

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Beschreibung des Untersuchungsgebietes

Burkina Faso liegt in Westafrika, umgeben von Mali im Norden und Westen, von Niger im Nord-Osten, von Benin im Süd-Osten und von Togo, Ghana und der Elfenbeinküste im Süden. Es erstreckt sich zwischen 9° 40' und 15° nördlicher Breite sowie 5° 50' westlicher und 2° 40' östlicher Länge über eine Fläche von 274.200 km<sup>2</sup> bei einer durchschnittlichen Höhenlage zwischen 200 m und 500 m über dem Meeresspiegel (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1995; MUNZINGER ARCHIV, 1997) (Abbildung 3.1).

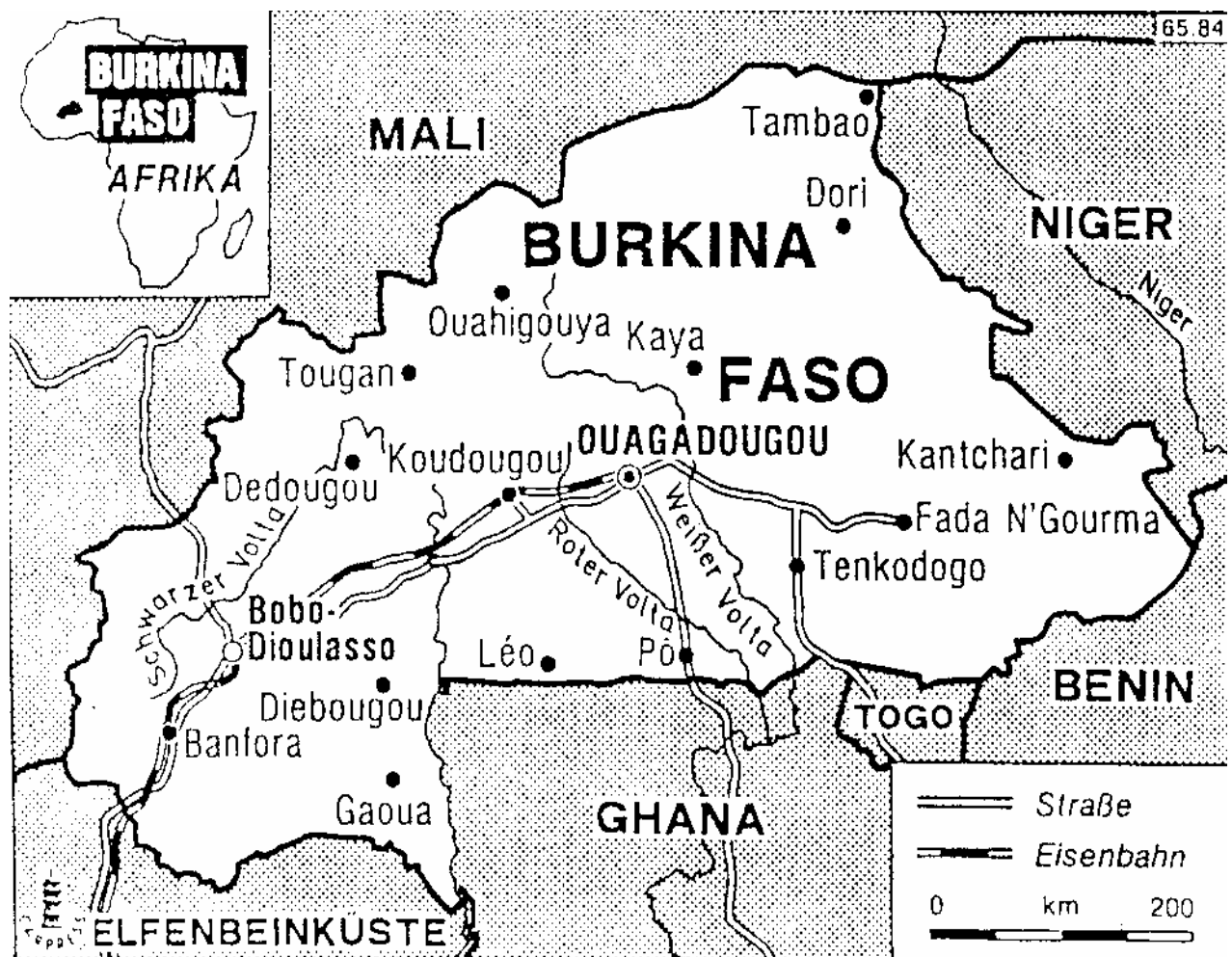


Abbildung 3.1: Lage Burkina Fasos (nach Munzinger Archiv, 1997)

Laut Schätzungen lebten 1999 in Burkina Faso 11,6 Millionen Einwohner, bei einer jährlichen Bevölkerungswachstumsrate von 2,7% (DSE, 1999).

Burkina Faso zählt mit einem Jahres-Pro-Kopf-Einkommen von ca. 230 US\$ (1995) zur Gruppe der Least Developed Countries (MUNZINGER ARCHIV, 1997); d.h. es zählt zu den neun ärmsten Ländern der Welt. Strukturelle Entwicklungshemmnisse liegen unter anderem in der Kontinentallage, in der eher schwachen Ressourcenausstattung sowie der Zugehörigkeit zur klimatisch ungünstigen Sahelzone.

Das wechselfeuchte tropische Klima hat drei unterschiedliche Vegetationszonen (abhängig vom durchschnittlichen Jahresniederschlag, Temperatur und Feuchtigkeit) entstehen lassen. Innerhalb Burkina Fasos lassen sich drei Klimazonen unterscheiden (MUNZINGER ARCHIV, 1997): im Süden (südliche Sudanzone) die Feuchtsavanne mit fünf ariden Monaten und Jahresniederschlägen von 1.000 bis 1.300mm, in der Mitte (nördliche Sudanzone) die Trockensavanne mit sieben trockenen Monaten und jährlichen Niederschlägen um 850mm sowie im Norden (Sahelzone) die Dornstrauchsavanne die teilweise in Halbwüste übergeht mit über 260 Tagen jährlicher Trockenzeit und Niederschlägen von 400 bis 500mm (Abbildung 3.2).

