

4 MATERIAL UND METHODEN (TEIL I)

4.1 Erreger: Stämme und Passagierung

Der ungeklonte *T. cruzi*-Stamm "Chile 5" stammt aus Cachiyuyu, einem Dorf in der südlichen Atacamawüste, Provinz Coquimbo, Chile. Er bildet mit den dort lebenden *Triatoma infestans* ein natürliches System, bei dem 1979 19-32% der Triatominen dieser Art mit dem Flagellaten infiziert waren (Schaub & Schottelius 1984). Die Flagellaten wurden nach ihrer Isolierung durch Untersuchung der Kinetoplasten-DNA, Proteinelektrophoresen und einen Agglutinationstest mit *Aaptos papillata* Lektin als "*Trypanosoma cruzi*-like" identifiziert. Stamm Chile 5 war der einzige von fünf untersuchten Isolaten gleicher Herkunft, der schon in der zweiten Mauspassage letal war. Da viele Pseudocysten im Herzmuskel gefunden wurden (Schaub & Schottelius 1984) und bei Mäusen schon früh in der Erkrankung z.T. schwere Lähmungserscheinungen auftreten, ist der Stamm wahrscheinlich zu den mehr myotropen *T. cruzi* zu rechnen. Die Blutflagellaten haben eine Länge von $19,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$. Isoenzym-Elektrophoresen belegen seine Zuordnung zum Zymodem 1 (Schaub & Schottelius 1984). Der Erreger wurde seit 1979 in *Triatoma infestans* und Mäusen in unregelmäßigem Wechsel passagiert bzw. bei -79°C als Stabilat aufbewahrt.

Der *T. cruzi*-Stamm Tulahuén stammt ebenfalls aus Chile und wurde in verschiedenen Labors z. T. axenisch gehalten, z.T. in kontinuierlicher Mauspassage. Wir erhielten ihn von Dr. S. Croft, London, und infizierten damit Mäuse und Wanzen. An letztere mußte er erst durch mehrere Passagen adaptiert werden, um eine ähnlich stabile Infektion wie mit dem Stamm Chile 5 zu erreichen.

Beide Stämme wurden auch in LIT-Medium kultiviert. Hierbei kann die Metazyklogene in der fünften Passage durch Inkubation in TAU-AAG-Medium induziert werden (Contreras et al. 1994).

4.2 Wanzen: Stämme, Aufzucht und Infektion

Der Zuchtstamm von *Triatoma infestans* stammt ebenfalls aus Cachiyuyu, Chile. Drei Kolonien dieser Triatominenart befanden sich seit 1979 in Institutszucht, wurden 1991 vereinigt und bilden seitdem den Stamm "Chile" (Kollien & Schaub 1998).

Dipetalogaster maximus lebt in der Baja California, einer Nebelwüste in Mexiko. Dort sollen die Insekten an Eidechsen und kleinen Nagetieren Blut saugen (Ryckman & Ryckman 1963). Die Laborzucht geht auf Fänge von P. Marsden zurück (Marsden et al. 1979); den verwendeten Stamm erhielten wir 1979 vom Tropeninstitut Hamburg.

Der Zuchtstamm von *Rhodnius prolixus* "Dr. Gonzales" stammt ab von Wildfängen aus San Juan de Arama (Meta, Kolumbien) und wird seit 1962 unter Laborbedingungen gehalten. Unseren Zuchtansatz erhielten wir 1982 von Prof. Dr. D'Alessandro-Bacigalupo (Tulane University; New Orleans, USA).

Gehalten wurden die Tiere in mit Gaze verschlossenen Zwei-Liter-Plastikbechern (mit einem darin enthaltenen Pappkreuz) bei 26°C, 60-70% relativer Luftfeuchte und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden (Schaub 1989). Im ersten Larvenstadium wurden sie an Mäusen gefüttert, danach erfolgte die Fütterung alle zwei bis vier Wochen am Huhn. Dafür wurden Hühner rücklings auf einem V-förmigen Holzbock fixiert und ihnen wurden unterhalb des Flügels an einer ohnehin nur dünn befiederten Stelle die Federn entfernt. Auf diese Stelle wurde je ein "Wanzenglas" kopfüber befestigt, so daß die Wanzen von der Pappe aus, auf der sie saßen, durch die Gaze stechen konnten. Nach dieser "Blutspende" wurde den Hühnern intramuskulär ein Eisenpräparat verabreicht.

Zusätzlich erhielten die Wanzen regelmäßig symbiotische Darmbakterien – *Nocardia*- und *Rhodococcus*-Arten –, die in Kulturmedium in die Wanzengläser getropft von den Wanzen aufgenommen und als Vitaminlieferanten benötigt wurden.

Für eine "sterile Aufzucht" wurden Wanzen-Eier desinfiziert und die steril gehaltenen Larven zunächst an einer mit Alkohol desinfizierten Nacktratte unter der Reinraumwerkbank gefüttert, dann weiter an einem geschorenen, gleichermaßen behandeltem Huhn oder mit Schweineblut an einer Membran, beides ebenfalls unter der Reinraumbank. Bei letzterem wurden

dünne Silikonmembranen auf einer Metallplatte autoklaviert, unter der Reinraumwerkbank auf eine Wärmeplatte gelegt und mit sterilem Schweineblut unterfüllt. Die Wanzen wurden in einem ebenfalls autoklavierten Plastikring mit enthaltenem Pappkreuz darauf angesetzt. Die Wärmeplatte war notwendig, um die Thermorezeptoren der Wanzen zu reizen und sie so zur Fütterung zu animieren (Schaub 1990). Als Sterilkontrolle wurden immer wieder Wanzenkot auf Agarplatten ausgestrichen und inkubiert.

Wanzen im ersten Larvenstadium wurden an infizierten Ratten oder Mäusen mit *T. cruzi* infiziert, wobei an einer Ratte über mehrere Tage verteilt bis zu 1.000 Wanzen gefüttert werden konnten, an einer Maus bis zu 100. Die Ratten wurden zu diesem Zweck mit Keta-
min/Rompun in Narkose gelegt, die Mäuse meist nur in enge Käfige gesperrt. Um hierfür nicht noch weitere Mäuse infizieren zu müssen, wurden – wenn möglich – aus vorhergehenden Versuchen schwerkranke Tiere mit hohen Parasitämien verwendet, die einen weiteren Tag ohnedies nicht überlebt hätten. Nach der Infektion wurden nicht ganz vollgesogene Larven noch einmal an Mäusen nachgefüttert, um eine gleichmäßige Entwicklung der Gruppe zu gewährleisten. War die Infektion in der Wanze erst einmal etabliert und befanden sich Flagellaten im Rektum, konnte am Huhn weiter gefüttert werden. Die Flagellaten wurden dort nicht mehr von dem frisch aufgenommenen Hühnerblut lysiert.

