

5 Diskussion

5.1 Experimentelle Tungiasis in einem Rattenmodell

Die Tungiasis ist eine Krankheit, die nahezu ausschließlich in armen Bevölkerungsschichten Lateinamerikas, der Karibik und in Afrika südlich der Sahara vorkommt (Heukelbach *et al.* 2001). Um die Charakteristika der humanen Tungiasis zu untersuchen, müssen Feldarbeiten in Endemiegebieten durchgeführt werden. Hier erschweren zahlreiche soziale Faktoren wie Analphabetentum, Desinteresse und Gewalttätigkeit (Heukelbach *et al.* 2001; Heukelbach *et al.* 2003) die Forschungsarbeit. Aus den oben genannten Sicherheitsgründen war es nicht möglich, in der Favela Vicente Pinzón II nach Einbruch der Dunkelheit tätig zu sein, so dass sich hier maximal ein kontinuierlicher Beobachtungszeitraum von 12 Stunden ergab. In den frühen Stadien der Erkrankung ist allerdings eine möglichst engmaschige Untersuchung der Läsion erforderlich um zu validen Ergebnissen zu kommen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich die Tungiasis in einem Tiermodell etablieren lässt und sich damit die Möglichkeit eröffnet, die Erkrankung unter Laborverhältnissen zu beobachten. Bisher sind keine keine Tiermodelle für *T. penetrans* oder andere Tungaspezies in der Literatur bekannt.

Tungiasis ist eine Zoonose, die unter anderem bei Hunden, Katzen und Schweinen vorkommt (Cooper 1967; Rietschel 1989) und auch bei *Rattus rattus* beschrieben wurde (Heukelbach *et al.* 2004b). Heukelbach *et al.* (2004b) konnten zeigen, dass im Endemiegebiet wild lebende Ratten Läsionen an den unbehaarten Regionen der Füße und Schwänze hatten, Mäuse jedoch nicht. Die Ursache dieser Diskrepanz ist nicht bekannt.

So könnte die für eine Penetration zur Verfügung stehende Oberfläche bei der Maus zu klein für den Parasiten sein. Ebenfalls ist denkbar, dass dieses Wirtstier durch effektive Reinigungsmechanismen die Flöhe noch bevor sie eindringen können bzw. in einem frühen Stadium entfernt. Einen Hinweis darauf, dass *Tungidae* nach der Penetration effektiv aus der Epidermis eliminiert werden können, gibt eine Arbeit von Lavoipierre (1979). Der Autor untersuchte die nutritiven Charakteristika und die konsekutiven Entzündungs- und Reperaturmechanismen bei *Tunga monositus* in der Haut seines Hauptwirtes *Peromyscus maniculatus* und beschreibt hier nebenbefundlich Abwehr- und Kratzbewegungen der Hirschmaus als Reaktion auf den Penetrationsvorgang (Lavoipierre *et al.* 1979).

In unseren Versuchen konnten die Beobachtungen von Heukelbach *et al.*, die die Infektion von Ratten mit *T. penetrans* beschrieben hatten (Heukelbach *et al.* 2004b), an Wistarratten bestätigt

werden. In einem Käfig, in dem Wistarratten auf einem Sandboden ca. 60 Sandflöhen ausgesetzt wurden, hatten sich innerhalb von 24 Stunden vier von vier (Käfig A), respektive drei von vier Wistarratten (Käfig B) mit *T. penetrans* infiziert. Im Anschluss an die Penetration zeigte sich die für den penetrierten Sandfloh charakteristische Hypertrophie. Bis zu vier Läsionen traten bei einem Wirtstier auf.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Flöhe nach längerem Suchen in den Interphalangealräumen sich einen ihnen genehmen Penetrationsort aussuchten, mit ihrem Mundwerkzeug in die Epidermis eindrangen und für einige Stunden in dieser Position verblieben. Anschließend verließen sie das Wirtstier und erschienen dunkler und größer als vorher. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Sandflöhe handelte, die Blut gesaugt hatten. Diese Vermutung wurde bestätigt sowohl in weiblichen als auch männlichen Flöhen, die aus dem Fell einer Wistarratte gesammelt worden waren und in deren Proventrikulus und Darmlumen Erythrozyten nachzuweisen waren. Dass männliche Sandflöhe überhaupt Blutmahlzeiten zu sich nehmen, wurde bislang nur ein Mal beschrieben (Brothers und Heckmann 1980), war aber in der parasitologischen Literatur stets umstritten.