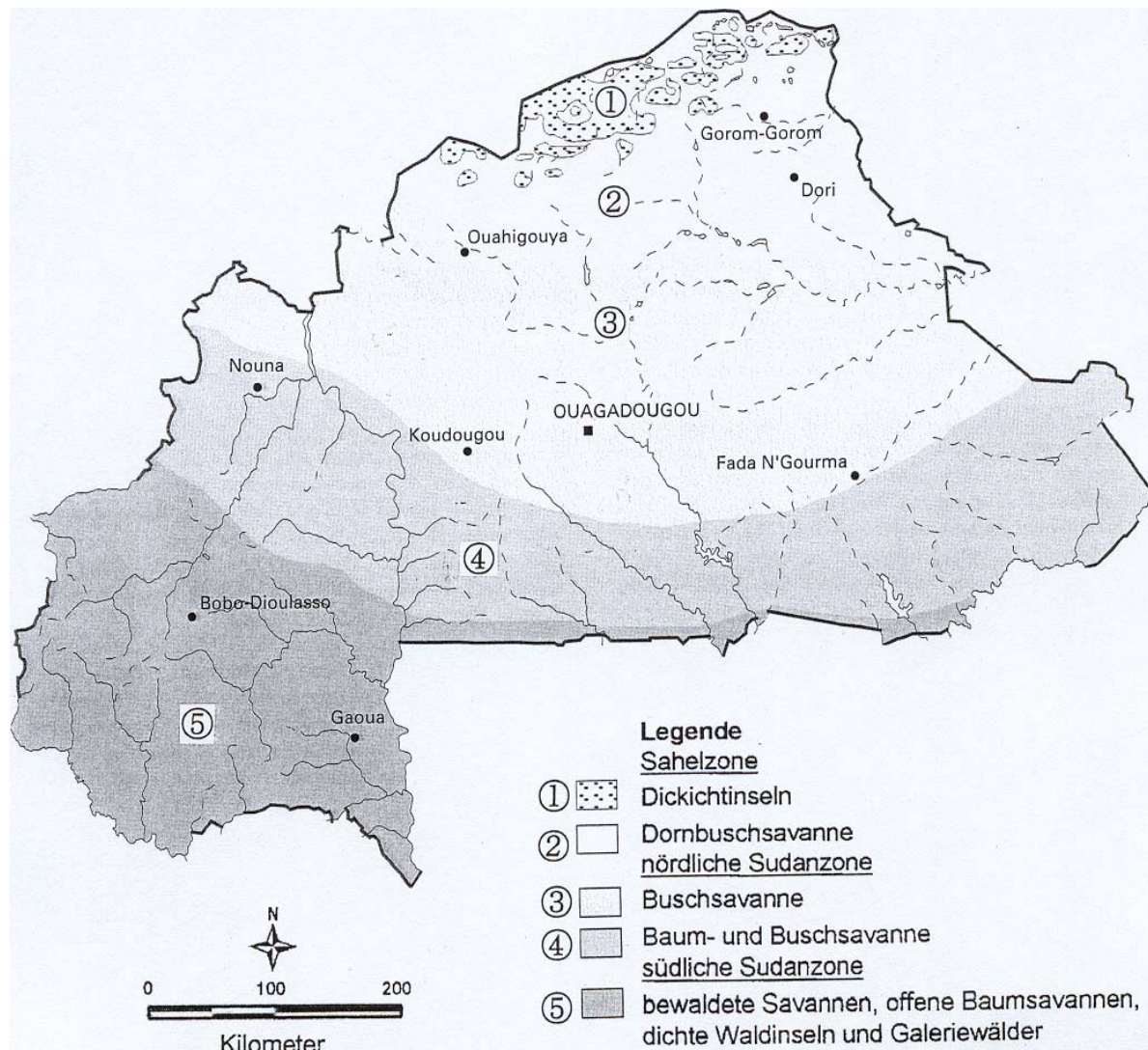


Abbildung 3.2: Vegetationszonen in Burkina Faso (JEUNE AFRIQUE ATLASES, 1998)

Bei dem Untersuchungsgebiet handelt es sich um eine der administrativen Provinzen von Burkina Faso, der Provinz Kénédougou. Die Provinz Kénédougou gehört zur südlichen Sudanzone. Ihre Fläche wird geschätzt auf ca. 8265 km<sup>2</sup>; dies entspricht ca. 3% des nationalen Gebietes.

Die Provinz Kénédougou liegt in der subhumiden Zone von Burkina Faso und wird nach Nord-Westen durch Mali, nach Osten durch die Provinzen Kossi und Houet und nach Süden durch die Provinz Léraba eingegrenzt.

Die letzte Schätzung belief sich auf ca. 198 936 Einwohner. Der Anteil der Frauen liegt bei 50,5%, der der Männer bei 49,5% (BURKINA FASO, 1998).

Die jährliche Niederschlagsmenge in der Provinz Kénédougou liegt zwischen 1000 und 1200mm. Die Regenzeit hat eine Dauer von ca. fünf Monaten und beginnt normalerweise Anfang Mai. Sie kann jedoch bereits früher beginnen, und vereinzelt kann es auch schon zu Niederschlägen während der Trockenzeit kommen.

Die Provinz Kénédougou verfügt über ein großes Potential für Ackerbau und Viehzucht. Im Vergleich zu anderen nördlicheren oder zentraleren Regionen von Burkina Faso ist die Weide- und Tränkeproblematik hier geringer, da ein verhältnismäßig dichtes Wassernetz besteht. Hier sind zu nennen der Plandi und der Banifing, sowie einige Nebenflüsse des Comoé, die über das ganze Jahr hindurch Wasser führen; weitere temporäre Flüsse (der Bouankan, der Sélédogo und andere) können ebenfalls bis zu ihrem Versiegen im April zur Viehtränke und Ackerbestellung genutzt werden.

Innerhalb der Grenzen Kénédougous selbst sind nur wenige Tierbewegungen zu verzeichnen, allerdings kommt es zur Einwanderung aus dem Norden, wo ein chronisches Futterdefizit die Viehhalter mit ihren Tieren zur Abwanderung zwingt. Der Transit von Schlachtrindern aus Mali und Niger nach Nigeria, Benin und zur Elfenbeinküste betrifft ebenfalls Distrikte der Provinz Kénédougous. Bei den Tierbewegungen innerhalb Kénédougous handelt es sich nur um kleinere Wanderbewegungen; das Verbringen der Herde in andere Weidegebiete erfolgt, um die bestellten Äcker zu schützen oder um den Kontakt zur Tsetsefliege während bestimmter Phasen der Regenzeit zu vermeiden.

