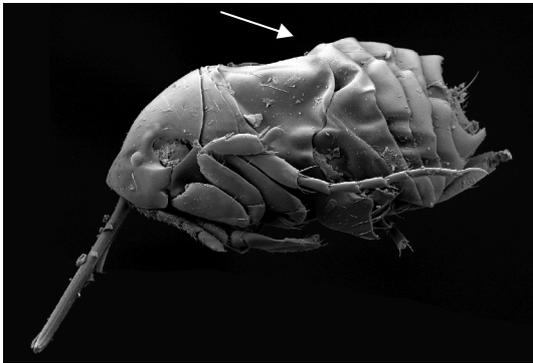


Abb. 41 (I, 7h): Leichte Größenzunahme der Abdominalsegmente drei und vier, die Intersegmentalhaut vergrößert sich (Pfeil, 120x).

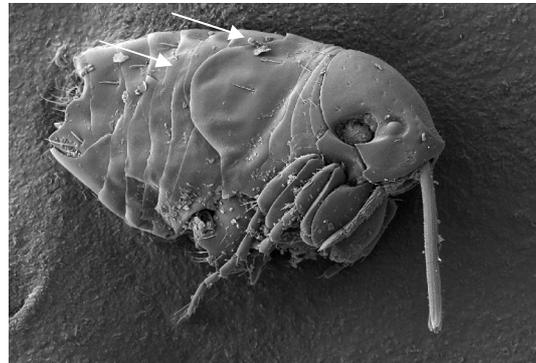


Abb. 42 (I, 8h): Deutliche Volumenzunahme der Abdominalsegmente drei und vier (Pfeil, 120x).

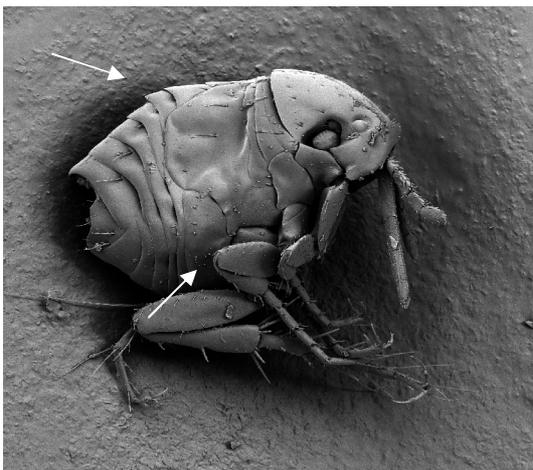


Abb. 43 (I, 12h): Die Abdominalsegmente drei und vier nehmen an Größe zu und weichen auseinander (Pfeile, 120x, Parasit bei der Präparation gestaucht).

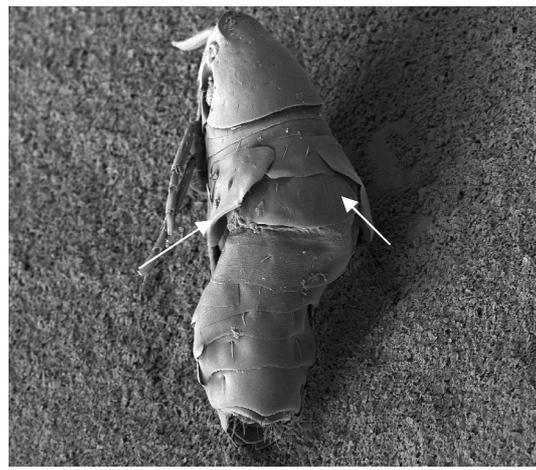


Abb. 44 (I, 12h): Weitere Größenzunahme der Abdominalsegmente drei und vier (Pfeile, 120x, die hinteren Segmente sind bei der Präparation luxiert).

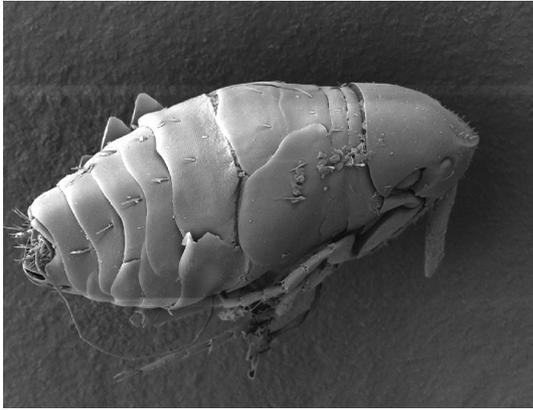


Abb. 45 (I, 18h): Auseinanderweichen und weitere Größenzunahme der Abdominalsegmente drei und vier (120x).

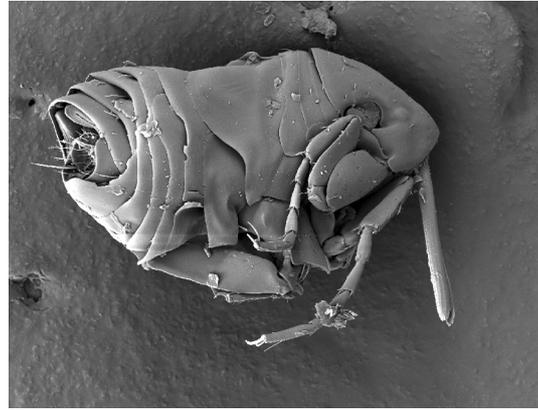


Abb. 46 (II, 1 Tag): Schwellung der kranialen Abdominalsegmente (120x, Parasit bei Präparation medial deformiert).