4.3 Symbionten

Die für *Triatoma infestans* verwendeten Symbionten wurden ehemals aus Wildfängen isoliert und als *Nocardia corynebacteroides*-like identifiziert (Eichler et al. 1996). Sie wurden in Standard 1 Nährboullion (Merck, Darmstadt) kultiviert. Bei *Dipetalogaster maximus* wurde ein Gemisch verschiedener Symbionten eingesetzt, an *Rhodnius prolixus* wurde *Rhodococcus equi* als Symbiont verfüttert. *Nocardia corynebacteroides* gilt als fakultativ pathogen.

4.4 Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen

Mäuse der Stämme C57 Bl/6 und Balb/c nu/nu beiderlei Geschlechts wurden verwendet, beide aus der Zucht des Max-Planck-Institutes für Immunbiologie, Freiburg. Alle Tiere waren mindestens acht bis zehn Wochen alt und hatten somit ein voll ausgereiftes Immunsystem. Auch die für die Wanzenfütterung verwendeten Nacktratten stammten vom MPI Freiburg.

Stamm C57 Bl/6 wurde ausgewählt, da er sich bei vorhergehenden Versuchen als gut empfänglich für unseren Erreger-Stamm erwiesen hatte. Balb/c Mäuse waren zu resistent, Stamm 129 SV zu suszeptibel (Hölscher, pers. Mitteilung). Die Tiere wurden unter normalen Bedingungen in Gruppen von vier bis sechs Mäusen in Makrolonkäfigen gehalten. Da in dem Bestand ab und zu Milben auftraten, wurden einige der Mäuse Wochen vor den Versuchen mit Ivomec behandelt.

Die Balb/c nu/nu-Mäuse sind eine Thymus-depletierte Mangelmutante des Balb/c-Stammes und werden daher niemals vollständig immunkompetent. Sie wurden, da wir keinen SPF-Bereich zur Verfügung haben, in Filtercap-Käfigen gehalten, nur unter der Reinraumwerkbank versorgt und auch im Versuch dort behandelt. Diese Tiere bekamen ausschließlich autoklaviertes Spreu und Futter und mit Salzsäure auf pH 3 angesäuertes Wasser, um das Risiko von Sekundärinfektionen möglichst gering zu halten. Dennoch traten bei ihnen häufig Darmvorfälle und Abszesse im Kopfbereich auf. Diese Sekundärerkrankungen führten vor und während der Versuche leider immer wieder zu größeren, vorher nicht absehbaren Verlusten.

Nach der Lieferung aus der Zucht bekamen alle Tiere mindestens eine Woche Zeit, um sich an die hiesigen Bedingungen zu adaptieren. Im Sicherheitslabor, in dem sie sich während der Versuche befanden, schwankten die Temperaturen zwischen im Winter ca. 18°C und im Sommer bis zu fast 30°C. Ein Lichtprogramm besteht dort nicht, die Tiere waren dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt.

Die Versuchsgruppen wurden nicht zufällig gebildet, sondern nach einer möglichst ausgeglichenen Altersverteilung der gerade zur Verfügung stehenden Mäuse zusammengestellt. Die einzelnen Individuen wurden in den Versuchen mittels eines Zahlencodes durch Lochmuster in den Ohren gekennzeichnet.

Narkotisiert wurden die Tiere mit Ketamin (Upjohn, Heppenheim) und Rompun (Bayer, Leverkusen) in Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung (Rezept siehe Anhang). Da die Narkosedauer in den Stichversuchen – oft wollten die Insekten die angebotenen Mäuse (trotz vorangegangener Hungerperioden) nicht anstechen – häufig sehr lang war, wurden die Mäuse auf eine Wärmeplatte mit etwas über 38°C gelegt, nach Ende des Versuches mit

0,5-1 ml physiologischer Kochsalzlösung subkutan "infundiert" und mit Augensalbe (Posifenicol; Ursapharm, Saarbrücken) versorgt.

Die Tötung von Mäusen erfolgte immer durch zervikale Dislokation.

Alle Tierversuche wurden genehmigt nach Aktenzeichen 23.8720 Nr 20.A.9 bei der Bezirksregierung Arnsberg.

4.5 Gewinnung von Trypanosoma cruzi aus Wanzenkot und -urin

Materialien:

- mit Gaze geschlossenes Glas oder "Fütterring" mit Pappkreuz
- Federstahlpinzette (zum Greifen der Wanzen, FISHER-SCIENTIFIC, Schwerte)
- ein fixiertes Huhn
- Eppendorfhütchen (2 ml)

Wanzen im fünften Larvenstadium wurden am Huhn angefüttert, in fast vollgesogenem Zustand abgenommen und mit dem Abdomen voran in Eppendorfhütchen gesetzt. Die Fäzes wurden über einen Zeitraum von etwa ein bis zwei Stunden gesammelt und die Flagellatenkonzentration einer 1:10-Verdünnung in einer Neubauerkammer gezählt.

Wenn nur geringe Mengen an Fäzes benötigt wurden, wurden einzelne Wanzen am Huhn in einem oben offenen und unten mit Gaze überzogenen Ring angefüttert, in mäßig vollgesogenem Zustand abgesammelt und mit dem abdominalen Ende nach unten in ein Eppendorfhütchen gesetzt, um die abgegebenen Fäzes aufzufangen. Dabei wurde meist nur für etwa eine Stunde gesammelt, um eine zu starke Verdünnung der Flagellatenkonzentration mit "Urin" zu vermeiden.

Um die gewünschte Konzentration einzustellen, wurde entweder mit uninfizierten Wanzenfäzes verdünnt oder für eine Anreicherung 20 min. bei 400g zentrifugiert. Beides war meist nicht notwendig, da die Flagellatenkonzentration bei einem hohen Anteil an metazyklischen Trypomastigoten fast jedesmal bei ca. 1×10^6 T. cruzi/ml lag, was bei einer früheren Untersuchung der durchschnittlichen Konzentration im ersten abgesetzten Kottropfen entsprach (Schaub & Lösch 1988).