Wie in den meisten ländlichen Gebieten Burkina Fasos bilden auch in Kénédougou Ackerbau und Viehzucht mit 90% den Hauptanteil der Lebensgrundlage der Menschen (MUNZINGER ARCHIV, 1997; OUEDRAOGO, 1998).

Zwischen den landwirtschaftlichen Nutzungssystemen gibt es fließende Übergänge. So befinden sich bei den Agropastoralisten kleinere Viehbestände, sowie der nicht unerhebliche Anteil von Zugochsen für die Feldarbeit, und die reinen Viehzüchter selbst betreiben ebenfalls Bodennutzung in Form von Getreideanbau zum Eigenbedarf.

Hauptanbauprodukte im Bereich der Nahrungspflanzen sind Früchte, Mais, Reis, Hirse, Sorghum, Knollenfrüchte und Erdnüsse. Das wichtigste Erzeugnis für den Export und die Verarbeitung im Inland ist Rohbaumwolle; innerhalb der Provinz Kéné Dougou ist hier vor allem der nördliche Distrikt N'Dorola und zum Teil der zentrale Distrikt Samorogouan als Anbaugebiet zu nennen.

In den Gebieten des Baumwollanbaus ist die Landbeschaffenheit entsprechend verändert. Es wurden hierfür große Flächen, im Gegensatz zu kleinen Flächen innerhalb der kleinbäuerlich betriebenen Selbstversorgung, durch Abholzung und Brandrodung für den Baumwollanbau geschaffen. Vor allem im Distrikt N'Dorola sind kaum noch Wald- und Baumbestände vorhanden, mit Ausnahme am Mouhoun-Fluss-System.

Der Viehbestand beläuft sich auf 48.100 Schafe und 33.740 Ziegen (DSAP, 1997). Letzte Schätzungen des Rindviehbestandes von 1998 belaufen sich auf ca. 69.119 Tiere („DRH“: Direktion Régional de hydraulique“, persönl. Mitteilung).

Im Untersuchungsgebiet sind trypanotolerante Rinder der Rassen N'Dama und Baoulé (Spezies *Bos taurus*), Zebu-Rinder (trypanosensibel / Spezies *Bos indicus*) sowie deren Kreuzungen vertreten. Zwei Drittel der Rinderpopulation entfällt auf die Zeburasse und ein Drittel auf die taurinen Rassen und deren Kreuzungsprodukte mit Zeburindern (SHAW und HOSTE, 1987). Die Zeburasse wird von den Tierhaltern bevorzugt, weil die Rinder größer, umgänglicher und leichter aufzuziehen sind. Außerdem ist ihre Milchleistung höher als diejenige tauriner Rassen. Auch als Zugtiere werden zumeist Zebus oder deren Kreuzungen bevorzugt.

Jedoch hat die Rinderrasse einen deutlichen Einfluss auf die Trypanosomenprävalenz (D'IETEREN *et al.*, 1998), trypanotolerante Rinder zeigen deutlich niedrigere Trypanosomenprävalenzen als zeboide Rassen und deren Kreuzungsprodukte.

In der Provinz Kéné Dougou mit einer stellenweise hohen Tsetsefliegenabundanz in Regionen mit geeigneten Tsetsehabitaten (Feuchtsavannen) ist die Tierhaltung, insbesondere zeboider Rassen, nur unter Medikamentenregime möglich.

Hierbei wird die Trypanosomoseproblematik verschärft durch das Auftreten medikamentenresistenter Trypanosomenpopulationen.

PINDER und AUTHIE berichteten schon 1984 über Resistenzen von *Trypanosoma congolense* gegenüber Isometamidiumchlorid in Samorogouan (zentraler Distrikt der Provinz Kéné Dougou). CLAUSEN *et al.* bestätigten 1992 das Vorhandensein von Resistenzen gegenüber Isometamidiumchlorid in Samorogouan, sieben Jahre nach der Studie von PINDER und AUTHIE. Diese letztere Studie zeigte eine neu aufgetretene Resistenzentwicklung gegenüber Diminazenazetat (in der Studie von PINDER und AUTHIE war eine

Diminazenresistenz nur im Mausversuch beobachtet worden). Während sich *Trypanosoma congolense*-Stämme resistent gegenüber Isometamidiumchlorid, Diminazenazetat, Homidium und Quinapyramin zeigten, konnten *Trypanosoma vivax*-Infektionen mit den üblichen Dosierungen kuriert werden.

Die Provinz Kéné Dougou wird in einen nördlichen Distrikt (N'Dorola), einen zentralen (Samorogouan) und zwei südliche Distrikte (Koloko und Orodara) unterteilt (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Provinz Kéné Dougou, mit Distriktgrenzen

Innerhalb der vier Distrikte werden die Regionen administrativ in 13 Departements aufgeteilt (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Administrative Einteilung der 13 Departements innerhalb der vier Distrikte der Provinz Kéné Dougou, Burkina Faso**

Distrikte	N'Dorola	Samorogouan	Koloko	Orodara
<b>Departements</b>	Morlaba	Sindo	Koloko	Banzon
	N'Dorola	Samorogouan	Kangala	Djigouera
	Kayan			Orodara
	Kourouma			Samogohiri
				Kourignon

### 3.2 Untersuchungsplan

Die Felduntersuchungen gliederten sich in drei Phasen:

#### 1. Phase: Querschnittsuntersuchung (Juni - August 1998)

Ziel der Querschnittsuntersuchung war, eine Übersicht über die Prävalenz von Trypanosomeninfektionen in Rinderherden in Verbindung mit Informationen über den Vektor, die Tsetsefliege, für das gesamte Untersuchungsgebiet zu erhalten.

Dafür wurden für die Querschnittsuntersuchung aus der Gesamtheit von 166 Dörfern zufällig 45 aus den vier Distrikten der Provinz ausgewählt. Insgesamt wurden in diesen 45 Dörfern 2000 Tiere parasitologisch untersucht (siehe 3.2.1.2). Des Weiteren wurden Daten über den Hämatokritwert, die Rasse, das Alter, das Geschlecht und die Körperkondition erhoben.