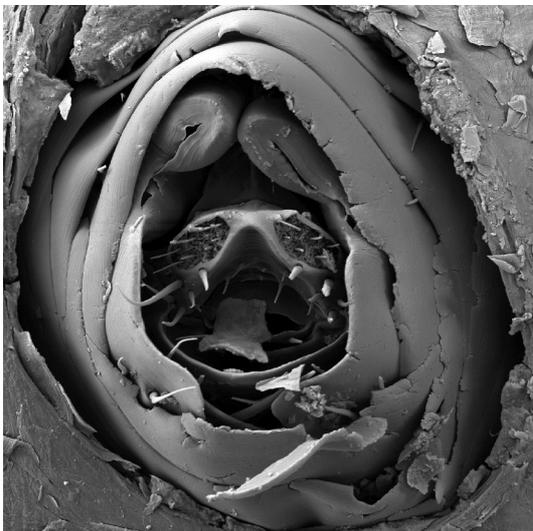


Abb. 47 (II, 1 Tag): Dorsalansicht des penetrierten Parasiten mit umgebender Epidermis. Der Abdominalkonus überragt das Stratum corneum (430x).

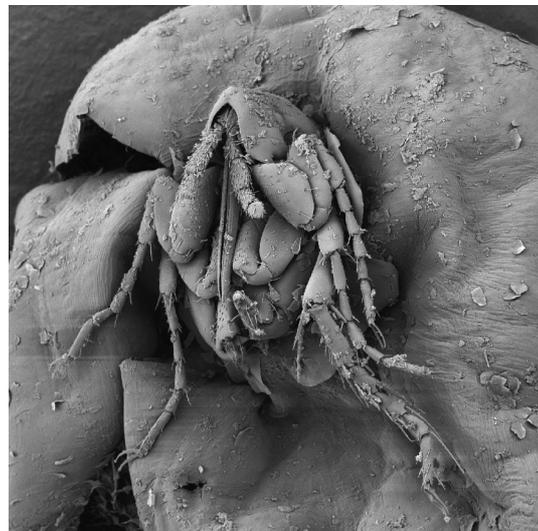


Abb. 48 (IIIa, 2 Tage): Die Hypertrophiezone der Abdominalsegmente drei und vier überragt die kranialen Flohanteile (120x).

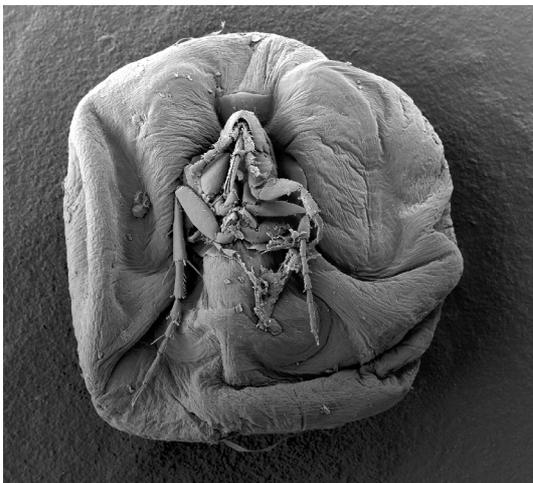


Abb. 49 (IIIa, 3 Tage): Ausgeprägte Hypertrophie der Abdominalsegmente drei und vier, Neosom bei der Präparation gestaucht (64x).

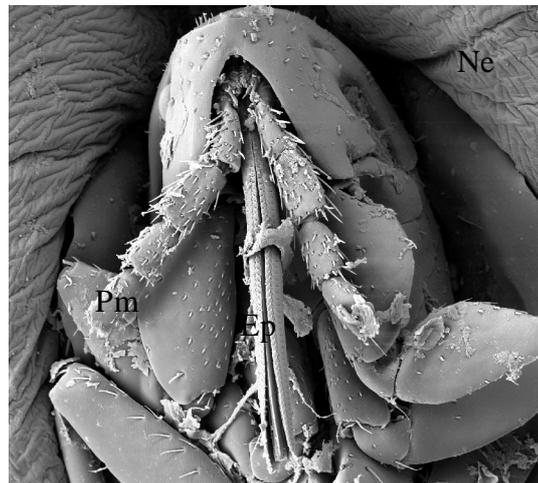


Abb. 50 (IIIa, 3 Tage): Darstellung des Flohkopfes aus Abb. 49 (270x, Ne= Neosom, Pm= Palpus maxillaris, Ep= Epipharynx).