4.6 Differenzierung der Trypanosoma cruzi-Stadien nach Form und Verhalten

(nach Schaub 1985)

Materialien:

- Objektträger und Deckgläser
- Osmiumtetroxyd (Abfall aus der Elektronenmikroskopie)
- Giemsa-Färbung (s. Anhang)

In vivo können infektiöse Trypomastigote und nicht infektiöse Epimastigote grob anhand von Morphologie und Bewegungsweise im Phasenkontrast unterschieden werden:

- Trypomastigote sind schmal und relativ klein, bewegen sich aufgrund ihrer langen undulierenden Membran in ihrer vollen Länge und schwimmen nicht in eine bestimmte Richtung, sondern zappeln "auf einer Stelle".
- Epimastigote sind meist etwas größer, dicker und unregelmäßiger geformt, bewegen nur ihr Flagellum und schwimmen mehr oder weniger in eine Richtung.
- Sphaero- und Amastigote sind in den Fäzes unter den gegebenen Haltungsbedingungen relativ selten und für die durchgeführten Versuche vernachlässigbar.

Überprüft werden konnte diese Auszählung nach den oben genannten Kriterien im Giemsa-gefärbten Ausstrich, bei dem die Stadien anhand der Stellung von Kern und Kinetoplast zueinander und zum Vorderende des Zellkörpers identifiziert werden können (s. auch Abb. 1b):

- Bei Trypomastigoten liegt der Kern fast endständig am posterioren Pol der Zelle, das Flagellum zieht sich über die volle Länge des Flagellaten und ist mit ihm durch eine undulierende Membran verbunden.
- Bei Epimastigoten liegt der Kinetoplast neben oder "vor" dem Kern; sie besitzen ein langes, freies Flagellum.

Diese Strukturen waren noch besser zu erkennen, wenn die Parasiten mit Dämpfen von Osmiumtetroxyd vorfixiert wurden, indem man einen unter einem Objektträger hängenden Tropfen mit darin enthaltenen Flagellaten ca. 15 sec. auf die Öffnung eines mit der Chemikalie gefüllten Schnappdeckelgläschens hielt und diesen danach ausstrich und lufttrocknete (Schaub & Schottelius 1984).

4.7 Komplement-Lysis-Test

(modifiziert nach Contreras et al. 1985)

Materialien:

- Humanserum
- für die Herzblutentnahme bei Mäusen:
 - Narkotika
 - 1 Sezierschere (AESKULAP, Tuttlingen)
 - 1 leichtgängige 5 ml-Spritze
 - 1 Tropfen Heparin (SEROMED BIOCHROM, Berlin)
- Eppendorfhütchen (2ml) mit einem "Kragen" aus Styropor als Schwimmer
- Wasserbad
- Neubauerkammer

Um bei nicht aufgereinigten *T. cruzi* sicher den Anteil an infektiösen Stadien bestimmen zu können, wurden die Flagellaten in Wanzenkot und -urin ausgezählt, im Verhältnis 1:2 mit Humanserum verdünnt, 45 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und danach erneut in der Neubauerkammer ausgezählt. Dies war manchmal etwas schwierig, weil die Flagellaten sich nach der Inkubation bevorzugt an in der Lösung befindliche Partikel anhefteten und daher sehr ungleichmäßig in der Lösung verteilten.

Um zu überprüfen, ob auch Maus-eigenes Komplement bestimmte Flagellaten lysiert, wurde eine Komplement-Lysis mit Serum einer adulten C57 Bl/6 durchgeführt. Zur Herzblutentnahme wurde die Maus narkotisiert (s. Anhang). Dann wurden die Haut und anschließend Abdomen und Brustkorb in der ventralen Medianen mit einer Sezierschere eröffnet. Dabei wurde das Zwerchfell durchstoßen, in diesem Moment kollabierte die Lunge des Tieres und es setzte Schnappatmung ein. Das Herz schlug jedoch noch einige Minuten weiter. Nun wurde das Sternum vollständig aus dem Brustkorb herausgeschnitten. Unter Sichtkontrolle konnte daraufhin die Kanüle einer mit einem Tropfen heparinisierten Spritze in die ventral liegende Hauptkammer des Herzens mit einem kurzen Ruck eingestochen werden. Unter sehr behutsamer Aspiration – das dünne Gewebe kollabierte schnell – konnten nun 1-1,5 ml Blut aus dem noch immer schlagenden Organ gewonnen werden. Da kein steriles Blut benötigt wurde, wurde das Herz schließlich aufgeschnitten und das restliche Blut aus der Brusthöhle gesammelt. Der Tod der Maus trat beim Ausbluten ein. Das gewonnene Blut wurde bei 200 g für

15 min. zentrifugiert und das Serum abpipettiert. (Da Maus-Erythrozyten sehr leicht zerplatzen, war das Serum etwas rötlich).

4.8 Isolierung von Trypomastigoten aus Wanzenfäzes mit DEAE-Cellulose

(nach Schaub & Lösch 1988)

Materialien:

- 2 Liter Bechergläser aus Plastik
- dazu passende Drahtgitter als Sitzflächen für die Wanzen
- Aluminiumfolie
- 50 ml und 12 ml Falcon-Röhrchen, spitz zulaufend
- 1 Glas-Säule, Ø 2 cm (Eigenbau)
- dazu passender Gummischlauch mit Verschuß
- Ständer für die Säule (höhenverstellbar)
- DEAE Zellulose ("Sephacel"; PHARMACIA BIOTECH, Uppsala)
- Pufferlösungen für die Säulenisolierung (s. Anhang)
- Neubauerkammer

Für die Aufreinigung von Trypomastigoten aus Wanzenkot und -urin wurde zunächst eine recht große Anzahl an Flagellaten benötigt. Um diese zu erhalten, wurden 200 bis 400 Wanzen des vierten oder fünften Larvenstadiums in Bechergläsern mit einem Drahtgittergerüst anstelle der üblichen Pappe zwei Stunden lang am Huhn gefüttert und die Gläser anschließend mit Folie bedeckt, um ein Eintrocknen des Wanzenkotes zu vermeiden. Über weitere zwei Stunden sammelten sich die Fäzes am Boden der Bechergläser. Je älter das eingesetzte Larvenstadium, umso ergiebiger war die Ausbeute. Schließlich wurden die Wanzen behutsam vom Drahtgerüst abgesammelt und in frische Gläser umgesetzt; sie standen für mindestens einen weiteren Versuch zur Verfügung, bevor sich die fünften Larvenstadien zu Adulten häuteten und nicht mehr optimal eingesetzt werden konnten.

Der Wanzenkot und -urin – von 200 Tieren erhielt man 7-12 ml – wurde abpipettiert und das Glas 2× mit PBSG+P gespült. Die Supplemente im sonst üblichen PBS, Glukose und Prolin

(=PBSG+P), sollten als Nährstoffe dienen. Von dem unverdünnten Kot wurden Ausstriche angefertigt werden, um hinterher das Gelingen der Isolierung kontrollieren zu können.