Um im Labor eine Infektion von Wistarratten mit *T. penetrans* zu erreichen, müsste stets eine relativ große Anzahl von Flöhen im Epidemiegebiet gefangen werden, da eine Zucht der Parasiten im Labor derzeit noch nicht möglich ist. Dies ist ein zeitaufwendiges Unterfangen, das überdies das Risiko beinhaltet, dass durch das Fangen der Flöhe Verletzungen am Parasiten auftreten, die eine spätere Fortbewegung, Penetration oder Befruchtung unmöglich machen.

Da das Auftreten von Tungiasis jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt (Heukelbach *et al.* 2005), ist es in der Regenzeit nahezu unmöglich, eine für experimentelle Infektionen notwendige Zahl von Flöhen im Endemiegebiet zu sammeln.

Eine weitaus praktischere Möglichkeit Wistarratten mit *T. penetrans* zu infizieren, ist die Exposition der Tiere im Endemiegebiet. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich in einem Zeitraum von zwei Wochen bis zu siebzehn Läsionen an einer Wistarratte manifestierten. Nach zwei Wochen hatten sich 53,3% (16/30) der Wistarratten infiziert. Es ergaben sich jedoch je nach Standort deutliche Unterschiede in den Penetrationsraten. Innerhalb von Häusern war die Infektionsrate deutlich geringer als außerhalb der Häuser.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zum einen möglich ist, *T. penetrans* Weibchen unter Laborbedingungen in einem Käfig auf Wistarratten anzusetzen, und zum anderen die Wistarratten in Käfigen im Endemiegebiet zu exponieren.

In beiden Fällen kommt es zur Penetration und physiologischen Hypertrophie des Parasiten.

Um Forschungen zur Tungiasis vollständig unabhängig von den Gebieten zu machen, in denen die Erkrankung natürlicherweise vorkommt und solche Arbeiten auch das ganze Jahr über machen zu können, wäre es sinnvoll, den gesamten Vermehrungszyklus im Labor zu etablieren. Dies würde nicht nur bedeuten, dass man für Tierversuche auf eine beliebige Anzahl von weiblichen Flöhen zurückgreifen, sondern auch eine Vielzahl von Charakteristika manipulieren könnte, um so zu einem besseren Verständnis in Bezug auf Pathophysiologie, Immunreaktion und Pharmakotherapie zu kommen. Daran wird derzeit von einer deutsch- brasilianischen Forschergruppe gearbeitet.

5.2 Natürlicher Krankheitsverlauf bei der Wistarratte; Vergleich mit dem beim Menschen

Nachdem gezeigt wurde, dass eine experimentelle Tungiasis bei der Wistarratte möglich ist, bestand der nächste Schritt darin, die Krankheitscharakteristika bei der Ratte und beim Menschen miteinander zu vergleichen. Erstmals beschrieben Geigy und Herbig (1949) die morphologischen und strukturellen Veränderungen an Sandflöhen, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Patienten extrahiert worden waren. Die Autoren schlugen eine Einteilung der Sandflohentwicklung im Menschen in vier Stadien vor. Da aber der Zeitpunkt der Penetration bei ihren Biopsien nicht bekannt war und klinische Merkmale nicht dokumentiert worden waren, konnten die Autoren weder auf die Dauer der einzelnen Stadien eingehen, noch eine Korrelation zwischen morphologischen Veränderungen des Parasiten und klinischen Beobachtungen herstellen. Des Weiteren hatten sie keine Exemplare von sich in der Involutionsphase befindlichen Flöhen vorliegen. Rückschlüsse auf den natürlichen Krankheitsverlauf waren deshalb nicht möglich.

In neuerer Zeit wurden einige Fallbeschreibungen bei Reisenden veröffentlicht (Franck *et al.* 2003), allerdings war hier ebenfalls der Zeitpunkt der Penetration unbekannt. Die Aussagekraft war auch schon deshalb gering, weil es sich meist um solitäre Läsionen handelte. Eisele *et al.* (2003) beschrieben erstmals den genauen Krankheitsverlauf beim Menschen, sowohl unter Einbeziehung der morphologischen Charakteristika des Parasiten wie auch der klinischen und histopathologischen Veränderungen beim Wirt. Die Autoren entwickelten die sogenannte Fortaleza- Klassifikation, nach der die Tungiasis beim Menschen in fünf Stadien gegliedert wird (Eisele *et al.* 2003).