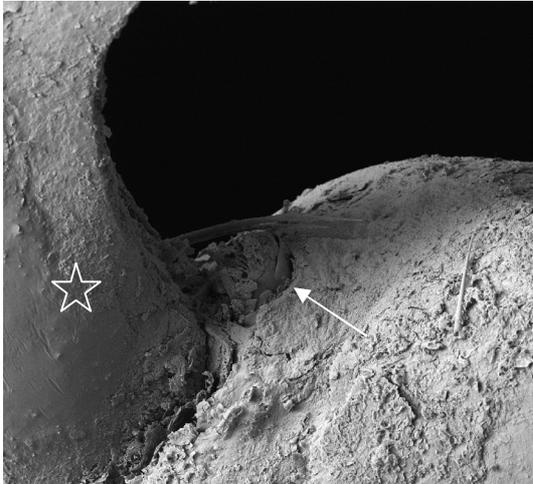


Abb. 51 (IIIa, 4 Tage): Unterhalb der Krallen (Stern) penetrierter Parasit (Pfeil). Der Abdominalkonus überragt das Stratum corneum (65x).



Abb. 52 (IIIb, 12 Tage): Aus dem Gewebe entfernter adulter, hypertrophierter Floh. Der Pfeil zeigt auf den Kopf des Parasiten (25x).

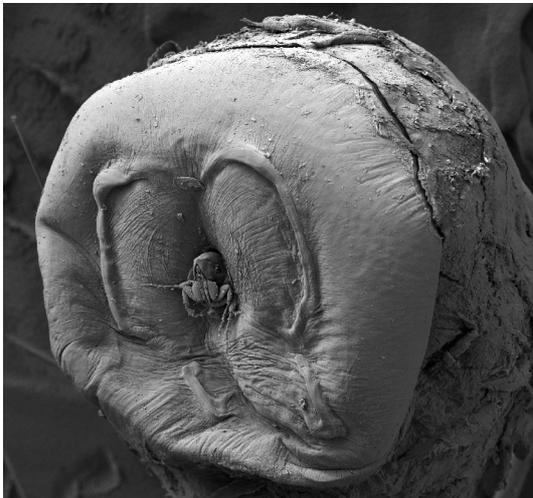


Abb. 53 (IIIb, 19 Tage): Maximal hypertrophierter Floh (30x, dorsal haftet Wirtsgewebe auf der Flohoberfläche).

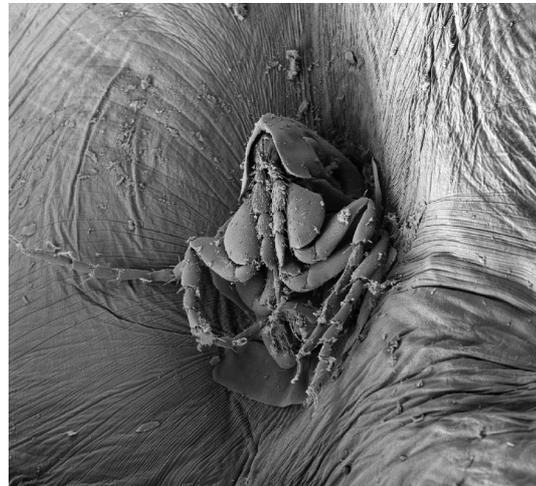


Abb. 54 (IIIb, 19 Tage): Die maximal hypertrophierten Abdominalsegmente drei und vier überragen den Kopf, die thorakalen Segmente sind nach kranial gestaucht (120x, Vergrößerung aus Abb.53 ).

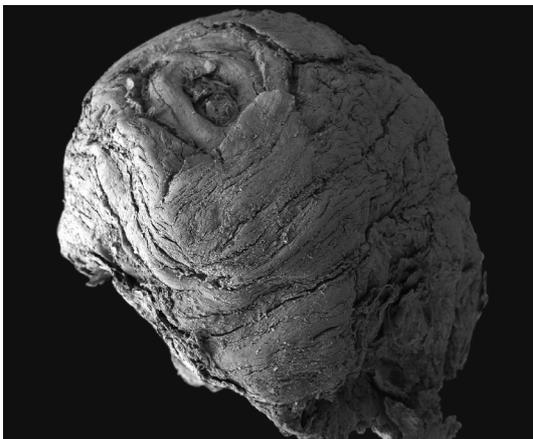


Abb. 55 (IVa, 21 Tage): Involution (40x).

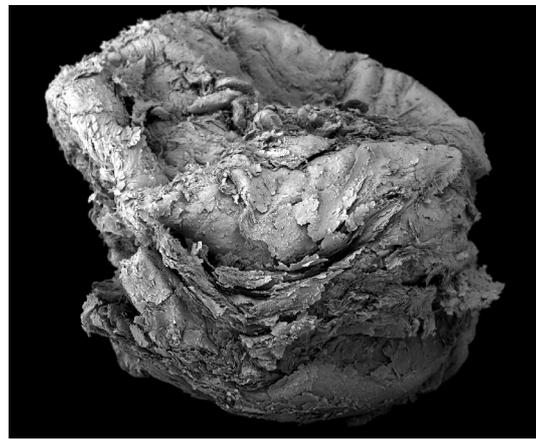


Abb. 56 (IVb, 24 Tage): Abgestorbener, geschrumpfter Parasit (32x).