Die Fäzes sedimentierten ca. 10 min und es wurde nur mit dem Überstand weitergearbeitet, um die ganz groben Bestandteile zu entfernen. Dieser Überstand und die Röhrchen mit Spülflüssigkeit wurden nun 20 min. bei 400 g und 4°C zentrifugiert, die dabei entstehenden Überstände verworfen und die Pellets in PBSG+P resuspendiert und vereinigt und dann erneut zentrifugiert. (Die verbleibenden Überstände sollten sicherheitshalber jeweils in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und erst nach Beendigung des Versuches verworfen werden!)

Die Glassäule wurde nun bis zu einer Höhe von etwa 3-4 cm mit vor der Verwendung gewaschener DEAE-Zellulose gefüllt und die Sedimentation abgewartet (s. Anhang). Je mehr Ausgangsmaterial (Fäzes) vorhanden war, um so höher mußte die Säule befüllt werden. Die Zellulose wurde mit 50 ml PBSG+P gewaschen und der Puffer bis auf einen minimalen Überstand über dem Säulenmaterial ablaufen gelassen. Dann wurden vorsichtig die Flagellaten in ihrem Medium darauf gegeben und wiederum die Sedimentation abgewartet.

Die Flagellaten wurden mit PBSG+P sehr langsam durch die Säule gewaschen. Dabei blieben die positiver geladenen Epimastigoten und auch fast alle störenden Substanzen der Fäzes in der Zellulose hängen, fast nur Trypomastigote gelangten hindurch. Die Flagellaten wurden in 8 Röhrchen mit jeweils 1,5 ml PBSG+P/1%FCS oder Ovalbumin aufgefangen; diese Proteine sollten die Oberfläche der Flagellaten schützen und eine Anheftung verhindern. Die Auffangröhrchen wurden bis auf jeweils 5 ml gefüllt und es wurden in der zweiten und dritten Fraktion vermehrt, in den darauffolgenden Fraktionen weniger bis schließlich keine Trypomastigote gefunden. Das Gelingen der Isolierung konnte nachgewiesen werden, indem vor und nach der Säulenisolierung angefertigte Ausstriche miteinander verglichen wurden.

Die Flagellaten in den einzelnen Fraktionen wurden erneut 20 min. abzentrifugiert, die kaum sichtbaren Pellets zweimal mit 1-2 ml PBSG+P gewaschen und die Anzahl der gewonnenen Flagellaten mit der Neubauerkammer ermittelt.

Im Vergleich zur Ausgangsmenge hatte man meist einen Verlust von etwa einer Zehnerpotenz, dafür >95-97% Trypomastigote in hoher Konzentration in einer klaren Pufferlösung fast ohne störende Kotbestandteile. Die Flagellatenernte schwankte je nach Fütterungszustand der

Wanzen zwischen 1×10^5 und 1×10^6 Flagellaten/ml in 8-12 ml Wanzenkot und Urin nach zweistündigem Auffangen der Fäzes von ca. 150 Wanzen. Bei der Sammlung von Fäzes einzelner Wanzen lag die Flagellatenkonzentration meist bei $1-1,5 \times 10^6$ Fl/ml.

Bei einer besonders gut infizierten Gruppe an Triatominen betrug das Verhältnis von Trypomastigoten zu Epimastigoten in den Wanzenfäzes ca. 9:1. Bei anderen Gruppen, die nur alle ein bis zwei Monate gefüttert worden waren, betrug der Anteil an Epimastigoten 20-50%.

Ein Komplement-Lysis-Test mit Serum aus einer erwachsenen C57 Bl/6-Maus, der mit den aufgereinigten Flagellaten durchgeführt wurde, ergab eine weitere Verringerung der Trypanosomenanzahl um 11%. Diese Dezimierung fand bei der Kontrollgruppe mit inaktiviertem Mausserum nicht statt.

4.9 Intradermale Infektion

Materialien:

- Akku-Schermaschine (HAUPTNER, Solingen)
- 1-2 Papierrollen (z.B. aus Laborpapier)
- 1 ml Spritze
- 25 µl Hamilton-Spritze mit Luer-Ansatz (HAMILTON, Darmstadt)
- 30 gauge Kanülen ("Microlance", BETSON DICKINSON GmbH, Heidelberg)
- 1 kleiner gebogener Péan (HAUPTNER, Solingen)

Die Mäuse wurden aus arbeitstechnischen Gründen am Vortag der Infektion narkotisiert und geschoren. Um ein standardisiertes Volumen bzw. eine standardisierte Anzahl Flagellaten bei einer Infektion zu verwenden, wurden die *T. cruzi* im jeweiligen Medium intradermal injiziert. Intradermal deshalb, weil dieser Weg der natürlichen Eintrittspforte – dem Stichkanal – am nächsten kommt (s. Kap 3.1.2.). Der Vergleichbarkeit halber und wegen der nur mäßigen Lymphdrainage wurde auch hier der Rückenbereich gewählt. Injiziert wurden je 20µl Lösung aus einer 25µl-Hamiltonspritze mit Luer-Ansatz und einer 30 gauge Kanüle. Dieses Volumen konnte gerade noch injiziert werden, ohne daß die Flüssigkeit durch den entstehenden Druck in die subkutanen Gewebe leckte (Crowle 1976). Die Kanüle konnte nicht mit der kleinvolumigen Hamilton-Spritze befüllt werden, zu diesem Zweck wurde eine normale 1 ml-

Spritze verwendet. Da nur bei nicht infektiösem Material mit den Fingern der linken Hand eine Hautfalte aufgezogen werden sollte, in die Kanüle dann behutsam "eingefädelt" wird, sind die Finger in diesem Fall durch einen gebogenen Péan ersetzt worden. Die Maus dabei erhöht zu lagern – z. B. auf einer dicken Papierrolle – erleichterte die Handhabung der Instrumente. Am sichersten war, eine zweite Person den Péan entfernen zu lassen und selbst dabei die Kanüle zu fixieren, da sich bei der Arbeit mit so langen Hebeln in einer nur wenige Zellschichten dicken Haut der Sitz der Kanüle leicht verschieben kann. Bei gelungener intradermaler Injektion entstand eine Quaddel, die sich mit der Haut verschieben ließ und auch nach mehreren Minuten noch sichtbar war.

