

4 ERGEBNISSE

In diesem Kapitel werden zu Beginn die Ergebnisse der Spezifitäts- und Sensitivitätstests der optimierten PCR-Systeme, die zur Analyse ausgewählter Blutproben von Rindern aus der ISMM-Studie eingesetzt wurden, präsentiert.

Die Simplex-PCR-Ergebnisse dieser Blutproben, deren Entnahme vor und 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe der Rinder bzw. 14 Tage nach einer zusätzlichen DIM-Behandlung einiger Tiere erfolgt war, sind im Vergleich zu den BCT-Ergebnissen dargestellt. Anhand dieser und der Ergebnisse der DNA-Sondenhybridisierung wird die Eignung der Methoden zur Überprüfung des Behandlungserfolges von Trypanosomeninfektionen bei natürlich infizierten Rindern beurteilt (Kap. 5.2, 5.3). Ergänzend dazu sind auch Ergebnisse der Mäuseinokulation (DIARRA, 2001) vergleichend zur BCT und zur PCR sowie die mittleren Hämatokritwerte der BCT- und PCR-positiven und -negativen Rinder und deren Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung aufgeführt.

Die Ergebnisse der Multiplex-PCR von Proben mit Einfach- und Mischinfektionen sind im Vergleich zur Simplex-PCR dargestellt.

4.1 ANALYTISCHE SPEZIFITÄT DER PCR

Beim Spezifitätstest amplifizierten die Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense savannah* und *T. congolense forest* (Kap. 8.1.1) jeweils ausschließlich das DNA-Produkt der erwarteten Größe. Es war mittels Elektrophorese bei den Proben, die DNA des entsprechenden Trypanosomenreferenzstammes enthielten (100 pg DNA/PCR-Ansatz), und bei Mischproben, die DNA von jedem Trypanosomenreferenzstamm enthielten (je 100 pg DNA/PCR-Ansatz), nachweisbar (Abb. 4.1). Die Proben, die DNA anderer Trypanosomenreferenzstämme oder Wasser (Negativkontrollen) enthielten waren negativ.

Um nachzuprüfen, ob unspezifische Produkte in Gegenwart eines Überschusses an Nicht-Ziel-DNA entstehen (z.B. Wirtstier-DNA), wurde jedes Primerpaar außerdem mit 30 Proben, die DNA-Extrakte von Rinderblutproben aus einem Nicht-Endemiegebiet (Berliner Umland) enthielten, getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren ebenfalls negativ.

Mit der Multiplex-PCR wurden die drei Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax*, und *T. congolense savannah* kombiniert getestet. Die entsprechenden spezifischen DNA-Produkte waren sowohl bei den Proben, die DNA von je einer Trypanosomenart (100 pg DNA/PCR-Ansatz) enthielten (Abb. 4.2), als auch bei den DNA-Mischproben, die DNA der drei Trypanosomenarten in gleichen Konzentrationen enthielten, nachweisbar (Abb. 4.4 A). Bei der negativen Kontrollprobe mit Rinder-DNA wurde auf dem Niveau von ca. 200 bp ein DNA-Produkt gebildet, das aufgrund der Ergebnisse der DNA-Sondenhybridisierung als unspezifisches Produkt bestätigt wurde (Kap. 4.4). Dieses tauchte bei den nachfolgenden

Untersuchungen auch bei mehreren Feldproben (insbesondere von PCR-negativen Rindern) auf. Das Ergebnis der negativen Kontrollprobe mit Wasser war eindeutig negativ (Abb. 4.2).

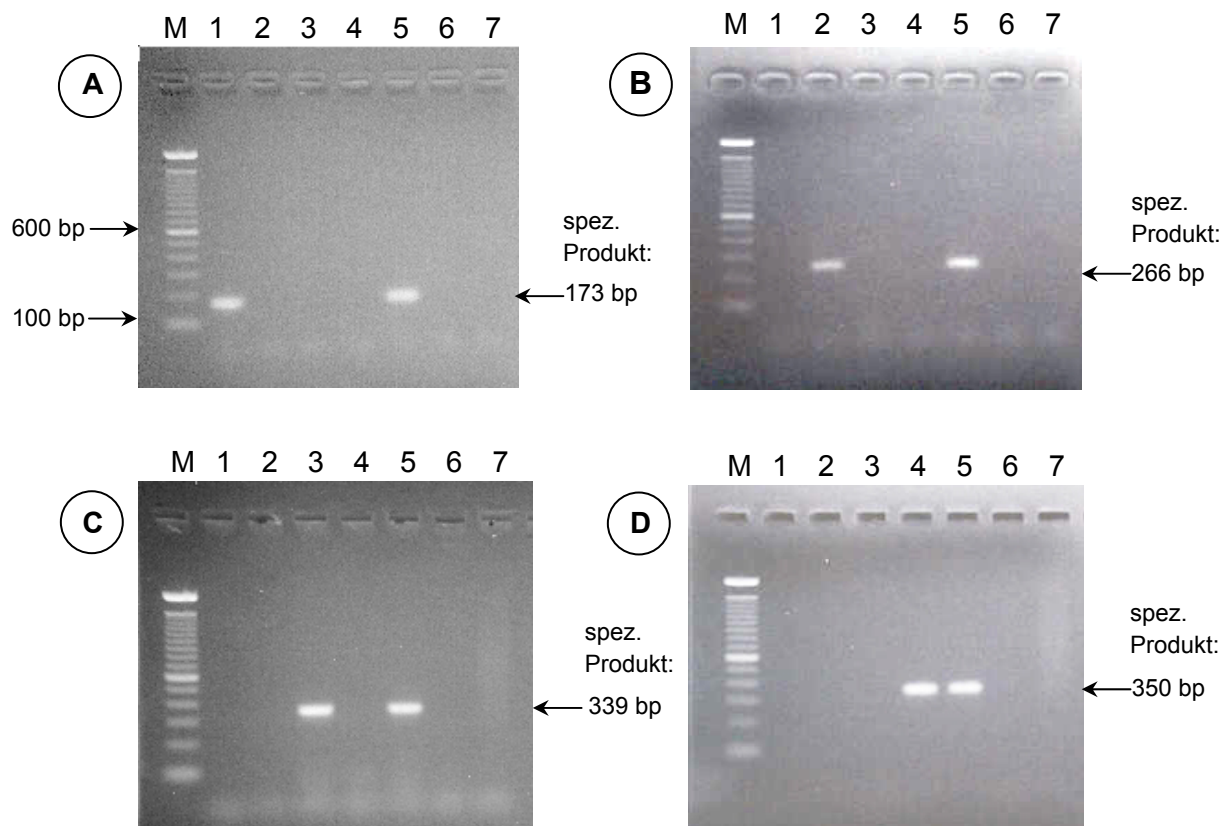


Abb. 4.1: Überprüfung der analytischen Spezifität der Primer **A)** TBR1.45/2.47 für *T. brucei*, **B)** TV24.80/24.322 für *T. vivax*, **C)** TCN1/2.38 für *T. congolense* savannah und **D)** TCF1/2 für *T. congolense* forest. Pro PCR-Ansatz waren je 100 pg DNA der Trypanosomenreferenzstämme enthalten; die DNA-Mischprobe enthielt je 100 pg DNA von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah und *T. congolense* forest

Position der Proben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. brucei*, Bahn 2 = *T. vivax*, Bahn 3 = *T. congolense* savannah, Bahn 4 = *T. congolense* forest, Bahn 5 = DNA-Mischprobe, Bahn 6 = negatives Rind, Bahn 7 = DNase- und RNase freies Wasser

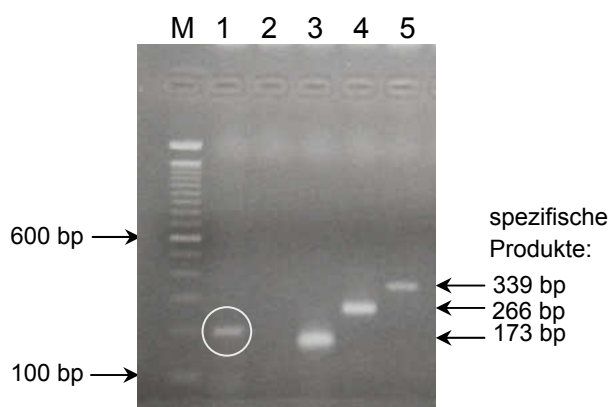


Abb. 4.2: Überprüfung der analytischen Spezifität der Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah mit der Multiplex-PCR. (DNA-Konzentrationen siehe Abb. 4.1)

Position der Proben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = negatives Rind, Bahn 2 = DNase- und RNase freies Wasser, Bahn 3 = *T. brucei*, Bahn 4 = *T. vivax*, Bahn 5 = *T. congolense* savannah

○ = unspezifisches Produkt in negativer Kontrollprobe Rind

4.2 ANALYTISCHE SENSITIVITÄT DER PCR

Jedes der Primerpaare (Kap. 8.1.1) bildete bis zur Verdünnungsstufe von 100 fg DNA/PCR-Ansatz bei den Proben mit der korrespondierenden DNA das erwartete spezifische Amplifikationsprodukt (Abb. 4.3). Das mit dem Primerpaar zum Nachweis von *T. congolense* forest bei dieser Verdünnungsstufe amplifizierte Produkt erzeugte nur eine sehr schwach sichtbare Bande bei der Elektrophorese (Abb. 4.3 D).