Von den 141 bei Wistarratten beobachteten Läsionen fanden sich 140 an den Extremitäten, nur ein Mal war der Schwanz Penetrationsort. Heukelbach *et al.* hatten bei wildlebenden Ratten in

6 von 14 Fällen (43%) eine Penetration am Schwanz festgestellt (Heukelbach *et al.* 2004b). Es scheint, dass die Penetrationen bei der Ratte ausschließlich an unbehaarten bzw. gering behaarten Körperregionen stattfindet, die zudem ständig oder temporär mit dem Untergrund in Kontakt sind. Da Sandflöhe aber in der Lage sind, sich auf der Wirtshaut fortzubewegen, scheinen die präferentiellen Penetrationsorte nicht nur aufgrund der unmittelbaren Nähe zum Boden gewählt zu werden, sondern es müssen weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Einer dieser Gründe könnte der Aufbau der Epidermis sein. Es ist anzunehmen, dass der Floh vorwiegend dort penetriert, wo die Penetration leicht fällt. So könnte man den hohen Anteil an Schwanzläsionen bei den *Rattus rattus* dadurch erklären, dass sie aufgrund ihres größeren Bewegungsradius und der unterschiedlichen Untergründe, denen sie ausgesetzt sind, an den Pfoten dickere Epithelschichten haben als vier Wochen alte Laborratten. Die dickere Epithelschicht ist durch eine Hyperplasie des Stratum corneum bedingt, die in direkter Korrelation zur mechanischen Beanspruchung der Haut steht (Smollich und Michel 1992). Dadurch könnten für die Sandflohweibchen die Penetration am Ballen wild lebender Ratten schwieriger sein als bei Wistarratten.

In einer Studie von 2002 wurde gezeigt, dass bei den Bewohnern der Favela Vicente Pinzón II in Fortaleza mehr als 90% der Läsionen die Füße und nur 5,8% andere Regionen der oberen oder unteren Extremität betrafen (Heukelbach *et al.* 2002). Obwohl auch andere Lokalisationen beim Menschen beschrieben werden, sind diese sehr selten (Heukelbach *et al.* 2002) und können als Rarität aufgefasst werden. Die Tatsache, dass bei Menschen im Endemiegebiet, die täglich mit dem infizierten Sand in Berührung kommen, vornehmlich die Füße betroffen sind, erscheint plausibel, hat doch der Floh zu dieser Körperregion den leichtesten Zugang. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der Wistarratte in 89% der Fälle ebenfalls die hintere, anatomisch mit der unteren Extremität beim Menschen vergleichbare, Gliedmaße betroffen ist. Da zumindest bei der Fortbewegung alle vier Extremitäten der Ratte gleichmäßig exponiert sind, muss es demnach noch andere Faktoren geben, die das Penetrationsverhalten des Sandflohs beeinflussen.

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen der humanen Infektion und der Tungiasis bei Wistarratten ist die Manifestation in der Periungualregion. Muehlen *et al.* (2003) konnten in einer repräsentativen Prävalenzstudie in einem Fischerdorf in Nordostbrasilien zeigen, dass 74% von 2493 Läsionen in der Periungualregion der Füße lokalisiert wurden (Muehlen *et al.* 2003). Die Bevorzugung dieser Lokalisation ließ sich auch bei den Penetrationen an den Rattenextremitäten beobachten. Bei der Ratte betrafen 66% (92/140) der Läsionen die Periungualregion, während die restlichen 34% (48/140) am Ballen lokalisiert wurden. So lassen sich bezüglich der

Topographie der Läsionen, bezogen auf die betroffene Extremität und den genauen Penetrationsort, deutliche Übereinstimmungen zwischen der Tungiasis beim Menschen und der Wistarratte feststellen. Lediglich die beim Menschen beschriebene ausgeprägte Clusterbildung - zahlreiche Läsionen, die dicht nebeneinander liegen (Feldmeier *et al.* 2004) - , sind bei der Ratte weniger ausgeprägt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Clusterbildung bei 15% (21/141) der Läsionen festgestellt werden. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte eine für die Penetration geeignetere Oberfläche am Rattenfuß sein.