Diese Injektionstechnik wurde durch Injektion von in Wasser gelöster Carbo medicinalis überprüft. Das betreffende Hautstück wurde in Paraffin eingebettet und geschnitten: Die Kohlepartikel fanden sich im unteren Bereich der Cutis bzw. an der Grenze zwischen Cutis und Subcutis. Gleichzeitig wurde dabei die Dicke der Rückenhaut bei 8-10 Wochen alten Mäusen ermittelt.

4.10 Vermessung der Mundwerkzeuge von Wanzen

Materialien:

- große Petrischale (NUNC)
- 1 kleine, scharfe Sezierschere
- Objektträger und Deckgläser
- Entellan (MERCK)
- Technovit (HERAEUS KULZER, Wehrheim)

Um einzelne Wanzenrüssel und deren Eindringtiefe in und unter die Maushaut zu vermessen, wurden Wanzen (*Dipetalogaster maximus* L3 und L4, *Triatoma infestans* L5) an narkotisierten Mäusen gefüttert und ihnen während des Saugaktes die Rüssel abgeschnitten. Die Mundwerkzeuge wurden danach entweder mit einer feinen Pinzette aus der Haut gezogen und auf einem Objektträger unter Entellan fixiert oder das den Stich umgebende Hautstück herausgeschnitten und mit noch darin steckendem Rüssel in Kunstharz eingebettet. Der Durchmesser der Mundwerkzeuge im Bereich der in der Haut verankerten Mandibeln und im gesamten

Verlauf der Maxillen wurde mittels einer im mikroskopischen Okular befindlichen Skala vermessen.

4.11 Salivarektomie an lebenden Wanzen

Materialien:

- 2 mit Wachs gefüllte Petrischalen (PLANO, Wetzlar)
- Insektennadeln (PLANO)
- Skalpellklingen (an Schneide und Rücken abgerundet und so angeschliffen, daß die Spitze an beiden Seiten schneidet; HAUPTNER, Solingen)
- 2 Dumont-Pinzetten der Stärke 5 (PLANO)
- 1 "Augenschere" oder winzige Präparierschere (EICKEMEYER, Tuttlingen)

Für Infektionsversuche, bei denen der Faktor Wanzenspeichel ausgeklammert werden sollte und dennoch der Stichkanal als Eintrittspforte erforderlich war, mußten lebende Wanzen so präpariert werden, daß sie zwar stechen konnten, aber mit dem Stich keinen Speichel injizierten. Als geeignetstes Objekt bot sich aufgrund seiner Größe *Dipetalogaster maximus* an. Anders als bei *Rhodnius* (Ribeiro 1981) sind bei dieser Art die vier weißlichen Speicheldrüsen am besten von dorsal aus zugänglich.

Die Wanze wurde zunächst in einer Wachsschale immobilisiert: Mit zwei sich kreuzenden Insektennadeln wurden gleichzeitig die Hinterbeine gestreckt, und das Abdomen wurde nach unten gedrückt. Gleichzeitig wurden mit den Fingern der linken Hand der Kopf des Insekts und die Vorderbeine gehalten, um ein Widerlager für den Druck zu schaffen, den der Schnitt in den Chitinpanzer erzeugt. Mit dem Skalpell wurde nun behutsam das zweite Thoraxsegment (Tergit) von caudal her im Intersegmentalbereich gelöst und nach vorne aufgeklappt, so daß darunter der Fettkörper in der Körperhöhle sichtbar wurde. Dieser sollte, wenn nötig, nur sehr vorsichtig zur Seite gelagert werden; zerstörte man ihn, wurde das "Operationsfeld" hoffnungslos unübersichtlich. Durch leichten Druck auf das Abdomen konnten die Speicheldrüsen meist in die Öffnung vorgelagert werden, wo sie mit einer Dumont-Pinzette erfaßt und sanft nach außen gezogen werden konnten, ohne das sehr dünne Gewebe zu zerstören. Auch der Zug an den Ausführungsgängen sollte möglichst gering gehalten werden. Letztere wurden mit einer Augenschere zerschnitten und die Drüsen entnommen. Die Suche nach dem

kleineren, dem Oesophagus anliegenden Drüsenpaar war manchmal etwas aufwendiger, da sie gerade bei Wanzen, die etwas länger gehungert hatten, kaum zu sehen waren und bei dem Versuch, sie aufzufinden, der Oesophagus und der Herzschauch mit ihnen verwechselt und verletzt werden konnten. Nach erfolgreicher Operation wurde das Chitinfragment mit sanftem Druck wieder in seine ursprüngliche Lage gebracht. Die Wanzen wurden nicht mit Histokleber, Sprühpflaster oder Wachs verschlossen, da die Überlebensrate ohne diese Hilfsmittel höher ausfiel. Wanzen, die schon kurz nach der Präparation motorische Störungen zeigten, verendeten meist kurze Zeit später. Bei vielen Insekten traten nach der Behandlung verlangsamte Bewegungen und ein eingeschränktes Reaktionsvermögen auf.

Die operierten Tiere konnten bereits eine Stunde später für Stichversuche verwendet werden. Die beste Zeit für ihren Einsatz war aber der jeweils folgende Tag, wenn sich die Tiere vom Streß durch die Behandlung erholt hatten. Sehr viel länger als ein bis zwei Tage post operationem überlebte keines der Tiere, sie vertrockneten vermutlich durch die Öffnung in ihrem Panzer. In dieser Beziehung wesentlich erfolgreicher waren Ribeiro und Garcia (1981), bei denen salivarektomierte *Rhodnius prolixus* die Operation um mehrere Monate überlebten.

Eine Salivarektomie bei *Triatoma infestans* gelang leider nicht.

4.12 Auftropfversuche

Materialien:

- große Petrischalen (Ø ca. 20 cm, FISCHER SCIENTIFIC, Schwerte)
- entweder: Plastikröhrchen (Ø 2-3 cm) mit "Sitzpappen" und Gaze vor der Öffnung
Heizplatte
- oder 1 große Petrischale
leere Objektträger-Schachteln
kleine Stücke Aluminiumfolie
- 1 feiner Filzstift
- Aluminiumfolie

Den Mäusen wurde am Vortag in Narkose der Rücken mit der Schermaschine möglichst nackt geschoren; so hatten die eventuell dabei auftretenden Mikroläsionen Zeit, sich zu schließen (Marsden 1967b).