Die theoretische Nachweisgrenze der PCR lag damit bei einem Trypanosom pro PCR-Ansatz, wenn davon ausgegangen wird, dass 100 fg DNA etwa die DNA-Menge ist, welche ein einzelner Parasit enthält (BORST *et al.*, 1982). Bei den hier durchgeführten DNA-Extraktionsansätzen (mit je 250 µl Blut) und PCR-Ansätzen (mit je 5 µl Template) lag die Nachweisgrenze also theoretisch bei mindestens 200 Trypanosomen pro ml Blut.

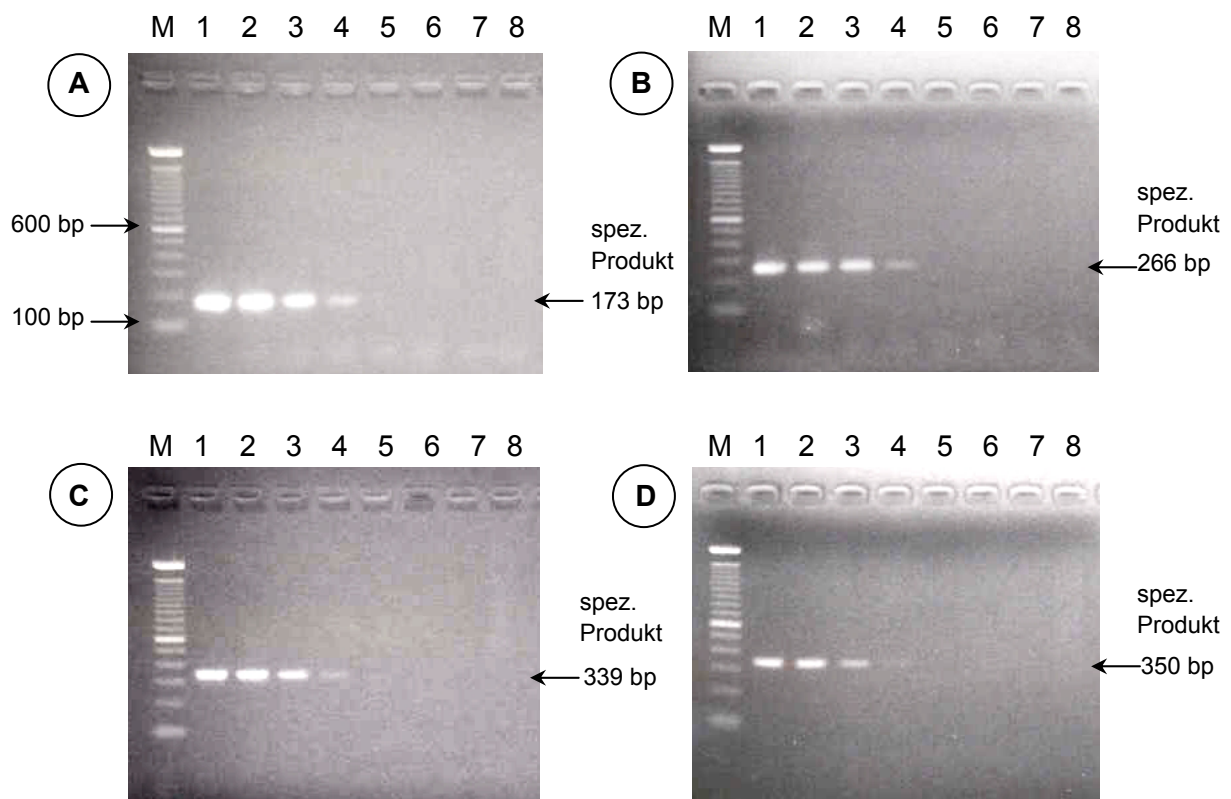


Abb. 4.3: Überprüfung der analytischen Sensitivität der Primer A) TBR1.45/2.47 für *T. brucei*, B) TV24.80/24.322 für *T. vivax*, C) TCN1/2.38 für *T. congolense* savannah und D) TCF1/2 für *T. congolense* forest mit dekadischen Verdünnungsreihen von DNA-Extrakten der Trypanosomenreferenzstämmen beginnend mit einer Konzentration von 100 pg DNA/PCR-Ansatz.

Position der Proben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = 100 pg DNA, Bahn 2 = 10 pg DNA, Bahn 3 = 1 pg DNA, Bahn 4 = 100 fg DNA, Bahn 5 = 10 fg DNA, Bahn 6 = 1 pg DNA, Bahn 7 = negatives Rind, Bahn 8 = DNase- und RNase freies Wasser

Mit der Multiplex-PCR wurden bei DNA-Mischproben, welche dieselbe DNA-Konzentration von jeder Trypanosomenspezies enthielten, bis zur 100 fg-Verdünnungsstufe jeweils alle spezifischen Produkte gebildet (Abb. 4.3 A). Bei Proben, welche unterschiedliche DNA-Konzentrationen der verschiedenen Trypanosomenspezies enthielten, waren nur die Trypanosomenspezies, von denen die jeweils höhere DNA-Konzentration stammte, nachweisbar (Abb. 4.4 B).

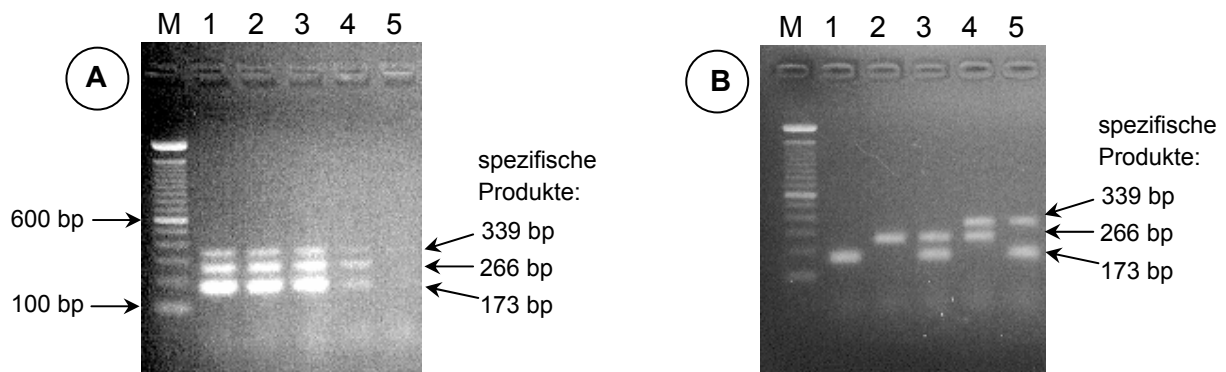


Abb. 4.4: Überprüfung der analytischen Sensitivität der Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah in der Multiplex-PCR: A) mit einer dekadischen Verdünnungsreihe und B) mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen; die Konzentrationsangaben unten beziehen sich jeweils auf den PCR-Ansatz

Position der Proben bei A: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. brucei* / *T. vivax* / *T. congolense* savannah (DNA-Mischprobe) je 100 pg DNA, Bahn 2 = DNA-Mischprobe je 10 pg DNA, Bahn 3 = DNA-Mischprobe je 1 pg DNA, Bahn 4 = DNA-Mischprobe je 100 fg DNA, Bahn 5 = DNA-Mischprobe je 10 fg DNA

Position der Proben bei B: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. brucei* (100 pg DNA) / *T. congolense* savannah (100 fg DNA), Bahn 2 = *T. vivax* (100 pg DNA) / *T. congolense* savannah (100 fg DNA) Bahn 3 = *T. brucei* (100 pg DNA) / *T. vivax* (100 pg DNA) / *T. congolense* savannah (100 fg DNA), Bahn 4 = *T. brucei* (100 fg DNA) / *T. vivax* (100 pg DNA) / *T. congolense* savannah (100 pg DNA), Bahn 5 = *T. brucei* (100 pg DNA) / *T. vivax* (100 fg DNA) / *T. congolense* savannah (100 pg DNA)

4.3 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR

4.3.1 Betrachtung der gesamten PCR-Stichprobe

4.3.1.1 Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung

Wie bei der Auswahl der Blutproben für die PCR beschrieben wurde (Kap. 3.5.), waren alle Blutproben der Rinder, die vor der ISMM-Behandlung parasitologisch positiv waren (90), in der PCR-Stichprobe enthalten. Außerdem wurden 90 zufällig ausgewählte Blutproben von 648 parasitologisch negativen Rindern untersucht.

Mit den Primerpaaren zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah konnten in drei aufeinanderfolgenden Simplex-PCR-Läufen bei 117 der 180 untersuchten Proben spezifische DNA-Produkte von mindestens einer dieser Trypanosomenspezies nachgewiesen werden. Dabei wurden 92,2% (83/90) der BCT-positiven Proben mit der PCR bestätigt, während sieben Proben nicht identifiziert werden konnten. Außerdem war bei 37,8% (34/90) der Proben von BCT-negativen Rindern Trypanosomen-DNA mit der PCR nachweisbar; 62,2% dieser Proben hatten gleichfalls ein negatives PCR-Ergebnis. (Abb. 4.5).