Im Folgenden werden die Charakteristika des natürlichen Krankheitsverlaufes beim Menschen (Eisele *et al.* 2003) mit denen bei der Ratte verglichen.

Nachdem der Parasit an einem geeigneten Platz die Epidermis penetriert hat, beginnt die Entwicklung im Wirtsgewebe. Bei jeder der dokumentierten 141 Penetrationen kam es anschließend zur Hypertrophie des Sandflohweibchens.

Dies deutet darauf hin, dass, wenn die Penetration erfolgreich zustande kam, die weitere Entwicklung des Parasiten *in situ* in allen Fällen auch erfolgreich abgeschlossen wird.

Die Penetrationphase, in der der Parasit bis auf die letzten drei bis vier Abdominalsegmente ins Gewebe vordringt, ist bei der Ratte nach 12 Stunden abgeschlossen, beim Menschen geschieht dieser Prozess innerhalb von 3-7 Stunden (Eisele *et al.* 2003). Aus zwei Gründen erscheint es bemerkenswert, dass der Sandfloh beim Menschen deutlich schneller penetriert als bei der Ratte. Erstens zeigt die Epidermis bei der Ratte einen dünneren, vierschichtigen Aufbau (Krinke 2000), während beim Menschen im distalen Bereich der Extremitäten mit dem Stratum lucidum eine fünfte Schicht vorhanden ist (Junqueira und Carneiro 1996), zweitens ist beim Menschen aufgrund stärkerer mechanischer Belastung von einem dickeren Stratum corneum auszugehen.

Das Durchdringen der obersten Hautschichten erfolgt bei beiden Wirten in einem Winkel von 45- 90 Grad, auch zeigen sich bei beiden auch schon frühentzündliche Veränderungen wie eine Rötung der Umgebung und Ödematisierung des Gewebes. Histopathologisch können die ersten Veränderungen im Sinne einer dermalen Infiltration mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten bei der humanen Manifestation bereits in den ersten Stunden gemacht werden (Eisele *et al.* 2003). Im Rattengewebe zeigt sich erst nach zwei Tagen ein granulozytäres Infiltrat in der Dermis. Die Hypertrophie des Parasiten beginnt beim Menschen (Eisele *et al.* 2003), wie auch im Rattengewebe, bereits in den ersten Stunden, also noch während der Penetrationsphase, im Bereich der kranialen Abdominalsegmente.

Der Krankheitsbeginn beim Menschen ist von einer schnellen Penetration und einer prompten zellulären Entzündungsantwort geprägt (Eisele *et al.* 2003), während dieser Prozess bei der Ratte

nach dem selben Muster, aber langsamer abläuft. Die morphologische Entwicklung ist dagegen vom Beginn der Hypertrophie bis zur Involution identisch.

Auch das klinische Bild ist bei beiden Wirten während des gesamten Krankheitsverlaufes weitgehend übereinstimmend. Parallel zum Auftreten von Erythem, Überwärmung und Ödematisierung zeigen sich beim Menschen mit beginnender Hypertrophie Schmerzempfindungen (Eisele *et al.* 2003). Bei der Ratte werden Schmerzempfindungen durch indirekte Zeichen wie Schonung der betroffenen Extremität ebenfalls beobachtet. Nach drei Tagen sind beim Menschen bereits Pulsationsphänomene, Fäzesspiralen und bräunlich- wässrige Sekretabsonderungen zu beobachten (Eisele *et al.* 2003), ähnlich wie sie auch bei der Ratte, hier allerdings erst am fünften bis siebten Tag nach Penetration, gesehen werden. Zeichen der Hypertrophie wie ein deutlicher weißer Hof mit einem zentralen schwarzen Punkt, im weiteren Verlauf die Aufwölbung des mittleren Abdomens über die posterioren Flohanteile und somit die Ausbildung einer so genannten Caldera- Formation, beginnen beim Menschen und bei der Ratte gleichermaßen nach zwei Tagen und dauern bei beiden Wirten bis zu drei Wochen an (Eisele *et al.* 2003).