Zeitgleich wurden Informationen über Tsetsefliegen gesammelt. Die Fliegen wurden mit Hilfe von Fallen gefangen, bestimmt und sezirt (siehe 3.2.1.4). Erhobene Parameter waren die Anzahl der Fliegen pro Falle und Tag, die Art, das Geschlecht, das Alter und die Infektionsrate.

Alle Standorte (Dörfer und Fallen) wurden mit dem GPS (Global Positioning System) erfasst.

#### 2. Phase: Isometamidium-Blockbehandlung (November 1998 bis Februar 1999)

Ziel der Isometamidium-Blockbehandlungsstudie war, in Dörfern mit hohen Trypanosomenprävalenzen in Rinderherden und hohen Tsetsefliegenabundanzten einen Eindruck über die prophylaktische (Isometamidiumchlorid) und die therapeutische (Isometamidiumchlorid, Diminazenazeturat) Wirksamkeit dieser Trypanozide zu erhalten.

Dafür wurden, basierend auf den Ergebnissen der Querschnittsuntersuchung, aus den oben genannten 45 Dörfern neun mit einer Trypanosomenprävalenz von größer/gleich 10% für die Isometamidium-Blockbehandlungsstudie ausgewählt.

Ein zehntes Dorf wurde aufgrund früher berichteter Medikamentenresistenz ebenfalls in der Studie beibehalten.

Pro Dorf wurden ca. 80 Tiere ausgewählt (siehe 3.2.2.1), wobei die schon untersuchten Tiere aus der Querschnittsuntersuchung übernommen und zusätzliche Tiere integriert wurden.

Diese so ausgewählten 726 Tiere wurden zu Beginn der Studie prophylaktisch mit Isometamidiumchlorid (Trypamidium®, Rhône Mérieux, Lyon, Frankreich, 1mg/kg Körpergewicht) behandelt und daraufhin zweiwöchentlich über drei Monate hinweg parasitologisch untersucht.

Wieder positive oder anämische Tiere (Hämatokritwert < 25%) wurden mit Diminazeturat (Berenil®, Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland, 3,5mg/kg Körpergewicht) behandelt.

### **3. Phase: Langzeitstudie (Juni bis November 1999)**

Im Zielproduktionssystem (hohes Trypanosomose-Risiko bei Hinweis auf eine vorliegende Medikamentenresistenz) sollten innerhalb der Langzeitstudie einerseits die in der Isometamidium-Blockbehandlungsstudie erhobenen Ergebnisse über die Medikamentenwirksamkeit bzw. die Resistenz gegen Isometamidiumchlorid und Diminazeturat auf Reproduzierbarkeit überprüft werden und andererseits durch die Erfassung von Produktionsparametern (hier Gewichtsverlauf) ein möglicher Einfluss von medikamentenresistenten Trypanosomenpopulationen auf die Produktivität der Rinderpopulation beurteilt werden.

Dafür wurden, basierend auf den Ergebnissen der Isometamidium-Blockbehandlungsstudie, aus den zehn oben genannten Dörfern drei mit einer auffällig hohen Trypanosomenprävalenz vor und nach Isometamidium-Behandlung, und ein viertes als Kontrolle (geringe Trypanosomenprävalenz nach Isometamidiumbehandlung), für die Langzeitstudie von fünf Monaten ausgewählt. Die aus statistischen Gründen angestrebten ca. 80 Rinder pro Dorf wurden diesmal in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht aus der schon untersuchten Population übernommen und ergänzt. Hierbei sollten vier Altersgruppen mit je 20 Tieren zusammengestellt werden: Kühe > 3 Jahre, Ochsen/Stiere > 3 Jahre, Jungvieh (männliche und weibliche Tiere) > 1 < 3 Jahre und Kälber (männliche und weibliche Tiere) < 1 Jahr.

Nach initialer ISMM-Blockbehandlung (Trypamidium®, 1 mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere in monatlichen Abständen parasitologisch verfolgt (hierbei wurde eine Nachbehandlung parasitologisch positiver oder anämischer Tiere (Hämatokritwert < 25%) mit Diminazeturat (Berenil®) bei einer Dosierung von 7 mg/kg Körpergewicht vorgenommen.

Alle Tiere wurden initial mit Hilfe einer elektronischen Waage gewogen und bei den Altersgruppen der Kälber und Jungtiere wurde der Gewichtsverlauf monatlich weiter erfasst. Bei den Kälbern wurden zudem monatlich Kotproben entnommen.

Die Tiere wurden zum zweiten Untersuchungszeitpunkt (ein Monat nach ISMM-Behandlung) mit Rintal® und bei Folgebesuchen mit Vermitan® (siehe 3.3.3.2) entwurmt.

Zusätzlich zu den bereits genannten erhobenen epidemiologischen Daten wurden in diesem Studienabschnitt wieder, wie für die Querschnittsuntersuchung beschrieben, entomologische Daten erhoben (bei 20 Fallen pro Dorf / 24 Stunden).

Wieder wurden alle Standorte (Dörfer und Fallen) mit dem GPS (Global Positioning System) erfasst.

### **3.2.1 Querschnittsuntersuchung**

Die Querschnittsuntersuchung wurde in der Zeit vom 16. Juni bis zum 14. August 1998 in 45 Dörfern, verteilt über die gesamte Provinz Kéné Dougou, durchgeführt.

#### **3.2.1.1 Untersuchungspopulation**

Die Stichprobenauswahl der Dörfer basierte auf einer Zufallsauswahl von 45 der 166 vorhandenen Dörfer und Ansiedlungen aus den vier Distrikten der Provinz.

Hierbei wurde, basierend auf Datenerhebungen der „DRH“, Direktion Régional de l'hydraulique“, der „DRP“, Direktion du Plan“ und der „Unité de Socio-Economie“ des CIRDES, zunächst eine komplette Liste aller 166 Dörfer der Provinz Kéné Dougou erstellt.

Aus statistischen Gründen sollten ca. 30% der vorhandenen 166 Dörfer in die Studie aufgenommen werden, was einer Anzahl von ca. 50 Dörfern entspricht („Soll-Auswahl“) (Tabelle 3.2.). Mit Hilfe einer stratifizierten Zufallsauswahl wurde aus der Liste der 166 Dörfer jedes dritte Dorf ausgewählt.