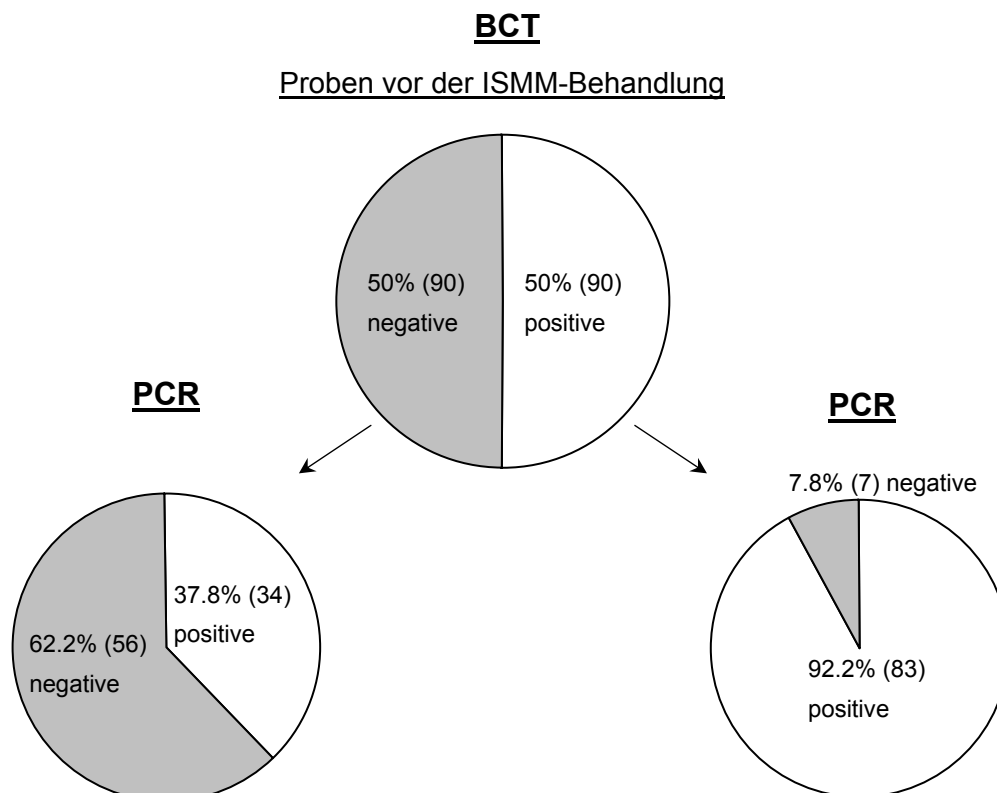


Abb. 4.5: Anteil der PCR-positiven und -negativen Reagenten unter den BCT-positiven und -negativen Rindern vor der ISMM-Behandlung

Zwei der sieben nicht identifizierten Proben von den 90 BCT-positiven Rindern reagierten mit dem spezifischen Primerpaar zum Nachweis von *T. congolense* forest. Damit erhöhte sich die Zahl der PCR-positiven Proben auf 85 von 90, bzw. die Identifikationsrate der parasitologisch positiven Tiere mit der PCR auf 94,4%. Fünf BCT-positive Proben waren auch beim PCR-Nachweis auf *T. congolense* forest negativ.

4.3.1.2 Schätzung der PCR-Prävalenz

Die BCT-Prävalenz der gesamten Untersuchungsherde der ISMM-Studie betrug vor der ISMM-Prophylaxe 12,2% (90/738) mit einem 95%igen Konfidenzintervall (KI) von 9,8% bis 14,6%. Die PCR-Prävalenz wurde aus den oben genannten Werten (ohne Berücksichtigung der beiden positiven Proben mit *T. congolense* forest) berechnet (Kap. 3.9). Sie setzt sich aus den Wahrscheinlichkeiten für PCR-positive Reagenten unter den BCT-positiven und unter den BCT-negativen Rindern zusammen. Weil alle BCT-positiven Blutproben in der PCR-Stichprobe enthalten waren, konnte für die Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven Rindern ein konkreter Wert ermittelt werden (83/90). Die Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-negativen Rindern wurde anhand des Stichprobenergebnis geschätzt (Kap. 3.9). Demzufolge würden unter den 648 BCT-negativen Rindern der Untersuchungsherde ca. 245 PCR-positive Reagenten erwartet werden. Nach Addition der 83 PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven Rindern zu dieser Zahl wären insgesamt etwa 328 der 738 Rinder PCR-positiv. In der Annahme einer tatsächlichen BCT-Prävalenz von 12,2%, würde die geschätzte PCR-Prävalenz der Untersuchungsherde 44,4% mit einem 95%igen KI von 35,6% bis 53,2% betragen.

4.3.1.3 Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

Von 177 der 180 ausgewählten Rinder konnten 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe wiederum Blutproben gewonnen werden. Davon stammten 89 Blutproben von Rindern, die vor der ISMM-Behandlung BCT-positiv gewesen waren und 88 Blutproben von Rindern, die vor der ISMM-Behandlung BCT-negativ gewesen waren (Abb. 4.10). Drei Rinder waren nicht zur Nachuntersuchung vorgestellt worden.

Bei der parasitologischen Untersuchung wurden bei 35 (19,8%) der 177 Rinder Trypanosomen diagnostiziert. Bis auf eine Ausnahme waren diese Tiere auch schon vor der ISMM-Prophylaxe BCT-positiv gewesen (Abb. 4.10). Das zuvor BCT-negative Rind hatte vor der ISMM-Prophylaxe PCR-positiv reagiert.

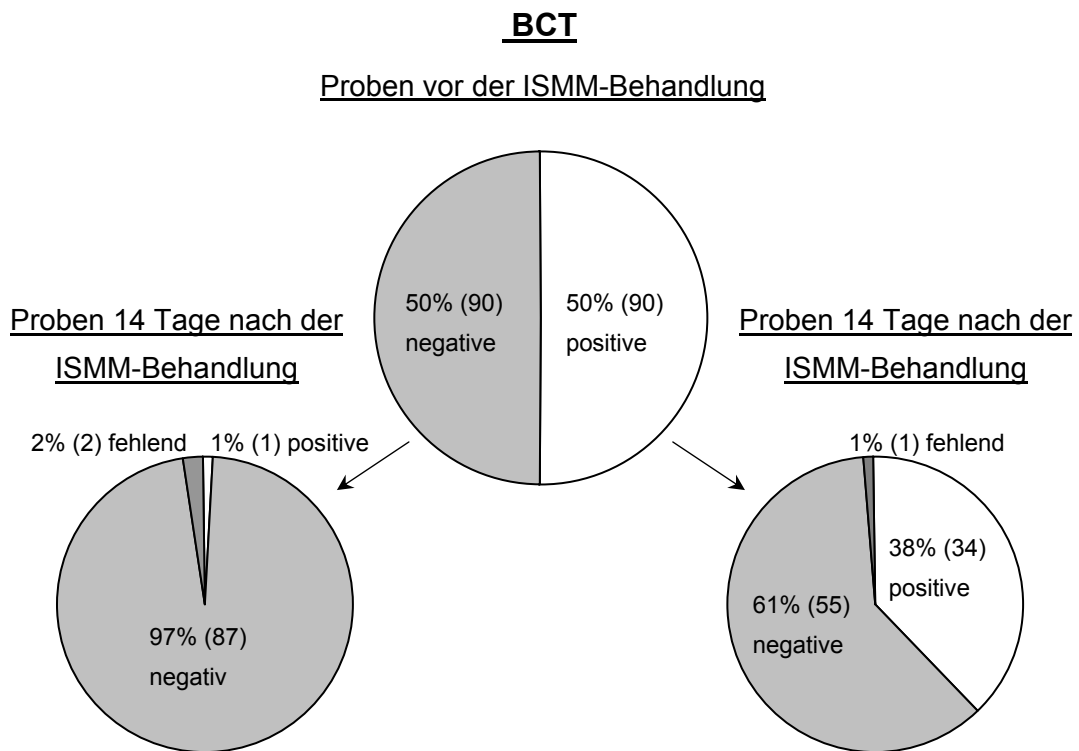


Abb. 4.10.: Anteil BCT-positiver und -negativer Rinder 14 Tage nach der ISMM-Behandlung unter den BCT-positiven und -negativen Rindern vor der ISMM-Behandlung

Die PCR-Ergebnisse ergaben insgesamt 75 (42,4%) positive Reagenten unter den 177 getesteten Blutproben (Abb. 4.11). Vor der ISMM-Behandlung waren schon 73 davon mit der PCR bzw. 62 mit der BCT positiv gewesen. Die zwei Proben, die zuvor PCR-negativ reagiert hatten, gehörten zu den mit der PCR nicht identifizierten parasitologisch positiven Proben. Von den 35 BCT-positiven Proben wurden 34 oder 97,1% mit der PCR bestätigt. Damit wurde 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe eine höhere Identifikationsrate BCT-positiver Tiere mit der PCR erreicht als vor der ISMM-Behandlung.