Die Mäuse wurden für den eigentlichen Versuch erneut narkotisiert und in große Petrischalen gelegt, um sich eventuell befreiende Wanzen unter Kontrolle zu behalten. Für den Ansatz der Wanzen gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

Zum einen konnten man die Wanzen in kleine Plastikröhrchen gesteckt werden, in denen sie auf einer eingepaßten Pappe saßen und durch eine Gaze den gewünschten Bereich der Maus anstechen konnten. In diesem Fall war es sehr wichtig, die Maus mit einer Heizplatte warm zu halten. Die kleinen Tiere kühlten in Narkose sehr schnell aus und wurden dadurch als Nahrungsquelle unattraktiv. Da die Wanzen sich durch die Enge des Röhrchens gestört fühlten, waren sie nur durch Wärme zu einer Mahlzeit zu animieren. Eine weitere Schwierigkeit bei diesem Versuchsaufbau bestand in der durch das angelehnte Röhrchen eingeschränkten Handlungsfreiheit: Die Stichstelle mußte mit einem Filzstift markiert werden können, ohne die Wanze zu stören.

Besser bewährt hat sich folgender Versuchsaufbau: Zwei Mäuse wurden auf der Seite liegend, mit den Füßen zum Schalenrand und jeweils gegenüber in eine große Petrischale gelegt. Damit sie nicht auskühlten, wurden sie auf kleine Stückchen Alufolie und auf ein Taschentuch gebettet. Mit kleinen Schachteln aus glatter Pappe (z. B. Objektträger-Schachteln), an denen die Wanzen nicht ohne weiteres hochklettern konnten, wurde im Zentrum der Petrischale ein Bereich abgeteilt. Die Mausrücken bilden dabei einen Teil der "Wand". In diesen Bereich wurden mehrere Wanzen gesetzt, die die Mausrücken nun vom Boden aus anstechen konnten. Die Insekten mußten dabei auf Filterpapier sitzen, da sie sonst beim Anstich abrutschten und bald aufgaben. Bei diesem Versuchsaufbau durfte keine Wärmeplatte verwendet werden; eine solche "Fußbodenheizung" irritierte die Wanzen zu stark. In letzterem Versuchsaufbau war es relativ leicht, die Einstichstelle zu markieren.

Zu beachten war in beiden Fällen, daß keine zwei Einstiche so dicht zusammen lagen, daß die aufgetropften *T. cruzi* mehr als eine Eintrittspforte bekamen. Dasselbe Problem stellte sich auch bei Wanzen, die beim Probing mehrmals ansetzen. Dieses Verhalten trat zum einen auf, wenn die Triatominen vor dem Versuch zu lange gehungert hatten, zum anderen, weil die Maushaut im Rückenbereich nicht sehr gut durchblutet ist: Auch wenn die Wanzen erfolg-

reich ein Blutgefäß gefunden hatten, dauerte der Saugakt deutlich länger als am Huhn oder der Membran.

Bei Versuchen mit unpräparierten Wanzen wurde nach dem Einstich abgewartet, bis der Körperrumfang der Insekten zunahm und sie somit nachweislich Kontakt zur Blutbahn hatten. Salivarektomierte Wanzen sollten vor der Entnahme mindestens 10 min. an derselben Stelle probiert haben. Diese Zeitspanne entsprach in unseren Versuchen im Schnitt einem erfolgreichen Probing unpräparierter Tiere. Präparierte Insekten hatten nur manchmal Erfolg in der Suche nach einem Blutgefäß (Ribeiro & Garcia 1981). Aber auch bei den hierbei erfolgreichen salivarektomierten Wanzen wurde bei nachträglicher Kontrolle keine Speicheldrüse mehr gefunden.

Nach Entnahme der Wanze wurde die Stichstelle mit 10µl der Parasitensuspension betropft und der Tropfen sanft verrieben, um kleinste Luftpolster zwischen den Haaransätzen zu vermeiden und so einen sicheren Kontakt der Lösung mit der Einstichstelle zu gewährleisten. Die Maus verblieb 15 min. in einer Feuchtekammer, um ein tropisches Klima zu imitieren und ein vorzeitiges Austrocknen des Tropfens zu verhindern. Damit die Mäuse in dieser Kammer trocken und warm blieben, wurden sie wiederum auf Alufolie gelegt. Bei fast allen Versuchen – die Nacktmausversuche 17 und 18 (Abb. 11-16) ausgenommen – wurden die Tropfen nach dieser Einwirkzeit abgetupft, um den Versuch zu standardisieren und einer oralen Infektion der aufwachenden Mäuse vorzubeugen.

4.13 Parasitämiebestimmung

Materialien:

– Neubauer- und Petroff Hausser Kammer

Die patenten Infektionen der Mäuse wurden über Beobachtung der Parasitämien verfolgt. Ein Blutstropfen wurde gewonnen, indem der Schwanz einer Maus seitlich eingeritzt oder nur der Schorf von der kleinen Wunde des Vortages entfernt wurde. Bei den C57 Bl/6 Mäusen und auch bei den noch gesunden Nacktmäusen trat danach von selbst ein Blutstropfen aus. Sehr kranke Tiere und viele der Nacktmäuse mußten "gemolken" werden: mit zwei Fingern wurde das Schwanzblut von der Schwanzwurzel her ausgestrichen. Im fortgeschrittenen Krankheits-

stadium mußte die erforderliche Blutmenge sogar durch wiederholtes Ausstreichen gesammelt werden. Da die erneute Durchblutung des Schwanzes dabei unter Umständen sehr lange dauerte, war der Blutstropfen oft schon vor der Verwendung leicht geronnen. Das Problem konnte durch die Beschichtung von Objektträgern mit Heparin zumindest teilweise gelöst werden.

Abhängig von den jeweiligen Konzentrationen der Flagellaten im Blut wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

Die Parasitämie wurde über die ganze Versuchsdauer ähnlich der Methode von Brener (1962) ermittelt: Je ein Tropfen Schwanzblut wurde auf einem Objektträger mit einem 18×18 mm großen Deckglas bedeckt, und am frischen Präparat wurden 100 Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Bei einer Anzahl von 20 Flagellaten pro 20 Gesichtsfeldern wurden weniger Felder ausgezählt und das Ergebnis hochgerechnet.

Ab einer Zahl von ca. 20 Flagellaten pro 100 Gesichtsfeldern wurde zusätzlich bei Verdünnungen (mit 0,9% NaCl oder PBSG) von 1:2 und 1:5 mit der Petroff-Hausser-Kammer gezählt. Diese oder auch eine flache Neubauerkammer mit sehr hohem Kammerfaktor (Tiefe 0,025 mm) lieferte aufgrund der kleineren Füllmengen bei geringen Flagellatenkonzentrationen genauere Ergebnisse als die normalerweise gebräuchlichen Neubauerkammern (Tiefe 0,1 mm). Die hohen Parasitämien der Nacktmäuse erforderten wesentlich höhere Verdünnungen (1:10 bis 1:30).