Stoffwechselaktivitäten, wie die zunehmende Darmaktivität, sichtbar als so genanntes Pulsationsphänomen, treten im menschlichen Gewebe etwas früher auf als bei der Ratte. Die ersten Eier werden beim Menschen vereinzelt bereits nach drei Tagen ausgeschieden (Eisele *et al.* 2003), bei der Ratte erst nach fünf.

Der größte Unterschied, der im Krankheitsverlauf auftritt, betrifft die histopathologischen Merkmale. Während zu Beginn der Hypertrophie bei beiden Wirten das Sandflohweibchen sich mit seinem Korpus in der Epidermis aufhält und eine granulozytäre epidermale Entzündungsreaktion hervorruft, lässt sich im Rattengewebe ab dem fünften Tag nach Penetration ein Durchbruch der Basalmembran beobachten. Der Verlust der Trennschicht zwischen der Dermis und der Epidermis bewirkt eine Verstärkung des granulozytären Entzündungsinfiltrates bei der Ratte in beiden Hautschichten, während bei der humanen Manifestation, bei der die Basalmembran während des gesamten Verlaufes ihre Kontinuität behält, die zelluläre Infiltration der Dermis weniger spektakulär ist (Feldmeier *et al.* 2004). Bei der Ratte war intradermal eine Infiltration aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten mit einzelnen Makrophagen und Mastzellen zu beobachten, die zum Ende der Erkrankung durch Lymphozyten ergänzt wurden. Die Entzündungsreaktion zeigt sich bei der humanen Form der Tungiasis in einem ähnlichen Zellmuster, allerdings ist die Ausprägung des entzündlichen Infiltrats deutlich moderater und besteht in der Dermis vornehmlich aus monozytären Zellen. Die Epidermis des Menschen ist nach der Penetration von *Tunga penetrans* zusätzlich häufig hyper-

und parakeratotisch verändert (Feldmeier *et al.* 2004), während bei der Ratte dies nur in Einzelfällen festgestellt werden konnte.

Es ist anzunehmen, dass die Differenz im histopathologischen Befund vornehmlich durch die unterschiedliche Wirkung der Größenzunahme des Parasiten auf das Gewebe zustande kommt. Die zwei- bis dreitausendfache Volumenzunahme von *T. penetrans* in der Hypertrophiephase (Eisele *et al.* 2003) setzt Scher- und Druckkräfte frei, denen eine wesentlich kleiner dimensionierte Rattengliedmaße weniger Kompensation entgegenbringen kann als ein menschlicher Zeh oder Fußballen. Die Zerstörung der Basalmembran und die daraus resultierende verstärkte Entzündungsreaktion wäre demnach die Folge der „reduzierten“ anatomischen Verhältnisse bei der Ratte.

Der durch den Kontinuitätsverlust der Basalmembran verursachte Unterschied im mikroskopischen Entzündungsbild ist nicht mit einer deutlicheren Ausprägung der makroskopischen Entzündungszeichen wie Calor, Rubor, Tumor, Dolor und Functio laesa bei der Ratte korreliert.

Zusammenfassend konnten folgende Unterschiede zwischen der Tungiasis beim Menschen und bei der Ratte herausgearbeitet werden: *T. penetrans* penetriert deutlich schneller in das menschliche Gewebe als in die Haut der Ratte, konsekutiv entsteht hieraus beim Menschen eine frühzeitige epidermale Infiltration mit granulozytären Entzündungszellen. Unterschiede in den morphologischen Veränderungen beim Parasiten sind allenfalls marginal, allerdings scheint die biologische Entwicklung des Flohes im menschlichen Gewebe schneller voranzugehen, da das Einsetzen der Eiabgabe, des Pulsationsphänomens und der Faecesabgabe früher beginnt (Eisele *et al.* 2003). Das klinische Bild ist während des gesamten Krankheitsverlaufes bei Mensch und Ratte identisch, allerdings kommt es zu leichten Abweichungen bezogen auf die Dauer der Stadienlänge der Fortaleza- Klassifikation (s. Tabelle 8). Als größter Unterschied ist der Kontinuitätsverlust der Basalmembran bei der Ratte am fünften Erkrankungstag zu nennen, der im histopathologischen Bild eine Zunahme des dermalen granulozytären Zellinfiltrates bedingt und sich im mikroskopischen Sinne in einer deutlichen Entzündungsreaktion offenbart.