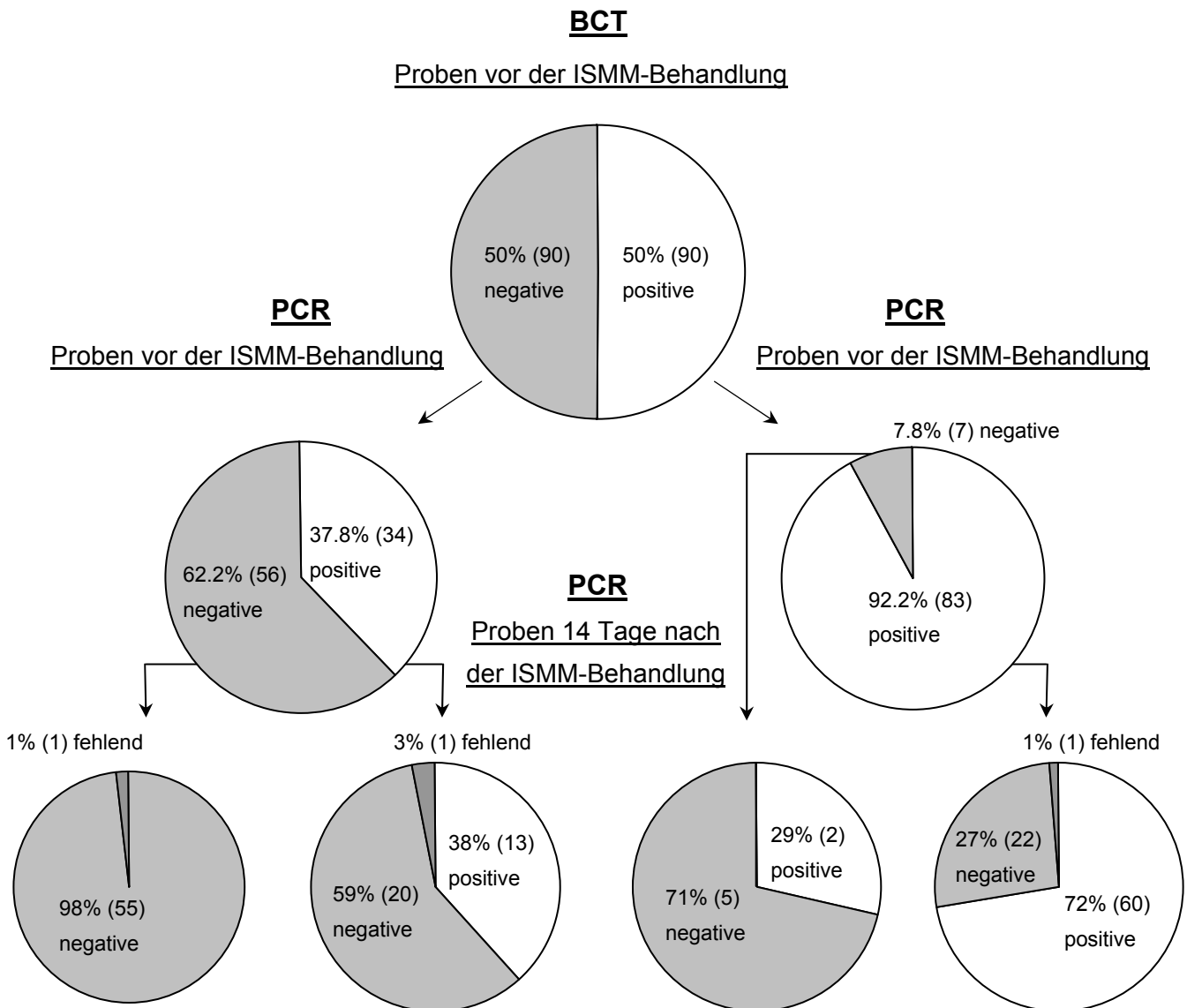


Abb. 4.11: Anteil PCR-positiver und -negativer Reagenten 14 Tage nach der ISMM-Behandlung unter den PCR-positiven und -negativen Reagenten vor der ISMM-Behandlung

4.3.1.4 Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung

Die 35 Rinder, die 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe parasitologisch positiv waren, erhielten eine zusätzliche DIM-Behandlung (3,5 mg/kg KGW). Bei der Nachuntersuchung 14 Tage später wurden 34 davon erneut vorgestellt. Blutproben dieser Tiere wurden ebenfalls parasitologisch und mit der PCR untersucht.

Während bei 14,7% (5/34) der Rinder wiederum Trypanosomen im Blut festgestellt wurden, waren bei 61,8% (21/34) positive Reaktionen mit der PCR nachweisbar. Dabei waren alle parasitärischen Rinder auch PCR-positiv - die Identifikationsrate der BCT-positiven Rinder mit der PCR betrug somit 100%.

Bis auf eine Ausnahme waren alle Rinder auch schon vor der ISMM-Behandlung parasitologisch positiv gewesen. Sie stammten also fast vollständig aus der Gruppe der 90 parasitärischen Tiere zum Zeitpunkt vor der ISMM-Behandlung.

Mit der PCR waren ebenfalls alle Rinder bis auf je eine BCT-positive Ausnahme vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe schon bei den Voruntersuchungen positiv gewesen.

4.3.1.5 Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung

Vor der Trypanozidbehandlung wurden mit der PCR im Vergleich zur BCT 30% mehr positive Rinder diagnostiziert (90 BCT-positiv und 117 PCR-positiv Rinder).

Nach den Trypanozidbehandlungen der Rinder hatte sich die diagnostische Differenz zwischen den beiden Methoden erheblich vergrößert: Vierzehn Tage nach der ISMM-Prophylaxe wurden mit der PCR bei denselben Rindern 114% mehr positive Tiere nachgewiesen als mit der BCT (35 BCT-positiv und 75 PCR-positiv Rinder).

Vierzehn Tage nach der zusätzlichen DIM-Therapie der Rinder, die nach der ISMM-Prophylaxe erneut parasitärisch waren, wurden mit der PCR sogar 320% mehr positive Reagenten festgestellt als mit der BCT (5 BCT-positiv und 21 PCR-positiv Rinder). Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass jedes nach der DIM-Therapie untersuchte Rind vor der Behandlung parasitärisch war. Im Gegensatz dazu war die Hälfte der nach der ISMM-Prophylaxe untersuchten Tiere vor der Behandlung aparasitärisch.

4.3.2 Betrachtung der Ergebnisse auf Dorfebene

4.3.2.1 Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung

Während der Querschnittsstudie hatte die BCT-Prävalenz in neun von 25 untersuchten Dörfern in Orodara und Koloko $\geq 10\%$ betragen. Diese neun hochprävalenten Dörfer sowie ein Dorf (Fama) mit niedriger Prävalenz waren als Untersuchungsorte für die ISMM-Studie ausgewählt worden (Kap. 3.5.1).

Vor der ISMM-Behandlung überschritt die BCT-Prävalenz in sieben der hochprävalenten Dörfer wiederum zehn Prozent, wobei Werte zwischen 11,4% (Samogohiri) und 27,5% (Kotoura) erreicht wurden. In zwei Dörfern lag sie mit 5,4% (Sokoroni) bzw. 3,3% (Kolokaka) darunter. In Fama waren alle untersuchten Rinder parasitologisch negativ.

Wegen der geringen Anzahl der pro Dorf untersuchten Blutproben in der PCR-Stichprobe wurden bei den einzelnen Dörfern keine PCR-Prävalenzen berechnet.

In sechs Dörfern wurden alle parasitologisch positiven Rinder mit der PCR bestätigt. Sieben parasitologisch positive Rinder (Kap. 4.3.1.1), die nicht mit der PCR identifiziert werden konnten, stammten aus drei verschiedenen Dörfern (Tab. 4.1). Bei einer zusätzlichen PCR mit dem spezifischen Primerpaar zum Nachweis von *T. congolense* forest reagierten die Proben der Rinder aus Toussian-Bandougou und Sipigui positiv. Nur fünf parasitologisch positive Rinder aus Sokoroni konnten auch mit der zusätzlichen PCR nicht identifiziert werden. Alle aus Fama stammenden Proben waren mit der PCR ebenfalls negativ.

In acht Dörfern wurden unter den parasitologisch negativen Rindern insgesamt 34 positive Reagenten mit der PCR ermittelt. Bis auf Fama und Sipigui wurden also in jedem Dorf PCR-positive Reagenten unter den aparasitämischen Tieren nachgewiesen, wobei ihr Anteil zwischen 7,1% und 85,7% variierte. Die Tabelle 4.1 auf der folgenden Seite zeigt die genaue Aufteilung der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven und -negativen Rindern der PCR-Stichprobe.

Die Anzahl insgesamt pro Dorf mit der BCT und PCR vor der ISMM-Behandlung positiv auf Trypanosomen getesteten Rinder der PCR-Stichprobe wurde in Tabelle 4.4 zum besseren Vergleich gemeinsam mit den Untersuchungsergebnissen von 14 Tage nach der ISMM-Behandlung bzw. 14 Tage nach der DIM-Behandlung aufgelistet.

Tab. 4.1: Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven bzw. BCT-negativen Rindern der PCR-Stichprobe (Prozentwerte in Klammern)

Dorf	PCR-positiv / BCT-Positiv		PCR-Positiv / BCT-Negativ	
Dieri	10 / 10	(100%)	8 / 13	(61,5%)
Samogohiri	9 / 9	(100%)	7 / 12	(58,3%)
Toussian-Bandougou	20 / 21 21 / 21	(95,2%) (100%)*	4 / 6	(66,7%)
Sipigui	4 / 5 5 / 5	(80%) (100%)*	0 / 6	(0%)
M'Bie	4 / 4	(100%)	3 / 5	(60%)
Kolokaka	2 / 2	(100%)	2 / 9	(22,2%)
Sokouraba	10 / 10	(100%)	3 / 7	(42,9%)
Sokoroni	2 / 7	(28,6%)	1 / 14	(7,1%)
Fama	0 / 0	-	0 / 11	(0%)
Kotoura	22 / 22	(100%)	6 / 7	(85,7%)
gesamt	83 / 90 85 / 90	(92,2%) (94,4%)*	34 / 90	(37,8%)

*Werte unter Einbeziehung der PCR-positiven Proben nach der zusätzlichen Untersuchung auf *T. congolense forest*

4.3.2.2 Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

Vierzehn Tage nach der ISMM-Prophylaxe wurden bei Rindern aus sieben der zehn Dörfer erneut Trypanosomeninfektionen mit der BCT nachgewiesen. Mit der PCR wurden in neun der zehn Dörfer positive Fälle aufgedeckt. In Fama waren wie vor der ISMM-Behandlung alle untersuchten Rinder mit beiden Methoden negativ.