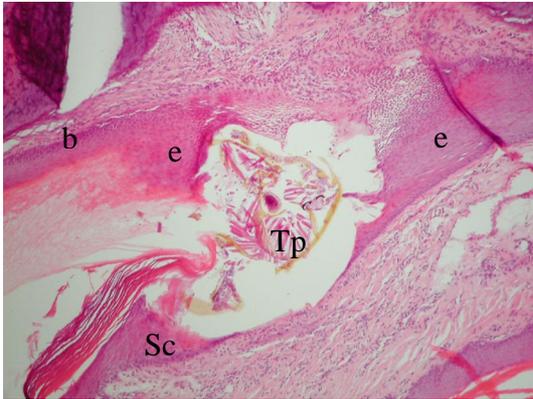


Abb. 57 (I, 12h): Intraepidermal (e) liegt ein Floh (Tp), keine Entzündungszeichen (40x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).

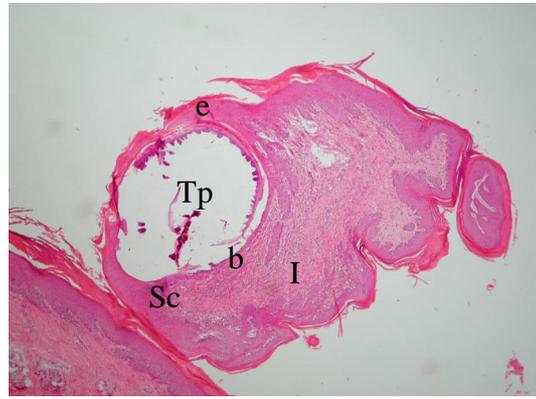


Abb. 58 (II, 2 Tage): Der Parasit (Tp) liegt intraepidermal (e) in der Umgebung Infiltration von Granulozyten (16x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).

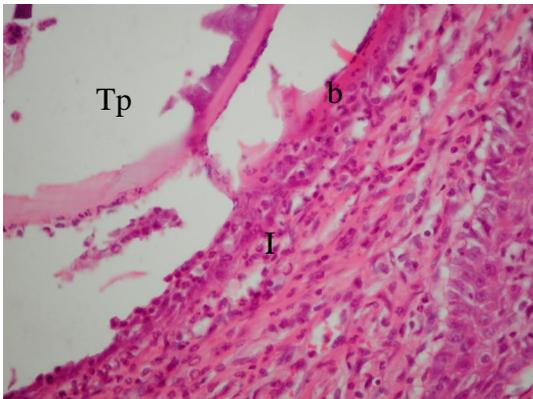


Abb. 59 (Ausschnittvergrößerung Abb.58): Dermales granulozytäres Infiltrat (I) im Randbereich der Läsion (160x, b= Basalmembran).



Abb. 60 (IIIa, 3 Tage): Der Floh (Tp) liegt intraepidermal (e), die Basalmembran ist intakt (16x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).



Abb. 61 (Ausschnittvergrößerung Abb. 60): An der Grenze zwischen Chitinexoskeletton (c) und Dermis zeigt sich ein granulozytäres Infiltrat (I), (100x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum ).

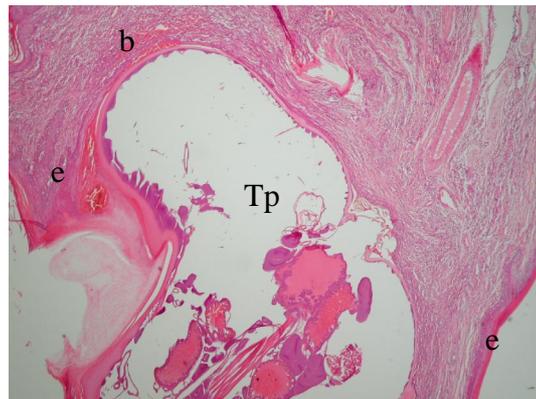


Abb. 62 (IIIa, 5 Tage): Der Parasit (Tp) ist in die Dermis eingedrungen, die Basalmembran (b) ist in ihrer Kontinuität unterbrochen. In den lateralen Anschnitten ist die Epidermis (e) zu sehen (16x).



Abb. 63 (Ausschnittvergrößerung Abb. 62): Anschnitt der Mundwerkzeuge des Flohes in den oberen Schichten der Dermis (100x).

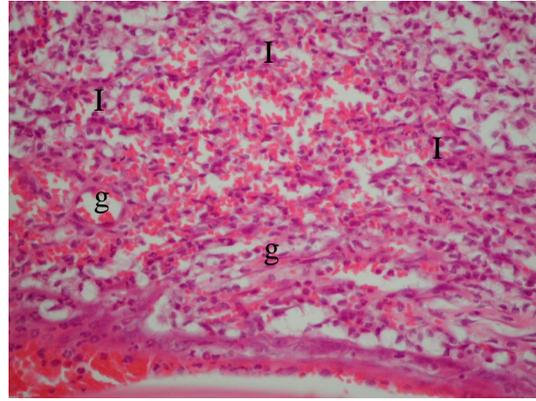


Abb. 64 (Ausschnittvergrößerung Abb. 62): Granulozytäres Infiltrat (I) und Neovaskularisierung (g) im Randbereich der Läsion (160x).