Die so ausgewählten Dörfer wurden hinsichtlich ihres Rindviehbestandes und ihrer durchgehenden Zugänglichkeit, insbesondere in der Regenzeit, überprüft. Waren diese Kriterien nicht gegeben, wurde das nachfolgende Dorf der Liste ausgewählt.

Gleichzeitig sollte die Anzahl der Dörfer proportional auf die vier Distrikte und 13 Departements und auf die vorhandene Rinderpopulation der Provinz Kéné Dougou verteilt sein.

Dementsprechend wurde, bezogen auf die Anzahl der vorhandenen Dörfer pro Distrikt, berechnet, wie viele Dörfer proportional auszuwählen sind, und in Abhängigkeit vom Viehbestand der Distrikte wurde eine Angleichung der „Soll“ an die „Ist“-Auswahl (Tabelle 3.2) vorgenommen (Abbildung 3.4).





Abbildung 3.4: Provinz Kénédougou mit seinen 13 Departements und den 45 für die Querschnittsuntersuchung ausgewählten Dörfern

Aus statistischen Gründen sollte die Stichprobenanzahl für die Querschnittsuntersuchung bei insgesamt 2000 Tieren liegen und annähernd gleichmäßig auf die vier Distrikte verteilt sein. Unter Berücksichtigung des Rindviehbestandes wurden entsprechend aus den Distrikten N'Dorola 505 Tiere, aus Samorogouan 520, aus Koloko 490 und aus Orodara 485 Rinder ausgewählt (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Datengrundlagen für die Auswahl der Dörfer der Querschnittsuntersuchung, Provinz Kéné Dougou, Burkina Faso**

Distrikte	Departements	Dörfer (Gesamt)	Dörfer „Soll-Auswahl“	Dörfer „Ist-Auswahl“	Rinderbestand (Gesamt)	Rinder (ausgewählt)
N'Dorola	4	65	19	11	14.920	505
Samorogouan	2	28	8	9	27.450	520
Koloko	2	27	9	11	18.980	490
Orodara	5	46	14	14	7.769	485
<b>Summe</b>	<b>13</b>	<b>166</b>	<b>50</b>	<b>45</b>	<b>* 69.119</b>	<b>2000</b>

(\*aus Datenerhebungen der „Direktion Régional de l'hydraulique“ (DRH) und der „Unité de Socio-Economie“ des CIRDES, persönl. Mitteilung, März 1998)

Die Stichprobenauswahl der Einzeltiere pro Dorf erfolgte proportional zur Anzahl der Rinder dieses Dorfes. Beispielsweise verringerte diese Angleichung die vorgesehene Dorfanzahl von 50 auf 45, die Erniedrigung der Dorfanzahl kompensierte aber die höhere Stichprobenanzahl in den verbliebenen Dörfern, bedingt durch ihren höheren Gesamt-Rinderbestand. Die Auswahl der Herden innerhalb der Dörfer beschränkte sich auf Herden von sesshaften Tierhaltern, um deren durchgehende Anwesenheit für die gesamte Untersuchungsperiode zu gewährleisten.

Mittels einer stratifizierten Zufallsauswahl wurden nach dem in Tabelle 3.3 dargestellten Auswahl Schlüssel die Rinder pro Dorfherde ausgewählt.

**Tabelle 3.3: Auswahl Schlüssel der Rinder pro Dorfherde, Querschnittsuntersuchung, Provinz Kéné Dougou, Burkina Faso**

Anzahl Rinder pro Dorf	Anzahl ausgewählter Rinder pro Dorf
0-99	10
100-499	30
500-999	50
1000-2499	60
2500-5000	75
> 5000	100

Die Auswahl der Tiere innerhalb einer Herde erfolgte zufällig. Alle ausgewählten Tiere wurden mit Ohrmarken versehen (fortlaufend von 1-2000). Gingen Ohrmarken verloren, wurden sie mit Marken identischer Nummern ersetzt.

Die 2000 durch die Zufallsauswahl ausgewählten Tiere setzten sich zusammen aus 43,5% männlichen und 56,5% weiblichen Tieren, mit 1,9% Kälbern, 16,4% Jungtieren und 81,7% Adulten.

### **3.2.1.2 Parasitologische Untersuchungstechniken**

#### **3.2.1.2.1 Blutentnahme**

Blutproben wurden mit dem Venoject®-System (Terumo, Frankfurt, am Main) aus der *Vena jugularis* entnommen. Es wurden ein mit EDTA als Gerinnungshemmer beschichteter und ein mit Silikon beschichteter 10 ml Vakutainer zur Serumaufbereitung verwendet. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Proben auf Eis gelagert.

#### **3.2.1.2.2 Blutausstrich**

Von den 2000 Tieren wurde unmittelbar nach der Blutentnahme ein dünner Ausstrich mit Blut aus dem silikonbeschichteten Vakutainer angefertigt. Nach Lufttrocknung erfolgte eine Fixierung mit Methanol (1 Minute). Bei Rückkehr ans CIRDES wurden die Blutausstriche mit 10%-iger Giemsa-Lösung 35 Minuten lang gefärbt und dann zur Bestätigung der Trypanosomenspezies - bei zweifelhafter Diagnose im Feld oder bei Mischinfektionen - herangezogen. Die Betrachtung erfolgte im Lichtmikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung unter Öl (Öl-Objektiv 100x; Okular 10x).

#### **3.2.1.2.3 BCT und Hämatokrit**

Für die „Dark ground/phase contrast buffy coat technique“ – BCT - (MURRAY *et al.*, 1977) wurden ca. 60 µl Blut aus dem EDTA-Vakutainer in einer heparinisierten Mikrohämatokritkapillare 5 Minuten bei 12000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Nach Ablesen des Hämatokritwertes mit Hilfe einer Hämatokrit-Ablesetabelle wurde die Kapillare mit einem Diamantschneider 1 mm unterhalb der „buffy coat“-Schicht im Bereich der Erythrozytensäule angeritzt und aufgebrochen. Der Inhalt dieser Hälfte - „buffy coat“ und das untere Drittel der Plasmasäule - wurde auf einen Objektträger gebracht, vorsichtig vermischt und mit einem Objektgläschen (22 x 22 mm) abgedeckt. Die Präparation wurde bei einer 400-fachen Vergrößerung (Okular 10 x, Objektiv F 40/0,65) gesamthaft durchmustert.