Bis auf ein Rind aus M'Bie wurden alle parasitologisch positiven Rinder aus den sieben Dörfern mit der PCR bestätigt. Außerdem wurden in jedem Dorf, ausgenommen Fama, PCR-positiv Reagenten unter den parasitologisch negativen Tieren ermittelt, deren Anteil zwischen 5% und 55,6% variierte. In Tabelle 4.2 auf der folgenden Seite ist die Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven und -negativen Rindern der PCR-Stichprobe für jedes Dorf dargestellt.

Tab. 4.2: Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven bzw. BCT-negativen Rindern der PCR-Stichprobe 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe (Prozentwerte in Klammern)

Dorf	PCR-positiv / BCT-Positiv		PCR-Positiv / BCT-Negativ	
Dieri	6 / 6	(100%)	6 / 17	(35,3%)
Samogohiri	0 / 0	-	6 / 21	(28,6%)
Toussian-Bandougou	7 / 7	(100%)	10 / 20	(50%)
Sipigui	0 / 0	-	4 / 11	(36,4%)
M'Bie	1 / 2	(50%)	1 / 7	(14,3%)
Kolokaka	1 / 1	(100%)	2 / 9	(22,2%)
Sokouraba	7 / 7	(100%)	1 / 8	(12,5%)
Sokoroni	1 / 1	(100%)	1 / 20	(5%)
Fama	0 / 0	-	0 / 11	(0%)
Kotoura	11 / 11	(100%)	10 / 18	(55,6%)
gesamt	34 / 35	(97,1%)	41 / 142	(28,9%)

4.3.2.3 Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung

Die nach der zusätzlichen DIM-Therapie untersuchten 34 Rinder stammten aus den sieben Dörfern, in welchen 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe Behandlungsversagen mit der BCT festgestellt worden war (Tab. 4.3).

Trotz der zusätzlichen DIM-Behandlung waren zwei Wochen später fünf Rinder aus zwei Dörfern wiederum parasitämisch. Mit der PCR reagierte außer diesen Tieren auch der überwiegende Teil der aparasitämischen Tiere (insgesamt 21) aus allen sieben Herkunftsdörfern positiv.

In Tabelle 4.3 auf der folgenden Seite ist die Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den untersuchten BCT-positiven und -negativen Rindern der PCR-Stichprobe für jedes Dorf dargestellt.

Tab. 4.3: Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-positiven bzw. BCT-negativen Rindern der PCR-Stichprobe, die zusätzlich mit DIM behandelt wurden, 14 Tage nach dieser Behandlung (Prozentwerte in Klammern)

Dorf	PCR-positiv / BCT-Positiv		PCR-Positiv / BCT-Negativ	
Dieri	0 / 0	-	3 / 6	(50%)
Toussian-Bandougou	0 / 0	-	4 / 7	(57,1%)
M'Bie	0 / 0	-	2 / 2	(100%)
Kolokaka	0 / 0	-	1 / 1	(100%)
Sokouraba	4 / 4	(100%)	0 / 2	(0%)
Sokoroni	0 / 0	-	1 / 1	(100%)
Kotoura	1 / 1	(100%)	6 / 10	(60%)
gesamt	5 / 5	(100%)	21 / 29	(72,4%)

4.3.2.4 Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung

Die Betrachtung auf Dorfebene zeigte, dass die Anzahl der PCR-positiven Rinder pro Dorf bis auf zwei Ausnahmen vor der ISMM-Behandlung (hellgrau unterlegte Felder in Tab. 4.4) stets höher war als die Anzahl der BCT-positiven Rinder.

Vor der ISMM-Behandlung wurden mit beiden Methoden in neun von zehn untersuchten Dörfern Trypanosomeninfektionen bei Rindern nachgewiesen. Nach den Trypanozidbehandlungen wurden mit der BCT im Gegensatz zur PCR in manchen Dörfern keine Trypanosomeninfektionen mehr festgestellt. So wurden in zwei Dörfern nach der ISMM-Behandlung und in fünf Dörfern nach der DIM-Behandlung zwar keine parasitärischen Tiere mehr diagnostiziert, aber positive Reagenten mit der PCR ermittelt (dunkelgrau unterlegte Felder in Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Mit der BCT bzw. PCR positiv auf Trypanosomeninfektionen getestete Rinder der PCR-Stichprobe vor und 14 Tage nach der ISMM-Behandlung bzw. 14 Tage nach der zusätzlichen DIM-Behandlung

Anzahl der positiven Rinder / Anzahl der getesteten Rinder						
Dorf	vor ISMM		14 Tage nach ISMM		14 Tage nach DIM	
	BCT	PCR	BCT	PCR	BCT	PCR
Dieri	10 / 23	18 / 23	6 / 23	12 / 23	0 / 6	3 / 6
Samogohiri	9 / 21	16 / 21	0 / 21	6 / 21	0 / 0	0 / 0
Toussian-B.	21 / 27	24 / 27	7 / 27	17 / 27	0 / 7	4 / 7
Sipigui	5 / 11	4 / 11*	0 / 11	4 / 11	0 / 0	0 / 0
M'Bie	4 / 9	7 / 9	2 / 9	2 / 9	0 / 2	2 / 2
Kolokaka	2 / 11	4 / 11	1 / 10	3 / 10	0 / 1	1 / 1
Sokouraba	10 / 17	13 / 17	7 / 15	8 / 15	4 / 6	4 / 6
Sokoroni	7 / 21	3 / 21	1 / 21	2 / 21	0 / 1	1 / 1
Fama	0 / 11	0 / 11	0 / 11	0 / 11	0 / 0	0 / 0
Kotoura	22 / 29	28 / 29	11 / 29	21 / 29	1 / 11	6 / 11
Gesamt	90 / 180	117 / 180	35 / 177	75 / 177	5 / 34	21 / 34

*Die Zahl der PCR-positiven Rinder wäre hier unter Berücksichtigung der zusätzlichen PCR-Analyse auf *T. congolense* forest gleich der Anzahl der BCT-positiven Rinder.

Die hellgrau unterlegten Felder signalisieren Untersuchungen, bei denen mit der BCT mehr positive Tiere ermittelt wurden als mit der PCR.

Die dunkelgrau unterlegten Felder signalisieren Untersuchungen, bei denen nur PCR-positiv und aber keine BCT-positiven Tiere ermittelt wurden.

4.3.3 Verteilung der Trypanosomenspezies

4.3.3.1 Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung

Nach morphologischen Kriterien und nach dem Bewegungsmuster (Kap. 3.4) wurde bei 74,4% (67/90) der parasitologisch positiven Proben *T. congolense*, bei 27,8% (25/90) *T. vivax* und bei 2,7% (3/90) *T. brucei* identifiziert. Darunter waren 5,6% (5/90) Mischinfektionen mit Beteiligung von jeweils zwei Trypanosomenspezies (Abb. 4.6).

T. congolense wurde in allen Dörfern mit Trypanosomeninfektionen diagnostiziert. *T. vivax* kam bis auf eine Ausnahme (Kolokaka) ebenfalls in allen Dörfern mit Trypanosomeninfektionen vor. *T. brucei* wurde dagegen nur in einem Dorf (Toussian-Bandougou) diagnostiziert (Abb. 4.8).

Mit der Simplex-PCR war bei 80,3% (94/117) der Proben *T. congolense* savannah, bei 31,6% (37/117) *T. vivax* und bei 17,1% (20/117) *T. brucei* nachweisbar. Insgesamt reagierten 30 Proben bei mehreren PCR-Läufen positiv. Der Anteil an Mischinfektionen unter den PCR-positiven Proben betrug damit 25,6% (Abb. 4.7).

T. congolense savannah und *T. vivax* wurden in allen Dörfern mit positiven Reagenten nachgewiesen, während *T. brucei* ausschließlich bei Proben von vier Dörfern vorkam (Abb. 4.9).