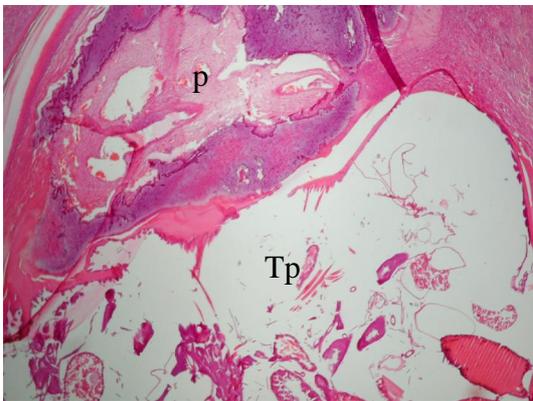


Abb. 65 (IIIa, 7 Tage): Der Flohkörper (Tp) wurde bei der Präparation zerstört, das Infiltrat (I) reicht bis an den Knochen der Endphalanx (p), ohne diese ganz zu erreichen (16x).



Abb. 66 (IIIa, 7 Tage): In der unmittelbaren Umgebung des Parasiten (Tp) zeigt sich ein Infiltrat (I) aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der Dermis (160x).

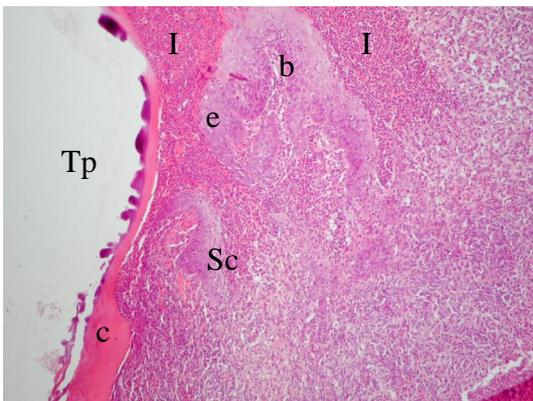


Abb. 67 (IIIb, 9 Tage): Das Chitinexoskeleton (c) des Flohes und umgebende Entzündungsreaktion (I), die Epidermis (e) ist durchbrochen (b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).

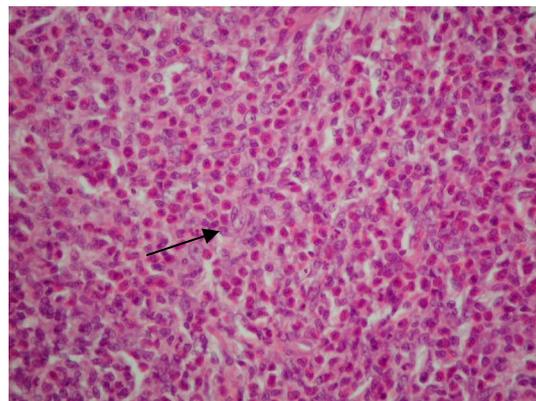


Abb. 68 (Vergrößerung der Entzündungsreaktion aus Abb. 67): Anfärbung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und einer Fremdkörperriesenzelle (Pfeil), (200x).

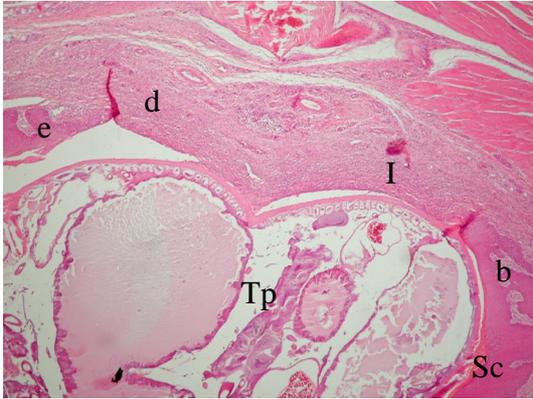


Abb. 69 (IIIb, 16 Tage): Vollständig erhaltener Parasit (Tp), die Epidermis (e) ist teilweise in ihrer Kontinuität unterbrochen, es befindet sich ein entzündliches Infiltrat in der Dermis (I), (16x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).

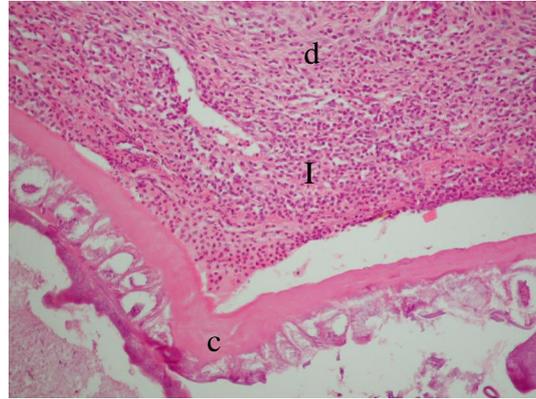


Abb. 70 (Vergrößerung aus Abb. 69): Übergang vom Chitinexoskeletton (c) zur Dermis (d), die Epidermis ist vollständig vom Parasiten verdrängt. Das Infiltrat (I) besteht vornehmlich aus eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (100x).