Je nach Konzentration der Flagellaten wurden bei den C57 Bl/6-Mäusen alle zwei Tage eine oder beide Zählmethoden vorgenommen, bei den Nacktmäusen aufgrund der wesentlich fulminanteren Infektionsverläufe täglich.

4.14 Überprüfung resistenter Tiere

Materialien:

- Cyclophosphamid (SIGMA)
- *T. cruzi* des gleichen Stammes wie bei der Erstinfektion (Chile 5)
- suszeptible Wanzen (*Rhodnius prolixus* L4)

Die Mäuse, die keine Parasitämien entwickelten, wurden mit verschiedenen Methoden auf subpatente Infektionen hin untersucht:

- Immunsuppression mit Cyclophosphamid

(nach Schaub & Schottelius 1984)

Mäuse aus Auftropfversuchen wurden über zwei Wochen alle 3-4 Tage mit 10 mg Cyclophosphamid pro 40g Lebendgewicht behandelt. Der Wirkstoff wurde intraperitoneal injiziert.

- Mouse-protection-test: Rechallenge mit einer hohen Dosis von *T. cruzi*

(nach Marinkelle 1982)

Mäuse aus einem Versuch, bei dem verschiedene Dosierungen des Erregers intradermal gespritzt wurden, wurden erneut mit 10.000 *T. cruzi* infiziert.

- Xenodiagnose

(nach Zeledon et al. 1970)

An Mäusen aus einem Infektionsversuch mit sehr kleiner Dosis wurden je 5-10 uninfizierte Wanzen gefüttert und nach ca. 60 Tagen auf Infektionen mit *T. cruzi* untersucht, indem zunächst nur ihre Fäzes und später der Rektuminhalt nach Mazeration auf Flagellaten untersucht wurde.

4.15 Bearbeitung der Datenreihen für die Darstellung der Parasitämiediagramme

Für die Darstellung der Parasitämieverläufe sollten die Daten in der Einheit "Anzahl der Flagellaten pro ml Blut" und nicht in "Anzahl der Flagellaten pro 100 Gesichtsfelder" angegeben werden, damit sie mit den Angaben anderer Autoren verglichen werden können.

Für diesen Zweck wurden die Daten der Zählkammer-Bestimmung verwendet, um einen Umrechnungsfaktor zu ermitteln. Dabei wurde von einer Gleichverteilung der Flagellaten im Blut der Mäuse ausgegangen, die untersuchten Blutstropfen der Datenpaare (also die beiden Daten der Objektträger- und der Zählkammer-Zählung von jeweils derselben Maus am selben Tag) entsprachen demnach einander. Es wurden dafür alle Datenpaare berücksichtigt, bei

denen die Flagellatenkonzentration so hoch lag, daß die Bestimmung in der Zählkammer mit großer Wahrscheinlichkeit reproduzierbare Ergebnisse ergab. Als Grenze wurde eine Anzahl von mindestens 10 Flagellaten pro Eckquadrat definiert, dies entspricht einer Konzentration von 2500 Flagellaten pro μl Blut. Aus all diesen Datenpaaren wurden nun Quotienten gebildet. Mit Hilfe des Ausreißer-Nachweises nach Doerffel (in: Renner 1970) wurden aus einer Reihe von 336 gefundenen Quotienten 4 zu stark abweichende Werte entfernt und aus den verbliebenen Quotienten der Mittelwert gebildet. So ergab sich der Faktor 9,5 (Standardabweichung 4,35), um die Daten der Objektträger-Zählung in die Anzahl an Flagellaten pro μl Blut umzurechnen.

Diese Rechnung wurde mit Hilfe einer Regressionsanalyse überprüft. (Abb. 4).

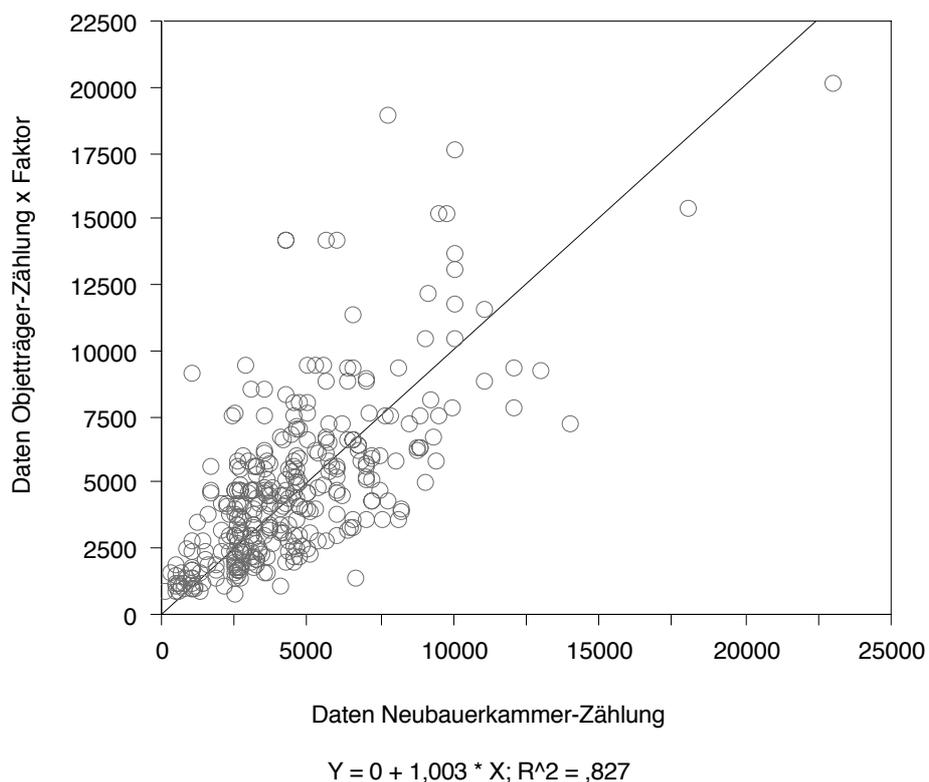


Abb. 4: In einem Regressionsdiagramm wurden die mit 9,5 multiplizierten Daten der Objektträger-Zählung gegen die Daten der Zählkammer-Messung abgetragen. Die dabei entstehende Regressionsgerade wurde durch den Nullpunkt gezwungen (da es sich um Messungen ein und derselben Sache nur mit zwei unterschiedlichen Meßmethoden handelte). Es ergab sich eine Steigung von 1,003 sowie ein Korrelationskoeffizient von 0.827.