Insgesamt zeigten sich weitgehende Übereinstimmungen des natürlichen Krankheitsverlaufes in beiden Wirten. Daraus lässt sich schließen, dass die Wistarratte ein geeignetes Tiermodell für die Tungiasis ist.

5.3 Zytokinantwort bei der Wistarratte

Bei der Tungiasis des Menschen lässt sich im Serum sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Antwort nachweisen (Feldmeier *et al.* 2003b). Da die untersuchten Probanden aber teilweise auch mit anderen Ektoparasiten infiziert waren, blieb unklar, ob es bei der Tungiasis ein spezifisches Zytokinmuster gibt (Feldmeier *et al.* 2003b). So kann beispielsweise auch Skabies sowohl eine Th1- als auch eine Th2- Immunantwort (Morsy *et al.* 1995) auslösen.

Für die Bestimmung der Zytokinantwort bei Tungiasis bietet sich die Wistarratte als Modell an, insbesondere weil der genaue Zeitpunkt der Penetration bekannt ist und somit auch kinetische Unterschiede im Zytokinmuster festgestellt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , CINC sowie der immunregulatorisch wirkenden Interleukinen IL-4 und IL-10 zu definierten Zeitpunkten in den ersten drei Wochen der Erkrankung untersucht. Das Studiendesign erlaubte nur die Entdeckung von Tendenzen, signifikante Unterschiede konnten aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht erwartet werden, die Beschreibung der Zytokinmetrik ist demnach mit Zurückhaltung zu betrachten, die Prüfung der abgeleiteten Hypothesen muss größer angelegten Versuchen vorbehalten bleiben.

TNF- α und IL-1 β zeigten in den ersten zwei Wochen einen Anstieg der Serumkonzentrationen mit einem Gipfel zwischen dem zehnten und dreizehnten Tag (Abb. 8, Abb. 9). Beide Zytokine werden v.a. von aktivierten Makrophagen, aber auch anderen Zellen wie Lymphozyten und Granulozyten, die im zellulären Infiltrat häufig zu sehen waren, sezerniert, so dass es denkbar ist, dass der Konzentrationsanstieg beider Zytokine im Serum durch die lokale Entzündungsreaktion verursacht wurde. Bei der normalen Wundheilung der Haut erreicht die Synthese von TNF- α und IL-1 β nach 48-72 Stunden ihr Maximum und ist 10 Tage nach dem verletzungsverursachenden Ereignis bereits beendet (Sato und Ohshima 2000). Bei der Tungiasis zeigte sich das Konzentrationsmaximum von TNF- α und IL-1 β erst in der zweiten Woche nach Krankheitsbeginn. Sollten weitere Versuche die Interleukinmetrik bestätigen, ist zu prüfen, ob dieser, im Verhältnis zur normalen Wundheilung verspätete Zytokingipfel durch die prolongierte Stimulation des Wirtsgewebes durch den parasitären Fremdkörper bedingt sein könnte.

Der penetrierte Sandfloh könnte auch Keratinozyten zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine anregen. Dieser Prozess lässt sich bei Skabies nachweisen (Arlian *et al.* 1996). Die Autoren konnten belegen, dass durch Antigene von *Sarcoptes scabiei* stimulierte Keratinozyten vermehrt IL-1 β produzieren. Periphere mononukleäre Zellen und aus Monozyten hervorgegangene dendritische Zellen sind ebenfalls in der Lage, auf die Stimulation durch

ektoparasitäre Antigene mit der Sezernierung von TNF- α und IL-1 β zu reagieren (Arlian *et al.* 2004). Auch bei der ovinen Myiasis lässt sich eine frühzeitige Expression dieser proinflammatorischen Zytokine feststellen. Innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Penetration der Larve von *Lucilia cuprina* in die Haut des Schafes kommt es zu einem deutlichen Anstieg der mRNA Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Elhay *et al.* 1994).

CINC, ein Mitglied der IL-8 Familie, ist mitverantwortlich für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und deren Migration in verletztes Gewebe (Watanabe *et al.* 1991). Dieses Chemokin wird von mehreren Zellspezies nach Stimulation durch TNF- α und IL-1 β gebildet (Iida *et al.* 1992). Da bei der Infektion des Menschen durch *T. penetrans* eine deutliche Ansammlung von neutrophilen Granulozyten um den Flohkörper erfolgt (Feldmeier *et al.* 2004), sollte untersucht werden, ob es einen Hinweis darauf gibt, dass sich dieser Prozess bei der Ratte in einem Anstieg von CINC im Serum widerspiegelt.