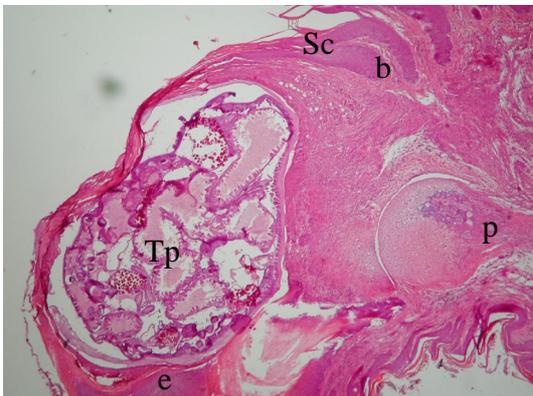


Abb. 71 (IIIb, 16 Tage): Hypertrophierter Floh (Tp) distal an einer Phalanx. Die Epidermis (e) ist verdrängt, die Dermis mit Entzündungszellen infiltriert; rechts sieht man den Knochen (p), der von der Entzündung nicht erreicht wird (16x, b= Basalmembran, Sc= Stratum corneum).

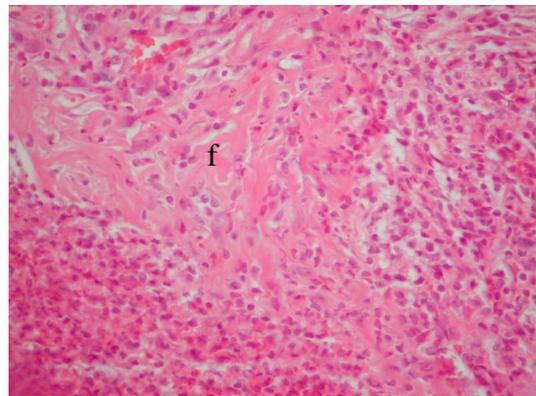


Abb. 72 (Ausschnittvergrößerung aus Abb. 71): Neben einem entzündlichem Infiltrat zeigt sich ein beginnender fibrotischer Umbau (f), (160x).

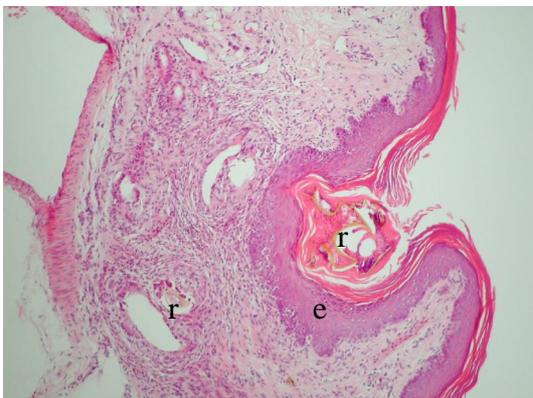


Abb. 73 (IVb, 28 Tage): Reste des Parasiten (r) epidermal als auch dermal. Die Epidermis (e) ist hyperkeratotisch (16x).

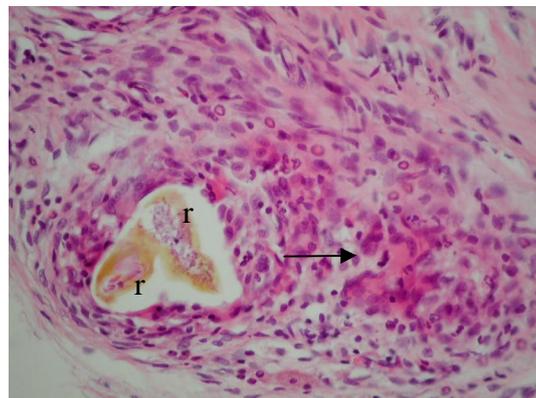


Abb. 74 (IVb, 28 Tage): Im Bereich der dermalen Flohreste (r) eine Fremdkörperriesenzelle (Pfeil), (160x).