#### **3.2.1.2.4 Stabilatgewinnung**

„Direktstabilate“: Von Blutproben, die in der BCT parasitologisch positiv waren und von Rindern mit einem Hämatokritwert < 20%, wurden vor Ort Stabilate angefertigt.

Hierzu wurden 900 µl Vollblut (aus dem EDTA-Vakutainer) in ein Kryoröhrchen (Nunc®/

Wiesbaden) überführt und mit 100 µl Glycerol versetzt. Die so mit einer Glycerol-Endkonzentration von 10% präparierten Blutproben wurden in vier Zeitintervallen von je 12 Minuten auf  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-15^{\circ}\text{C}$ ,  $-25^{\circ}\text{C}$ , und  $-40^{\circ}\text{C}$  heruntergefroren und dann in einem isolierten Behältnis in der Dampfphase des Stickstoffcontainers bis zur abendlichen Rückkehr ins Feldlabor aufbewahrt, wo sie dann in die flüssige Stickstoffphase ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) überführt wurden. „Mausinokulation“: EDTA-Blut von parasitologisch positiven Rindern und von Rindern mit einem Hämatokritwert  $< 20\%$  wurde pro Probe in zwei mitgeführte Labormäuse (weiße NMRI-Mäuse) intraperitoneal inokuliert. Jeder Maus wurde 1 ml Vollblut injiziert. Bei der Rückkehr ans CIRDES wurden die Mäuse zwei bis drei Mal wöchentlich über einen Zeitraum von 35 Tagen im Nativpräparat auf Trypanosomen untersucht. Von parasitologisch positiven Mäusen wurden im Stadium einer hohen Parasitämie je zwei Stabilate, wie oben beschrieben, angefertigt. Diese Stabilate standen weiteren Untersuchungen am CIRDES, ILRI und an der FU-Berlin zur Verfügung.

#### **3.2.1.2.5 EDTA-Vollblutproben für PCR-Untersuchungen**

Je 1 ml Blut wurde aus den EDTA-beschichteten Vakutainern in Eppendorf-Gefäße überführt, bis zur Rückkehr ans CIRDES auf Eis gelagert und am CIRDES in Tiefkühltruhen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  für spätere PCR Untersuchungen gelagert.

#### **3.2.1.2.6 Serumgewinnung**

Im Feld oder nach Rückkehr aus dem Feld wurden im Feldlabor die silikon-beschichteten Vakutainer bei 1500 Umdrehungen für 15 Minuten zentrifugiert. Je 1 ml Serum wurde in Eppendorf-Gefäße verbracht. Bis zur Rückkehr ans CIRDES wurden die Proben auf Eis gelagert. Am CIRDES erfolgte eine Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.1.3 Beurteilung der Körperkondition**

Zu allen Besuchen wurde die Körperkondition der Rinder nach METZNER *et al.* (1993) mit einem 1 bis 5 Punkte-System bewertet.

Mit halben Zwischenpunkten modifiziert, entstehen in der Bewertung 9 Abstufungen, wobei die niedrigste Stufe 1 ein kachektisches Tier und die höchste Stufe 5 ein adipöses Tier bezeichnet. Die Beurteilung der Rinder wurde immer von derselben Person durchgeführt.

### **3.2.1.4 Entomologische Untersuchungen**

#### **3.2.1.4.1 Auswahl der Fallenstandorte**

Die Fliegenfallen wurden in allen Untersuchungsdörfern an den Tränkestellen der Rinder und anderen geeigneten Tsetsehabitaten, die von Dorfbewohnern aufgezeigt wurden, aufgestellt.

#### **3.2.1.4.2 Fallenart und Anzahl**

In jedem Dorf wurden zwischen fünf bis acht mono- und bikonische Fliegenfallen (CHALLIER und LAVEISSIERE, 1973; LAVEISSIERE, 1988) für einen Zeitraum von sechs Stunden aufgestellt.

#### **3.2.1.4.3 Fliegendichte, -spezies, -infektionsrate und -alter**

Die Fliegendichte (Apparent Density, AD) wurde berechnet als gefangene Fliegen pro Falle und Tag. Von den gefangenen Fliegen wurden die Art und das Alter von geschultem Personal des CIRDES bestimmt, bei männlichen Tieren gemäß der „Wing-Fray“-Analyse (SAUNDERS, 1962; CHALLIER, 1973; RYAN *et al.*, 1980; LEAK und ROWLANDS, 1997) und bei weiblichen Fliegen über das physiologische Eierstocksalter (SAUNDERS, 1960; 1962; CHALLIER, 1965). Das Fliegengeschlecht (ITARD, 1970) ist äußerlich direkt erkennbar.

Eine repräsentative Anzahl männlicher und weiblicher Fliegen wurde seziiert und auf Trypanosomeninfektionen untersucht, um die Infektionsraten im Stechrüssel, in den Speicheldrüsen und im Darm einzuschätzen. Von allen infizierten Organen wurden Proben in 100 µl destilliertem Wasser in Eppendorf-Gefäßen für eine spätere Trypanosomenspeziesbestimmung mittels PCR aufbewahrt. Von allen Fliegen, die eine Blutmahlzeit zu sich genommen hatten, wurde diese auf Filterpapier für weiterführende Untersuchungen aufgehoben.

### **3.2.2 Isometamidiumchlorid-Blockbehandlungsstudie**

#### **3.2.2.1 Untersuchungspopulation**

Die Isometamidiumchlorid-Blockbehandlungsstudie verlief vom 16. November 1998 bis zum 19. Februar 1999 in 10 der 45 für die Querschnittsuntersuchung ausgewählten Dörfern. Das Kriterium der Auswahl der Dörfer war eine Trypanosomenprävalenz von größer/gleich 10% zum Zeitpunkt der Querschnittsuntersuchung.

Hierbei handelte es sich um sechs Dörfer aus dem südlichen Distrikt Orodara (Dieri, Samogohiri, Toussian-Bandougou, Kolokaka, Sipigui und M'Bie) und um drei Dörfer aus dem südlichen Distrikt Koloko (Sokouraba, Sokoroni und Kotoura).