Es zeigten sich allerdings nur geringe Veränderungen des CINC- Spiegels während des Infektionsverlaufes, wobei am Ende der Untersuchungsperiode eine abnehmende Konzentration zu beobachten war (Abb. 11). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Beobachtungen, die bei der Infektion von Schafen mit *L. cuprina* gemacht wurden. Bei der ovinen Myiasis konnten bereits sechs Stunden nach Infektionsbeginn und bis zu drei Tagen danach, im afferenten Lymphsystem ein Anstieg der Zellen, in denen die mRNA für IL-8 expressioniert wurde, detektiert werden (Egan *et al.* 1996). Sollte diese Kinetik in weiteren Versuchen bestätigt werden, könnte dies bedeuten, dass bei der Tungiasis die neutrophilen Granulozyten CINC-unabhängig in das Entzündungsgebiet einströmen oder die gewählten Untersuchungszeiträume für eine Detektion der CINC- Erhöhung im Serum zu spät gewählt waren.

Der Anstieg der IL-4 Konzentration im Serum in der vorliegenden Arbeit fand vor dem Anstieg von TNF- α und IL-1 β statt (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 12). Könnte dieser prompter Anstieg von IL-4, einem Schlüsselindikator für eine Th2- Immunantwort, in größeren Studien bestätigt werden, könnte dies eine frühe Prägung der naiven CD4- T- Lymphozyten zugunsten einer Th2- Typisierung bedeuten, wie sie bei der caninen Demodicosis, einer Ektoparasitose ähnlich der Skabies, beobachtet wird (Tani *et al.* 2002).

Eine frühe Entwicklung in Richtung einer Th2- Immunantwort könnte auch erklären, warum die IFN- γ Konzentration im Serum der infizierten Tiere nicht anstieg (Abb. 10). IL-10, ein gegenregulierendes Zytokin, zeigte einen Konzentrationsgipfel im Serum zum Zeitpunkt der höchsten Entzündungsaktivität zwischen dem 6. und 16. Tag (Abb. 13). Allerdings gelten auch bei den Beobachtungen zu IFN- γ und IL-10 die bereits mehrfach erwähnten Einschränkungen in

Bezug auf die Stichprobengröße und die Titerverläufe, die erst durch größer angelegte Arbeiten bestätigt werden müssen.

Der Vergleich des Quotienten aus der Konzentration von TNF- α und der von IL-10 während eines Untersuchungszeitraumes zeigte einen überproportionalen Anstieg der TNF- α -Konzentration in den ersten zehn Tagen der Erkrankung. Ab dem Ende der zweiten Woche war der relative Anstieg der IL-10- Serumkonzentration allerdings höher als der von TNF- α (Abb.14). Sollten weitere Studien diese Verläufe bestätigen, ist zu prüfen, ob der Konzentrationsanstieg von IL-10 durch immunsuppressive Moleküle des Parasiten bedingt sein könnte oder aber Ausdruck einer Modulation der Immunantwort durch den Wirt ist, die die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von TNF- α und IL-1 β , herunter reguliert, wie sie bei der Stimulation von humanen Monozyten durch Lipopolysaccharide beschrieben wurde (de Waal Malefyt *et al.* 1991). Eine ähnliche Kinetik des TNF- α / IL-10-Quotienten zeigte sich auch bei der akuten Malaria tropica des Menschen. So führte die Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit *Plasmodium falciparum* Antigen in vitro zu einem frühen Anstieg der TNF- α -Konzentration mit einem Maximum nach 4-8 Stunden und einer anschließenden Zunahme der IL-10-Konzentration mit einem Gipfel nach 24 Stunden im Sinne eines Feedback-Mechanismus (Ho *et al.* 1998).

Der Mechanismus der starken Entzündungsreaktion um den penetrierten Parasiten ist bislang unbekannt. Theoretisch kommen mehrere physiologische Abläufe in Betracht, die entweder einzeln oder in ihrer Summe zu der ausgeprägten Entzündungsreaktion führen.