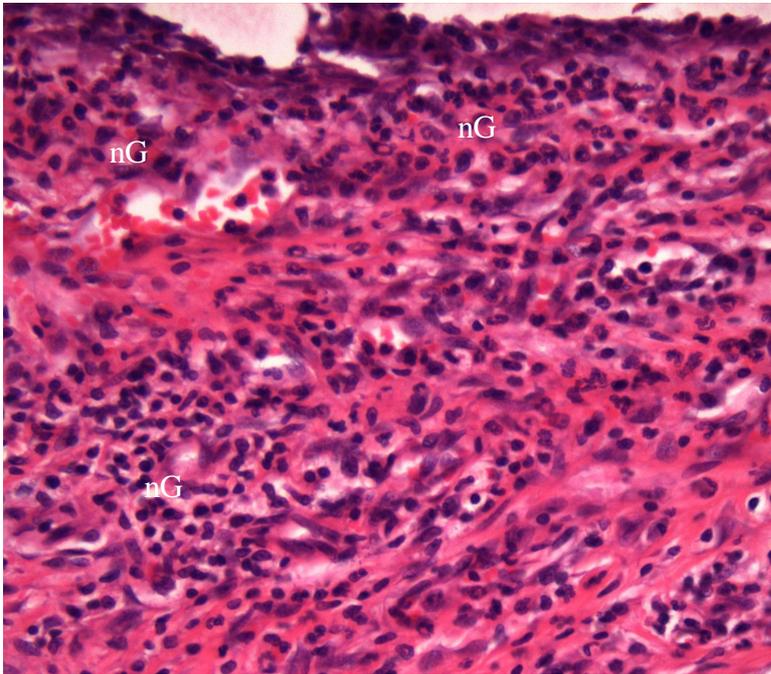


Abb. 58a (Ausschnittvergrößerung Abb. 58): Derales, granulozytäres Infiltrat, die parasitäre Läsion stellt sich am oberen Bildrand dar (200x, nG= neutrophile Granulozyten).

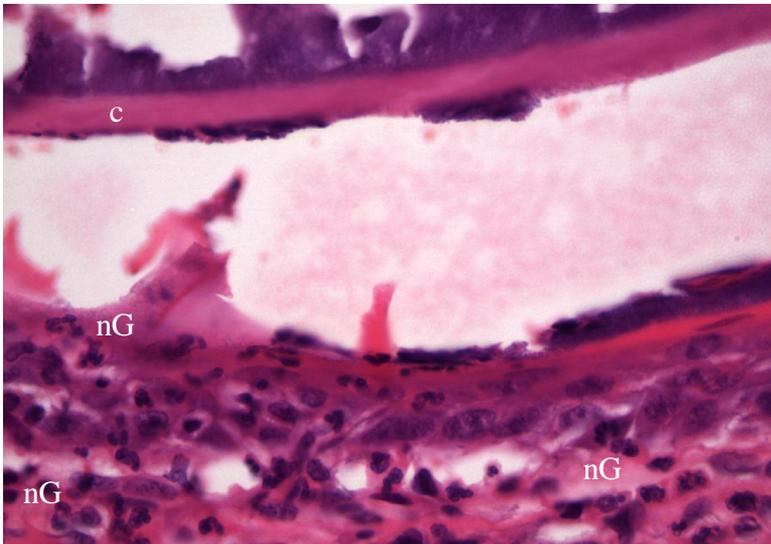


Abb. 58b (Ausschnittvergrößerung Abb.58): Am oberen Bildrand stellt sich das Chitinexoskeletton (c) des Parasiten dar, dermal ist ein granulozytäres Infiltrat zu erkennen (240x, nG= neutrophile Granulozyten).

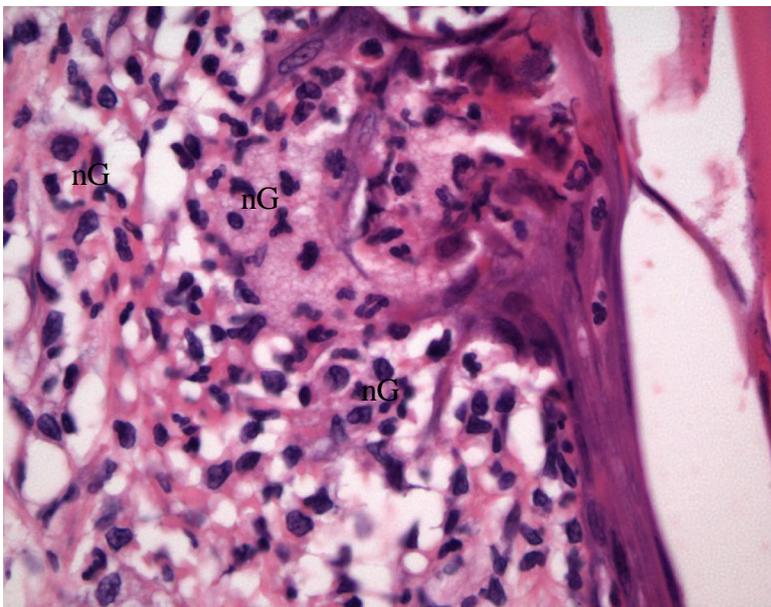


Abb. 60a (Ausschnittvergrößerung Abb.60): Derales, entzündliches Infiltrat, am rechten Bildrand befindet sich der intraepidermal liegende Floh (240x, nG= neutrophile Granulozyten)