Ein zehntes Dorf (Fama/Ranch II aus dem Distrikt Samorogouan) wurde aus Gründen früher beschriebener Medikamenten-resistenzen (CLAUSEN *et al.*, 1992) zusätzlich in die Studie aufgenommen. Innerhalb der zehn ausgewählten Dörfer wurden die bereits in der Querschnittsuntersuchung untersuchten 380 Rinder proportional zur Gesamtherdengröße um 346 Tiere auf 726 ergänzt.

In den Dörfern Dieri (bisher 50 Rinder ausgewählt), Toussian-Bandougou (bisher 30 Tiere ausgewählt) und Samogohiri (bisher 50 Tiere ausgewählt) betrug die Endstichprobenanzahl 80 Tiere. Ein Tier aus Samogohiri konnte vor der Behandlung ausbrechen und wurde deshalb in dieser Studie nicht berücksichtigt. In den Dörfern M'Bie, Sipigui und Kolokaka konnte die Rinderzahl für die Auswahl aufgrund niedriger Gesamt-Bestandszahlen nur auf 25, 40 und 60 Tiere ergänzt werden. Der gesamte Rinderbestand in M'Bie betrug nur 32 Tiere und in den Dörfern Sipigui und Kolokaka wurde der gesamte Rinderbestand mit 40 und 60 Rindern in die Studie aufgenommen.

In Kotoura und Sokouraba wurden die Tierzahlen von 30 und 50 auf eine Endstichprobenzahl von 80 Tieren erhöht. Im Dorf Sokoroni wurden die anfangs ausgewählten 30 Tiere auf 130 Tiere ergänzt, um einen Ausgleich der ungleichen Dorfverteilung von sechs Dörfern im Distrikt Orodara zu nur drei Dörfern im Distrikt Koloko über die Tierzahlen zu erzielen. In diesem Dorf wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gearbeitet.

Im zehnten Dorf Fama/Ranch II aus dem Distrikt Samorogouan wurden 84 Tiere ausgewählt. Hier wurden aufgrund der Abwesenheit eines Tierbesitzers zwölf Tiere seiner Herde erst beim zweiten Besuch in die Studie aufgenommen, weil alle Tierbesitzer in die Studie integriert werden sollten, und folglich auch erst zu diesem Zeitpunkt mit ISMM behandelt. Aufgrund der verspäteten Behandlung wurden diese Tiere aus den Berechnungen herausgenommen.

Bei der Aufstockung handelte es sich um eine stratifizierte Zufallsauswahl zugunsten von Rindern aus jüngeren Altersgruppen. Der Anteil an Kälbern konnte aufgrund deren verhältnismäßig niedrigen Herdenanteils nicht erhöht werden. Er lag in beiden Studienteilen bei nur 1,9 und 0,8% respektive. In der Gruppe der Jungtiere fand eine Aufstockung von 16,4% (Anteil an der Gesamtanzahl von 2000 Tieren) bzw. 21,8% (Anteil innerhalb der zehn Dörfer) auf 35,7% statt. 63,5% entfielen auf adulte Rinder. Insgesamt entfielen 38,2% auf männliche und 61,8% auf weiblich Tiere.

### **3.2.2.2 Behandlungsplan**

Alle ausgewählten 726 Rinder der zehn Dörfer wurden initial mit Isometamidium intramuskulär (Trypamidium®, 1mg/kg Körpergewicht) behandelt und im zweiwöchentlichen Abstand über einen Zeitraum von zwölf Wochen parasitologisch untersucht.

Alle nach der ISMM-Behandlung wieder parasitologisch positiv getesteten oder anämischen Tiere (Hämatokritwert < 25%) wurden mit Diminazenazeturat (Berenil®, 3,5 mg/kg Körpergewicht; intramuskulär) nachbehandelt. Die Untersuchung und Probennahme erfolgte wie für die Querschnittsstudie beschrieben.

### **3.2.3 Langzeituntersuchung**

Die Langzeitstudie fand vom 15. Juni bis zum 17. November 1999 statt. Basierend auf den Ergebnissen der Isometamidium-Blockbehandlungsstudie wurden aus den zehn Dörfern drei Zieldörfer mit auffällig hohen Trypanosomenprävalenzen vor und nach Isometamidium-Behandlung, eine Medikamentenresistenz vermutend, ausgewählt. Ein viertes Dorf mit geringen Trypanosomenprävalenzen nach ISMM-Behandlung, wo eine Wirksamkeit der Medikamente noch vorhanden zu sein schien, wurde als Kontrolle für die Langzeituntersuchung ausgewählt.

#### **3.3.3.1 Untersuchungspopulation**

Bei den drei Dörfern mit erhöhter Trypanosomenprävalenz handelte es sich um Dieri und Toussian-Bandougou (aus dem südlichen Distrikt Orodara) und um Kotoura (aus dem südlichen Distrikt Koloko). Bei dem vierten Dorf, welches als Kontrolldorf dienen sollte, handelte es sich um Sokoroni (Distrikt Koloko).

Für diese Studie wurden 80 Rinder pro Dorf angestrebt. Diesmal wurden vier Gruppen von je 20 Tieren zusammengestellt: Kühe älter als 3 Jahre, Ochsen/Stiere älter als drei Jahre, Jungrinder (männliche und weibliche Tiere) zwischen 1 und 3 Jahren und Kälber (männliche und weibliche Tiere) jünger als 1 Jahr (Tabelle 3.4). Abhängig von praktischen Gegebenheiten (wenig Kälber in der gesamten Untersuchungspopulation vorhanden und männliche adulte Rinder teilweise verliehen bzw. wegen Feldarbeit unabkömmlich und daher von vornherein nicht in die Studie integriert) ergab sich ein Verhältnis von 150 männlichen (47%) und 170 weiblichen Tieren (53%). Innerhalb der Altersgruppen wurden 86 adulte Kühe (27%) und 73 adulte Ochsen/Stiere (23%), 91 Jungtiere (28%) und 70 Kälber (22%) (statt der erhofften 80) ausgewählt.