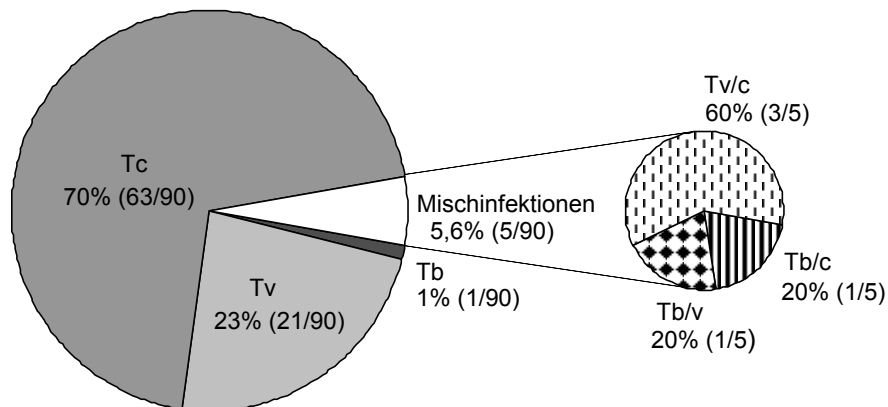


Abb. 4.6: Aufteilung der BCT-positiven Proben in Einfach- und Mischinfektionen

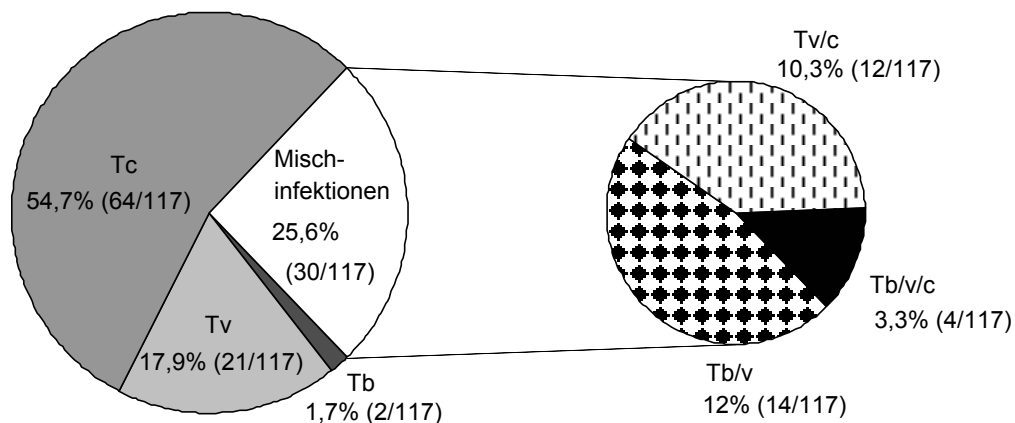


Abb. 4.7: Aufteilung der PCR-positiven Proben in Einfach- und Mischinfektionen

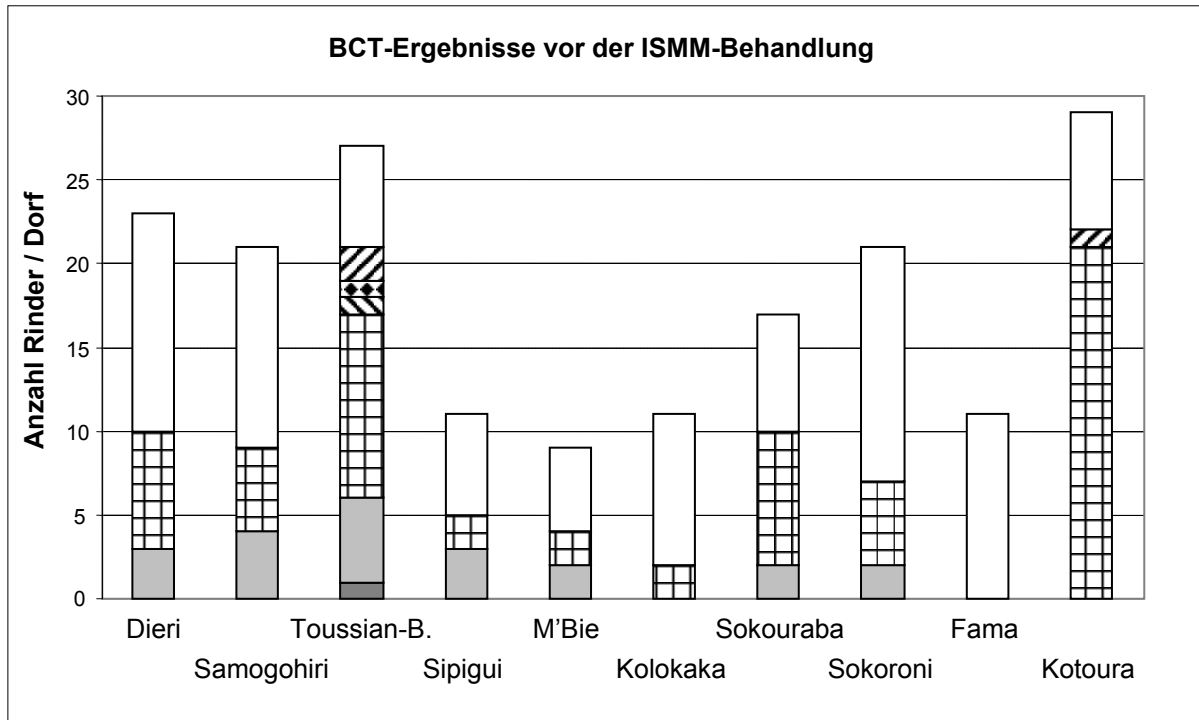


Abb. 4.8: BCT-positive Rinder mit Speziesdiagnose und BCT-negative Rinder der PCR-Stichprobe in den zehn untersuchten Dörfern (Legende unten)

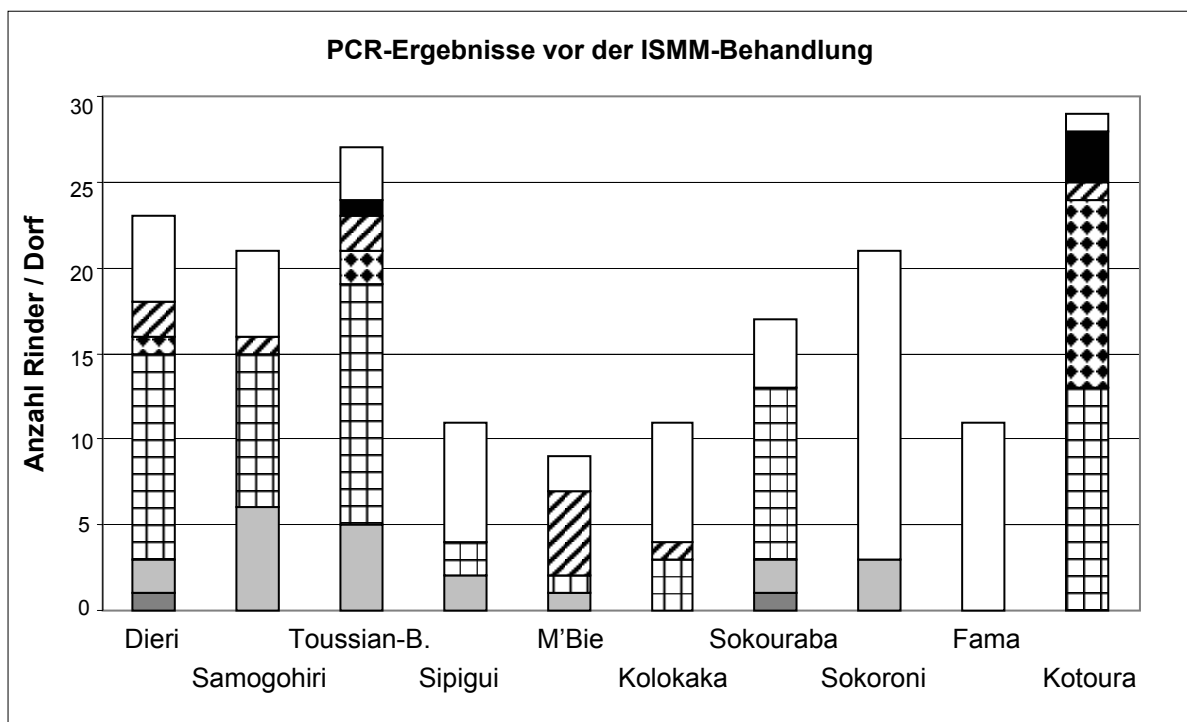
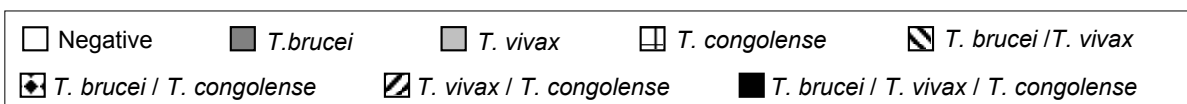


Abb. 4.9: PCR-positive Rinder mit Speziesdiagnose und PCR-negative Rinder der PCR-Stichprobe in den zehn untersuchten Dörfern (Legende unten; *T. congolense* = *T. congolense* savannah)



4.3.3.2 Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

Auch zwei Wochen nach der ISMM-Prophylaxe war *T. congolense* die mit beiden Methoden am häufigsten identifizierte Trypanosomenspezies. Sie wurde bei 82,9% (29/35) der BCT-positiven Rinder identifiziert, während bei 14,3% (5/35) *T. vivax* und bei 5,7% (2/35) *T. brucei* identifiziert wurden (Abb. 4.10). Bei einem Tier (2,9%) wurde eine Mischinfektion festgestellt.

Die PCR-positiven Reagenten entfielen zu 94,7% (71/75) auf *T. congolense savannah* und zu 8% (6/75) auf *T. vivax* (Abb. 4.11). Zwei der Proben zeigten eine Doppelreaktion, was 2,7% Mischinfektionen entspricht. *T. brucei* wurde mit der PCR nicht mehr nachgewiesen.

Gegenüber vor der ISMM-Behandlung war der mit der BCT diagnostizierte Anteil der *T. brucei*-Infektionen etwas gestiegen (von 2,7% auf 5,9%), während er mit der PCR auf 0 (von 17,1%) gefallen war.

Der Anteil der Mischinfektionen war nach der ISMM-Behandlung im Vergleich zu vorher bei beiden Methoden gesunken. Mit der BCT wurden 2,9% gegenüber zuvor 5,6% und mit der PCR 2,7% gegenüber zuvor 25,6% diagnostiziert. Beim direkten Erregernachweis wurde eine Mischinfektion mit *T. brucei* und *T. vivax* diagnostiziert, während mit der PCR zweimal die Kombination mit *T. congolense savannah* und *T. vivax* nachgewiesen wurde (Abb. 4.10 u. 4.11).

4.3.3.3 Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung

Vierzehn Tage nach der zusätzlichen DIM-Behandlung wurde beim Gros der positiven Rinder wiederum *T. congolense* (bzw. *T. congolense savannah*) diagnostiziert. Bei allen parasitologisch positiven Rindern (5/34) sowie 95,2% (20/21) der PCR-positiven Reagenten wurde diese Spezies nachgewiesen. *T. vivax* wurde nur bei einer Probe (4,8%) mit der PCR identifiziert. Mit beiden Methoden wurden weder Infektionen mit *T. brucei* noch Mischinfektionen nachgewiesen.