4.16 Darstellung der Parasitämieverläufe

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werden in Parasitämiediagrammen dargestellt, die gruppenweise den zeitlichen Verlauf der Einzeltier-Parasitämien im Verlauf der Infektion zeigen. Die einzelnen Gruppen werden in Bezug auf mehrere verschiedene Faktoren miteinander verglichen, sie sind thematisch zu verschiedenen "Vergleichen" zusammengefaßt. Einige Diagramme müssen wiederholt aufgeführt werden, die Versuchs- und Gruppennummern sind daher in den Diagrammen genannt:

Die 1. *Ziffer* ist die eigentliche Versuchsnummer. Sie besagt, daß alle Gruppen mit gleicher Ziffer am gleichen Tag im Versuch waren. Wichtig ist diese Angabe, weil für alle Versuchsansätze eines Tages dieselbe Charge *T. cruzi* - z.B. aus einer Säulenisolierung oder einem Pool aus gesammeltem Wanzenfäzes - verwendet wurde und auch die Mäuse meist aus einer Lieferung stammten. Alle Gruppen eines Versuchsansatzes durchliefen dieselben Temperaturbedingungen (je nach Jahreszeit). Um die Mausstämme zu unterscheiden, werden hier einstellige Zahlen für C57 Bl/6, zweistellige Zahlen für die Nacktmäuse verwendet. Dabei entspricht aber nicht z.B. die Ziffer 4 der Ziffer 14, beide Versuche können an verschiedenen Tagen stattgefunden haben. Die Reihenfolge der Zahlen ist nicht chronologisch geordnet, sondern weitgehend nach ihrem Auftreten in der Darstellung der Ergebnisse.

Die 2. *Ziffer* benennt die einzelne Gruppe innerhalb eines Versuches. Alle Tiere innerhalb einer Gruppe sind gleich behandelt worden.

Da aufgrund der großen Variabilität innerhalb der einzelnen Gruppen und aufgrund der kleinen Gruppengrößen keine schließende, sondern nur beschreibende Statistik auf die Versuche angewendet werden kann, sind in den Diagrammen nur die Einzeltier-Kurven und keine Mittelwerte oder Standardabweichungen angegeben. Es ist daher auch nicht möglich, bei auftretenden Unterschieden zwischen einzelnen Gruppen in den Vergleichen eine Signifikanz darzustellen. Die Einzeltier-Kurven sind logarithmisch aufgetragen: Sie steigen exponentiell und ihr Verlauf kann nur auf diese Weise in allen Abschnitten zufriedenstellend dargestellt werden.

Besonderheiten, die sich bei einzelnen Tieren ergeben hatten, sind nach der Beschreibung der jeweiligen Gruppe unter "A.:" (Ausnahmen) einzeln angegeben.

Die im Text verwendeten Begriffe wurden für die vorliegende Untersuchung folgendermaßen definiert:

Als *Präpatenzzeit* wird für die Versuche die Zeit von dem Tag der Infektion bis zum erstmaligen Auffinden eines Blutflagellaten definiert. (Da schon dieser erste Wert der Datenreihe (z.B. 1 Flagellat/100 Gesichtsfelder) mit dem o.g. Umrechnungsfaktor hochgerechnet wurde, entspricht er im Diagramm nicht dem jeweiligen Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse!)

Die *Morbiditätsrate* wird jeweils in Prozent und als Bruch "Erkrankte/Gesamtanzahl" angegeben. Als erkrankt galten Tiere, bei denen Blutflagellaten gefunden wurden; als Gesamtanzahl alle die Tiere, die nicht vor Ablauf der Präpatenzzeit aus versuchsunabhängigen Gründen ausfielen (z.B. durch deutliche Fehler bei der Infektion (2 Fälle), Narkoseunverträglichkeit (1 Fall), Verluste durch Sekundärerkrankungen. Überlebte Sekundärerkrankungen während der Parasitämie wurden hierbei nicht berücksichtigt, sie werden gesondert erwähnt.

Auf Angaben zur *Mortalitätsrate* wird verzichtet, da die Mortalität in den Versuchen in fast allen Fällen bei 100% lag. Die Mäuse sind an dem Punkt, an dem im Diagramm die Kurve endet, von selbst verstorben oder getötet worden. Sollten Mäuse innerhalb des Versuchszeitraumes nicht verstorben sein, wird dieses bei der Beschreibung des jeweiligen Diagrammes vermerkt. Alle Mäuse, die nicht erkrankten, haben den Versuchszeitraum überlebt. Ihre Zahl ist schon in den Angaben zur Morbidität abzulesen.

Da die *Überlebensdauer* der Tiere auch innerhalb der einzelnen Gruppe zuweilen stark schwankte und deswegen nicht sinnvoll ausgewertet werden konnte, wird auf die Beschreibung dieses Parameters im allgemeinen verzichtet.

Als *Maximum* wird der höchsten Punkt einer Einzeltier-Kurve bezeichnet. Bei den vorliegenden Versuchen war dieser auch häufig der Endpunkt bzw. Todestag der betreffenden Maus.

Aufgereinigte T. cruzi sind mit Hilfe einer DEAE-Säule von anderen Stadien und Wanzenkot oder Medium isolierte trypomastigote Wanzenstadien in PBSG+P, während *T. cruzi* in *Wanzenkot und -urin* sich aus epi- und trypomastigoten Wanzenstadien zusammensetzen und nicht von den Wanzenfäzes getrennt worden sind. Die angegebene Dosis bezieht sich nur auf die

Anzahl der Trypomastigoten im Injektions- oder Auftropfvolumen; die Epimastigoten wurden nicht berücksichtigt (s. Kap. 4.5 und Kap. 5.2.2).

Beim *Auftropfen von T. cruzi in PBS oder Wanzenfäzes auf den Stichkanal einer Wanze oder angeritzte Haut* beinhaltet ein Tropfen immer 10.000 Trypomastigote in 10 µl des jeweiligen Mediums. Diese Werte richten sich nach einer Studie über Wanzen unserer Institutszucht, nach der der erste abgesetzte Tropfen der Fäzes von *Triatoma infestans* im Durchschnitt ein Volumen von 10 µl hat und insgesamt ungefähr 46.000 *T. cruzi*, davon 28% (=12.000) metazyklische enthält (Schaub & Lösch 1988).

Hat eine Wanze beim Stich *Blutkontakt* gehabt, bedeutet es, daß sie ein Blutgefäß aufgefunden und erfolgreich gesaugt hat. Diese Angabe wird nur bei salivarektomierten Wanzen hervorgehoben.