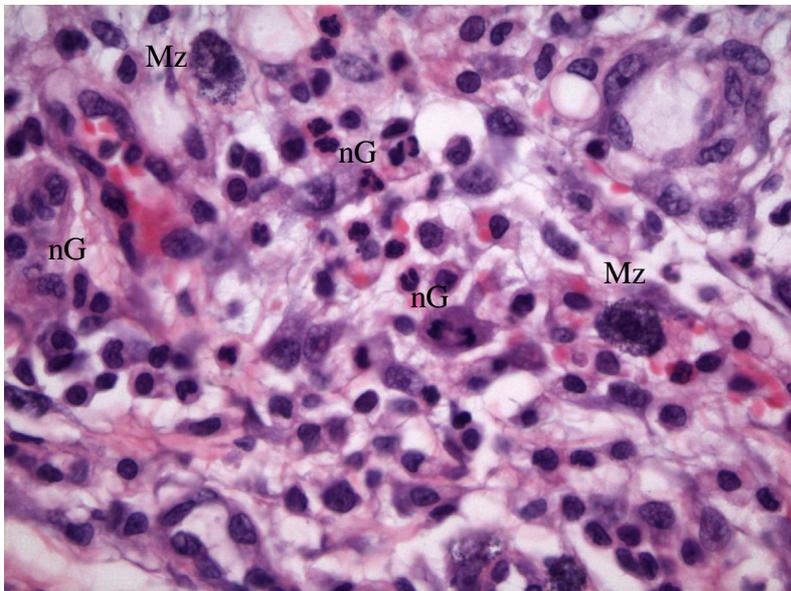


Abb. 60b (Ausschnittvergrößerung Abb. 60): Derales Infiltrat in der unmittelbaren Umgebung der ektoparasitären Läsion (240x, nG= neutrophile Granulozyten, Mz= Mastzelle)

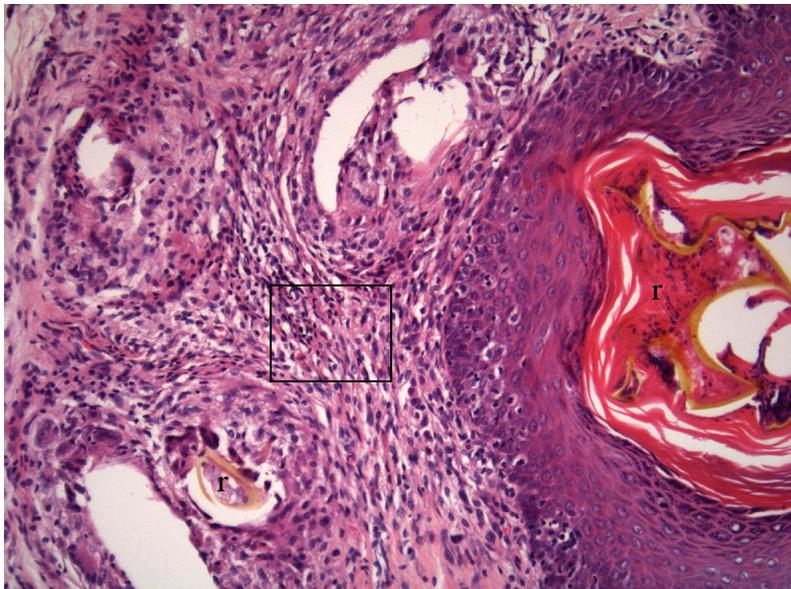


Abb.73a (Ausschnittvergrößerung Abb. 73): Epidermale und dermale Reste des Parasiten (r), dazwischen entzündliches Infiltrat. Die Markierung zeigt den Bereich der Ausschnittvergrößerung der Abb.73b an (100x).

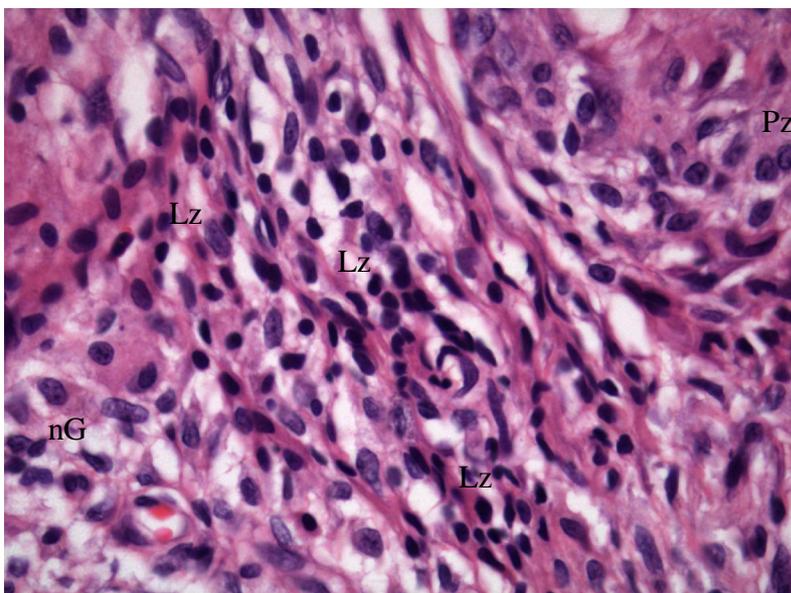


Abb. 73b (Ausschnittvergrößerung Abb. 73): Derales Infiltrat, mit vornehmlich lymphozytären Zellen (240x, Lz= Lymphozyten, nG= neutrophile Granulozyten, Pz= Plasmazellen)