Erstens stellt der hypertrophierende Floh in den oberen Hautschichten einen Fremdkörper dar, der durch die Volumenzunahme einen Druck auf das umliegende Gewebe erzeugt und so rein physikalisch Zellen zerstören kann, was seinerseits eine Entzündungsreaktion auslösen kann. Zweitens könnten vom Sandfloh freigesetzte proinflammatorische Faktoren eine unspezifische Entzündungsreaktion hervorrufen, wie es bei anderen Ektoparasitosen, beispielsweise bei der Myiasis der Fall ist (Otranto 2001). Drittens führt die nahezu immer vorhandene Superinfektion zu einer Stimulation von spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen (Feldmeier *et al.* 2002). Des Weiteren ist bekannt, dass *T. penetrans* Endobakterien des Genus *Wolbachia* in seinen Ovarien enthält (Heukelbach *et al.* 2004a). Die Antigene der Endobakterien könnten analog zur Situation bei der durch *Wuchereria bancrofti* bedingten okulären Filariosis eine ausgeprägte Entzündungsreaktion hervorrufen (Saint Andre *et al.* 2002). Diese Entzündungsreaktion wäre besonders heftig, wenn das Individuum bereits durch eine frühere Infektion mit *T. penetrans* und einer Freisetzung von Wolbachien sensibilisiert worden ist. Wiederholte Infektionen mit *Tunga penetrans* sind im Endemiegebiet die Regel.

Zum heutigen Zeitpunkt ist keine medikamentöse Behandlung der Tungiasis, welche nachweisbar den penetrierten Parasiten abtötet, verfügbar. Eine Pilotstudie mit einem Tropfen Silikonöl mit sehr geringer Viskosität, welches zweimalig im Abstand von sechs Stunden auf die kaudale Formation des Parasiten appliziert wurde, zeigte innerhalb von drei Tagen klinisch ein Absterben des Parasiten. Diese Tiere hatten geringere Serumkonzentrationen von TNF- α , IL-1 β und IL-10 am dreizehnten Tag, gemessen als Quotient zwischen Tag 0 und Tag 13, im Vergleich zu nicht behandelten Tieren (Tabelle 11). Das veränderte Zytokinmuster, zusammen mit den morphologischen Veränderungen des Flohes nach Silikonölapplikation, können als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass die Substanz aufgrund ihrer hohen Viskosität rasch das Absterben des Parasiten bedingt. Allerdings ist auch hier die Veränderung der Serumkonzentrationen der Interleukine aufgrund der geringen Stichprobengröße als ein erster Hinweis zu sehen, der durch größer angelegte Versuche bestätigt werden müsste.

Es ist bekannt, dass Silikonöl zum Absterben bakterieller Erreger und humanpathogener Pilze führt (Ozdamar *et al.* 2001). Es gibt jedoch keinen wissenschaftlichen Nachweis über die Wirkung von Silikonöl bei Arthropoden. Im Falle des penetrierten und hypertrophierten *T. penetrans*- Weibchens ist nahe liegend, dass das niedrigvisköse Öl über die Stigmata in die Trachea eindringt und die Aufnahme von Sauerstoff in den Alveolen verhindert. Da der penetrierte Sandfloh nur über die vier abdominellen Stigmenpaare atmen kann, die an der Außenseite des Endkonus münden, ist denkbar, dass bereits ein gezielt aufgebracht Tropfen zu einer Asphyxie führt. Andererseits ist es vorstellbar, dass das Silikonöl in die Grenzschicht zwischen Wirtsgewebe und Chitinhülle eindringt und das Chitin aufweicht. Da das Herz an Bändern auf der Innenseite des Chitinexoskeletons aufgehängt ist, führt ein Aufweichen der Chitinhülle zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzens. Dies wiederum führt ebenfalls zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Untersuchungsergebnisse sagen, dass die Wistarratte ein geeignetes Modell für die Tungiasis ist. Die Tiere können unter kontrollierten Bedingungen infiziert werden, zeigen einen natürlichen Krankheitsverlauf, der dem des Menschen in klinischer, morphologisch- mikroskopischer und histopathologischer Hinsicht sehr ähnlich ist und ermöglichen auch die zukünftige Analyse der starken Entzündungsreaktion. Vermutlich ist die Wistarratte auch ein geeignetes Modell um die Wirksamkeit topischer oder systemischer Pharmaka zu untersuchen.