4.3.3.4 Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung

Sowohl vor den Trypanozidbehandlungen als auch danach war *T. congolense* (bzw. *T. congolense savannah*) die mit Abstand mit beiden Methoden am häufigsten diagnostizierte Spezies gefolgt von *T. vivax*.

Vor der ISMM-Behandlung wurden *T. brucei*-Infektionen mit der PCR sechsmal häufiger diagnostiziert als mit der BCT. Sie waren zumeist an Mischinfektionen beteiligt, die mit der PCR ebenfalls viel häufiger diagnostiziert wurden als mit der BCT. Nach der ISMM-Prophylaxe wurde diese Spezies mit der PCR überhaupt nicht mehr nachgewiesen, während sie parasitologisch zwei Wochen danach erneut identifiziert wurde. Mit der PCR wurde im

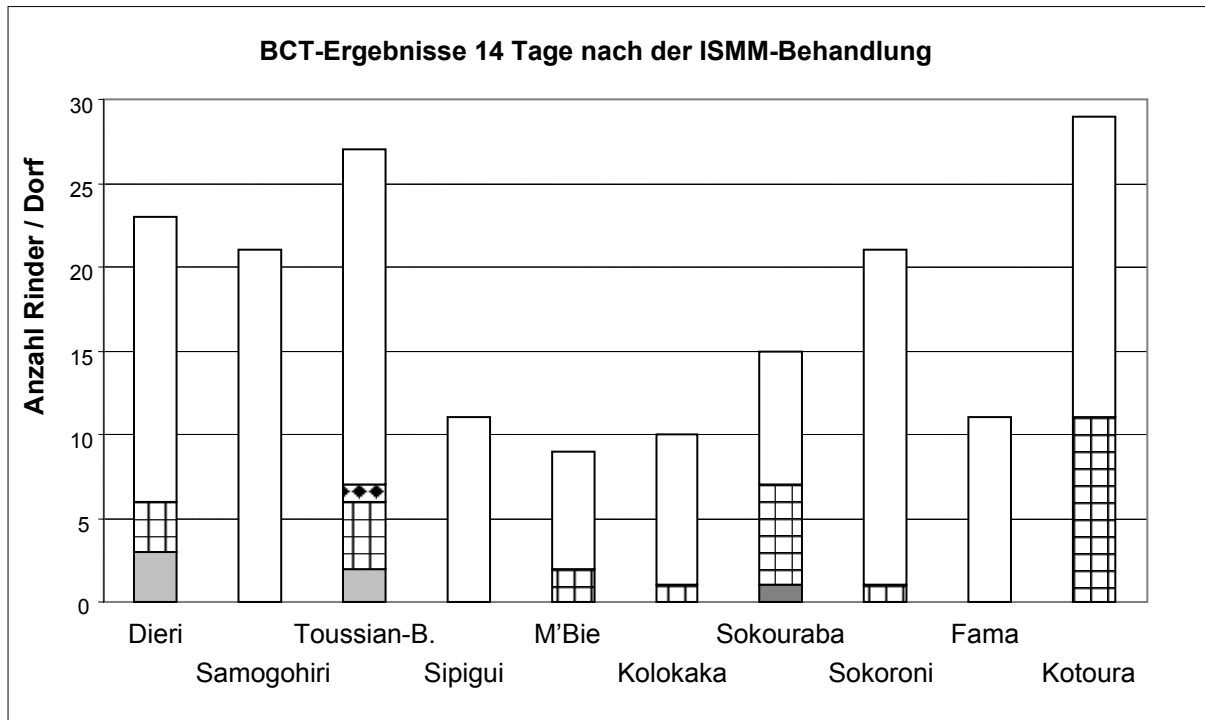


Abb. 4.10: BCT-positive Rinder mit Speziesdiagnose und BCT-negative Rinder der PCR-Stichprobe in den zehn untersuchten Dörfern (Legende unten)

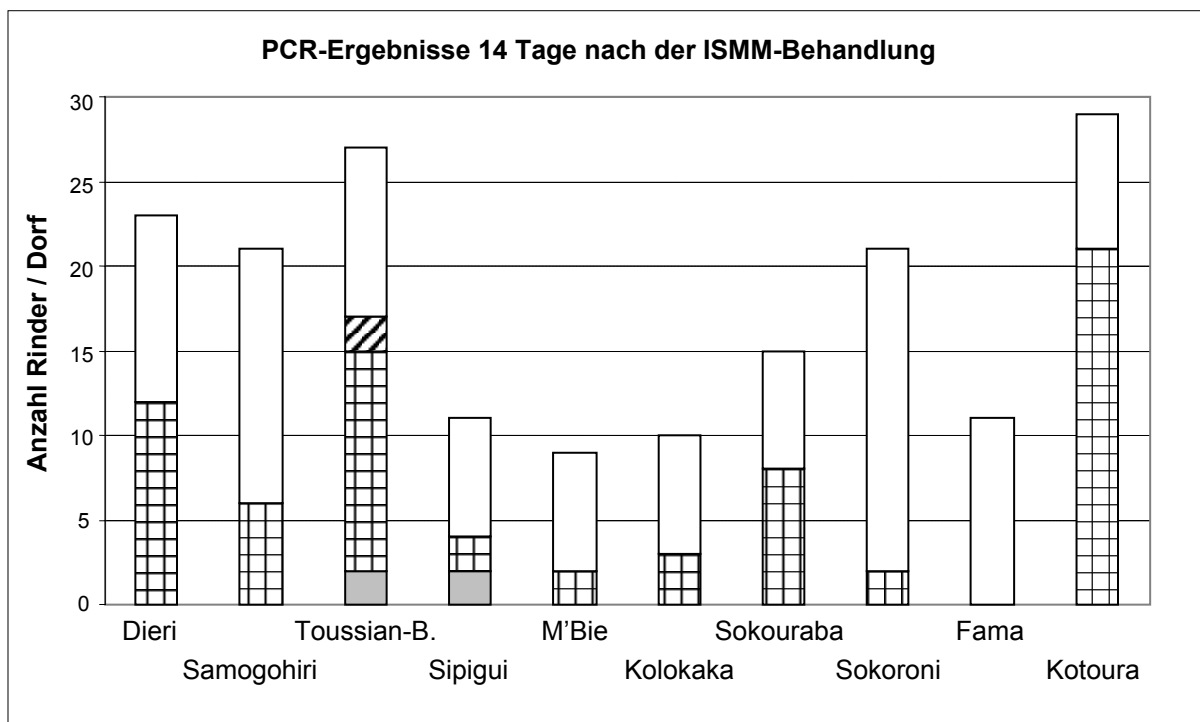
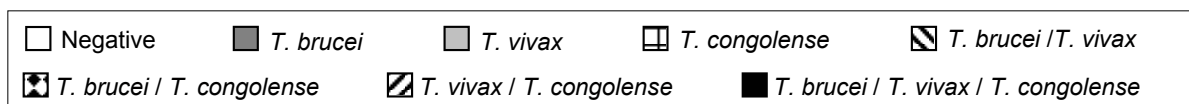


Abb. 4.11: PCR-positive Rinder mit Speziesdiagnose und PCR-negative Rinder der PCR-Stichprobe in den zehn untersuchten Dörfern (Legende unten; *T. congolense* = *T. congolense* savannah)



Gegensatz zur BCT nach der DIM-Behandlung außer *T. congolense*-Infektionen auch eine *T. vivax*-Infektion nachgewiesen.

4.3.4 Übereinstimmung in der Speziesdiagnostik

Die bisher präsentierten Ergebnisse enthielten keine Information über die Übereinstimmung der Speziesdiagnosen von BCT und PCR.

Anhand der parasitologisch positiven Rinder vor der ISMM-Behandlung sowie 14 Tage danach wurden die folgenden Tabellen 4.5 und 4.6 erstellt, aus denen die Übereinstimmung der beiden Methoden bei der Speziesdiagnostik ersichtlich wird. Die Speziesdiagnosen der fünf parasitärischen Tiere 14 Tage nach der DIM-Behandlung (*T. congolense*) stimmten vollständig mit dem PCR-Ergebnis überein und werden deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Tab. 4.5: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von BCT und PCR bei den 90 BCT-positiven Rindern vor der ISMM-Behandlung

		BCT							Total
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T.c.</i>	<i>T. b./v.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	<i>T.b./v./c.</i>	
PCR	<i>T. b.</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
	<i>T. v.</i>	0	15	1	1	0	0	0	17
	<i>T. c.s.</i>	1	3	36	0	0	2	0	42
	<i>T. b./v.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>T. b./c.</i>	0	0	10	0	1	0	0	11
	<i>T. v./c.</i>	0	2	7	0	0	1	0	10
	<i>T. b./v./c.</i>	0	0	2	0	0	0	0	2
	Negativ	0	0	7	0	0	0	0	7
	Total	1	21	63	1	1	3	0	90

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

Tab. 4.6: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von BCT und PCR bei den 35 BCT-positiven Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

		BCT					
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T. c.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	Total
PCR	<i>T. b.</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>T. v.</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>T. c.s.</i>	1	3	27	1	0	32
	<i>T. b./c.</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>T. v./c.</i>	0	2	0	0	0	2
	negativ	0	0	1	0	0	1
	Total	1	5	28	1	0	35

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

Ausgehend von Tabelle 4.5 stimmten vor der ISMM-Behandlung 58,9% (53/90) der Speziesdiagnosen vollständig überein. Bei 26,7% (24/90) gab es eine „teilweise Übereinstimmung“. Das bedeutet, dass bei Mischinfektionen eine Spezies mit beiden Methoden übereinstimmend diagnostiziert wurde, während die andere(n) Spezies mit einer der beiden Methoden nicht nachgewiesen wurde(n). Die vollständig und teilweise übereinstimmenden Diagnosen machten zusammen 85,6% aus. Bei 6,7% (6/90) der Proben gab es keine Übereinstimmung in der Speziesdiagnose. Der Anteil der falsch negativen Proben mit der PCR betrug 7,8% (7/90).