Von den 320 ausgewählten Tieren mussten 13 aus den Berechnungen herausgenommen werden, da sie beim Erstbesuch vor der Behandlung aus dem Untersuchungsgatter ausbrachen und somit keine Isometamidiumchloridbehandlung zum Zeitpunkt 0 möglich war (ihre Behandlung erfolgte beim zweiten Besuch). Ein 14-tes Tier musste ebenfalls aus den Berechnungen herausgenommen werden, da das Röhrchen mit der Blutprobe vor der Untersuchung zerbrach.

Somit verblieben 306 Tiere für die Langzeituntersuchung in einem Verhältnis von 145 männlichen (47%) und 161 weiblichen Tieren (53%). Innerhalb der Altersgruppen wurden 81 adulte Kühe (26,5%), 72 adulte Ochsen/Stiere (23,5%), 85 Jungtiere (27,8%) und 68 Kälber (22,2%) ausgewählt.

**Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Rinderpopulation der Langzeitstudie, Provinz Kéné Dougou, Burkina Faso**

<b>Tiergruppe</b>	<b>Anzahl (N)</b>	<b>Prozent (%)</b>
Kühe	81	26,5
Ochsen/Stiere	72	23,5
Jungtiere/weiblich	41	13,4
Jungtiere/männlich	44	14,4
Kälber/weiblich	39	12,7
Kälber/männlich	29	9,5
Gesamt	306	100

### 3.3.3.2 Behandlungs- und Untersuchungsplan

Die 306 Rinder der vier Dörfer wurden initial im Juni 1999 mit Isometamidiumchlorid (Trypamidium®, 1mg/kg Körpergewicht) behandelt und monatlich bis zum November 1999 parasitologisch untersucht.

Alle erneut parasitologisch positiv getesteten Rinder oder Tiere mit einem Hämatokritwert < 25% wurden ab dem zweiten Besuch mit Diminazenazeturat (Berenil®) bei einer Dosierung von 7 mg/kg Körpergewicht nachbehandelt. Die Untersuchung und Probennahme erfolgte in Anlehnung an die Querschnittsstudie.

Von allen Kälbern wurden zusätzlich zu allen Untersuchungszeitpunkten Kotproben zur weiteren Untersuchung entnommen. Alle Kälber wurden zum zweiten Besuch, einen Monat nach ISMM-Behandlung, mit Febantel (Rintal®, 7,5 mg/kg Körpergewicht) entwurmt, und weiterhin mit Endoparasiten infizierte Kälber wurden zu den Folgebesuchen mit Albendazol (Vermidan®, 7,5 mg/kg KG) entwurmt

Alle Rinder wurden beim ersten Besuch im Juni 1999 mit einer elektronischen Waage (Marke: Barlo / Modell 210 D) gewogen. Der Gewichtsverlauf wurde nachfolgend nur in den Altersgruppen der Kälber und Jungtiere monatlich erfasst.

Zu allen Besuchen wurde die Körperkondition aller Tiere erhoben (siehe 3.2.1.3).

In allen vier Dörfern fand zeitgleich zu den parasitologischen Untersuchungen eine entomologische Studie, wie in unter 3.2.1.4 beschrieben, statt. An Wasserstellen der Rinder und anderen geeigneten Tsetsehabitaten in Dorfnähe wurden pro Dorf je 20 mono- und bikonische Fliegenfallen für einen Zeitraum von 24 Stunden aufgestellt. Die geographischen Längen- und Breiten-Koordinaten der Fallenpositionen, sowie der Dörfer- und Herdenstandorte, wurden mittels des Global Positioning System (GPS) erfasst.



Die Fallenstandorte wurden mit wasserfester Farbe markiert, um sicherzustellen, dass die Fallen zu allen Besuchen an denselben Standorten aufgestellt werden konnten. Die gefangenen Fliegen wurden durch ausgebildete Mitarbeiter des CIRDES identifiziert, nach ihrem Alter klassifiziert und eine repräsentative Anzahl für die Trypanosomendiagnostik seziiert.

Proben infizierter Organe und Blutmahlzeiten wurden, wie unter 3.2.1.4.3 beschrieben, entnommen.

### 3.3 Statistische Methoden

Lage- und Streuungsgrößen von Datenreihen wurden mit Methoden der beschreibenden Statistik in Tabellen und Graphiken mit den Computer-Programmen EXCEL und SAS bestimmt.

Bei angegebenen Konfidenzintervallen (KI), handelte es sich immer um 95%ige KI. Lag eine binomiale Verteilung (Wahrscheinlichkeitsmodelle bei der Beurteilung von Versuchsergebnissen, die sich als relative Häufigkeit ausdrücken lassen) vor, wie es z.B. bei den Prävalenzdaten, Fehlerraten und Inzidenz-Raten der Fall war, wurden die nicht-symmetrischen Konfidenzintervalle mit Hilfe eines SAS-Programmes (mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Biometrie der Tierärztlichen Hochschule Hannover / Berechnung nach SACHS, 1999) ermittelt.

Die KI für die Mittelwerte von Hämatokritwerten, Körpergewichten und Körperkonditionswerten wurden mit der EXCEL-Funktion nach der Formel  $KI = \text{Mittelwert} \pm 1,96 \times (\text{Standardabweichung der Grundgesamtheit}/\text{Wurzel des Stichprobenumfangs})$  berechnet; hierbei entspricht der Wert  $\pm 1,96$  der Fläche unter der Kurve der standardisierten Normalverteilung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

Als Signifikanztest wurde zum Vergleich zweier relativer Häufigkeiten (Einfluss Geschlecht (Alter, Rasse, Körperkondition) auf Trypanosomeninfektion) der  $\chi^2$ -Test eingesetzt.

Als Signifikanztest (nach vorhergehender Prüfung, ob eine Normalverteilung vorlag) zwischen Mittelwerten im Verlauf der Untersuchung (durchschnittliche Hämatokritwerte und Körpergewichte der Untersuchungspopulation zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten) wurde der t-Test angewandt.

Waren die Daten nicht normal verteilt (bei zum Teil niedrigen Stichprobenumfängen) kam der Wilcoxon Test zum Einsatz.

Da nicht in jedem Fall die für Signifikanztests benötigten Stichprobenumfänge gewährleistet waren, werden die Ergebnisse der Tests zum Teil nicht als „signifikant – nicht signifikant“, sondern qualitativ bewertet.