Ausgehend von Tabelle 4.6 stimmten 14 Tage nach der ISMM-Behandlung 77,1% (27/35) der Speziesdiagnosen von BCT und PCR vollständig überein, während bei 8,6% (3/35) der Proben wenigstens eine Trypanosomenspezies übereinstimmend identifiziert wurde. Bei 11,4% (4/35) der Proben wurden verschiedene Trypanosomenspezies diagnostiziert, während der Anteil der falsch negativen Proben mit der PCR 2,9% (1/35) ausmachte.

4.4 DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG DER PCR-PRODUKTE

4.4.1 Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung

Mit der DNA-Sondenhybridisierung konnten alle positiven PCR-Ergebnisse von Rindern vor der ISMM-Behandlung bestätigt werden. Das heißt, dass alle 94 Amplifikate mit *T. congolense* savannah, alle 37 Amplifikate mit *T. vivax* und alle 20 Amplifikate mit *T. brucei* mit den korrespondierenden spezifischen DNA-Sonden hybridisierten und dabei nachweisbare Signale erzeugten. Außerdem waren auch bei acht PCR-Produkten, die im Agarosegel negativ beurteilt worden waren, Hybridisierungsreaktionen nachweisbar: Bei sieben PCR-Produkten mit *T. congolense* savannah und einem PCR-Produkt mit *T. brucei*. Im Vergleich zu den Hybridisierungssignalen der PCR-positiven Proben waren die Hybridisierungssignale dieser Proben schwächer. Gegenüber dem PCR-Ergebnis alleine erhöhte sich die Anzahl der positiven Diagnosen durch die Hybridisierung der PCR-Produkte mit spezifischen DNA-Sonden um 6,8 % von 117 auf 125.

4.4.2 Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

Auch alle PCR-Produkte von erneut positiven Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung konnten mit den DNA-Sonden verifiziert werden: Alle 77 PCR-Amplifikate reagierten wiederum mit den entsprechenden spezifischen DNA-Sonden für *T. congolense* savannah (71) bzw. für *T. vivax* (6). Darüber hinaus erzeugten acht im Agarosegel negativ beurteilte PCR-Produkte Hybridisierungssignale. Sieben davon reagierten mit der *T. congolense* savannah-spezifischen Sonde und eines reagierte mit der *T. vivax*-spezifischen Sonde. Die Hybridisierungssignale dieser Proben waren im Vergleich zu denjenigen der PCR-positiven Proben wiederum schwächer. Die Anzahl der positiven Diagnosen erhöhte sich durch die DNA-Sondenhybridisierung der PCR-Produkte um 10,7 % von 75 auf 83. Aufgrund der durchweg negativen PCR-Ergebnisse beim Nachweis für *T. brucei* wurden keine Sondenhybridisierungen zum Nachweis von *T. brucei* durchgeführt.

4.4.3 Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung

Die positiven PCR-Ergebnisse von Rindern mit zusätzlicher DIM-Behandlung wurden ebenfalls mit den DNA-Sonden bestätigt: Bei allen 20 Amplifikaten mit *T. congolense* savannah, sowie dem einzigen Amplifikat mit *T. vivax* waren Hybridisierungsreaktionen mit den entsprechenden spezifischen DNA-Sonden nachweisbar.

Aufgrund der ausschließlich negativen PCR-Ergebnisse beim Nachweis für *T. brucei* wurde wiederum keine Sondenhybridisierung zum Nachweis von *T. brucei* durchgeführt.

4.5 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR MIT DER INOKULATION VON MÄUSEN

Während der ISMM-Studie wurden von jedem parasitologisch positiven Rind je 0,5 ml Blut in zwei Mäuse i.p. inokuliert (DIARRA, 2001). Gemäß der Anzahl der BCT-positiven Rinder wurden vor der ISMM-Behandlung der Rinder 90 x 2 Mäuse und zwei Wochen danach 35 x 2 Mäuse mit parasitenhaltigem Rinderblut inokuliert. Mit den fünf BCT-positiven Blutproben der zusätzlich mit DIM behandelten Rinder gelang die Infektion von Mäusen in keinem Fall. Sie werden deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Die Ergebnisse aus der Mäuseinokulation vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung wurden in den folgenden Tabellen 4.7 und 4.8 den BCT- und PCR-Ergebnissen gegenübergestellt.

Tab. 4.7: Ergebnisvergleich von Mäuseinokulation, BCT und PCR anhand der 90 parasitärischen Rinder der PCR-Probenauswahl vor der ISMM-Behandlung; absolute Zahlen und Prozentwerte

<i>T. spp.</i>	Mäuseinokulation		BCT		PCR	
<i>T. brucei</i>	5	11,6%	1	1,1%	1	1,2%
<i>T. vivax</i>	5	11,6%	21	23,3%	17	20,5%
<i>T. congo.</i>	6	14,0%	63	70,0%	42	50,6%
<i>T. b./v.</i>	9	20,9%	1	1,1%	0	-
<i>T. b./c.</i>	11	25,6%	1	1,1%	11	13,3%
<i>T. v./c.</i>	5	11,6%	3	3,3%	10	12,0%
<i>T. b./v./c.</i>	2	4,7%	0	-	2	2,4%
Total	43	100%	90	100%	83	100%

Vor der ISMM-Prophylaxe verlief die Infektion der Mäuse bei 47,8% (43/90) der trypanosomenhaltigen Blutproben erfolgreich (Tab. 4.7). Insgesamt waren 40 der 90 BCT-positiven Blutproben mit allen drei Methoden positiv, während 3 Proben nur BCT- und Mäuseinokulation-positiv und 43 Proben nur BCT- und PCR-positiv waren. Vier Blutproben waren ausschließlich BCT-positiv.

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung gelang mit 31,4% (11/35) der BCT-positiven Blutproben die Infektion von Mäusen. (Tab. 4.8). Alle diese Blutproben waren auch bei der

PCR - also mit allen drei Methoden positiv. Ferner waren 23 dieser Blutproben BCT- und PCR-positiv; eine Blutprobe war ausschließlich BCT-positiv.

Tab. 4.8: Ergebnisvergleich von Mäuseinokulation, BCT und PCR anhand der 35 BCT-positiven Rinder der PCR-Probenauswahl vor der ISMM-Behandlung; absolute Zahlen und Prozentwerte

<i>T. spp.</i>	Mäuseinokulation		BCT		PCR	
<i>T. brucei</i>	0	-	1	2,9%	0	-
<i>T. vivax</i>	2	18,2%	5	14,3%	0	-
<i>T. congo.</i>	2	18,2%	28	80,0%	32	94,1%
<i>T. b./v.</i>	0	-	0	-	0	-
<i>T. b./c.</i>	4	36,4%	1	2,9%	0	-
<i>T. v./c.</i>	2	18,2%	0	-	2	5,9%
<i>T. b./v./c.</i>	1	9,1%	0	-	0	-
Total	11	100%	35	100%	34	100%

Der Anteil der *T. brucei*- und *T. vivax*-Infektionen war bei den Mäusen im Vergleich zur BCT und PCR wesentlich höher (Tab. 4.7 und Tab. 4.8).

Eine völlige Übereinstimmung der Speziesdiagnosen von Mäuseinokulation und BCT bzw. Mäuseinokulation und PCR kam außerdem weniger häufig vor als beim Vergleich von BCT und PCR. Die Speziesdiagnosen von BCT und Mäuseinokulation bzw. PCR und Mäuseinokulation stimmten häufiger nur in einer Spezies überein.

In den vier folgenden Tabellen (Tab. 4.9 - Tab. 4.12) wurde die Übereinstimmung der Speziesdiagnosen von Mäuseinokulation und BCT bzw. PCR vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung darstellt.

Tab. 4.9: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von BCT und Mäuseinokulation bei 43 Proben von BCT-positiven Rindern vor der ISMM-Behandlung

		BCT							
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T.c.</i>	<i>T. b./v.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	<i>T.b./v./c.</i>	Total
Maus	<i>T. b.</i>	0	0	5	0	0	0	0	5
	<i>T. v.</i>	0	5	0	0	0	0	0	5
	<i>T. c.s.</i>	0	0	6	0	0	0	0	6
	<i>T. b./v.</i>	0	4	3	0	1	1	0	9
	<i>T. b./c.</i>	1	0	9	1	0	0	0	11
	<i>T. v./c.</i>	0	2	2	0	0	1	0	5
	<i>T. b./v./c.</i>	0	0	2	0	0	0	0	2
	Total	1	11	27	1	1	2	0	43

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

Tab. 4.10: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von PCR und Mäuseinokulation bei bei 43 Proben von BCT-positiven Rindern vor der ISMM-Behandlung

		PCR								
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T.c.</i>	<i>T. b./v.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	<i>T.b./v./c.</i>	negativ	Total
Maus	<i>T. b.</i>	0	0	0	0	3	0	2	0	5
	<i>T. v.</i>	0	4	0	0	0	1	0	0	5
	<i>T. c.s.</i>	0	1	3	0	0	1	0	1	6
	<i>T. b./v.</i>	1	2	1	0	3	1	0	1	9
	<i>T. b./c.</i>	0	1	8	0	2	0	0	0	11
	<i>T. v./c.</i>	0	1	2	0	0	1	0	1	5
	<i>T. b./v./c.</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
	Total	1	9	16	0	8	4	2	3	43

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

Tab. 4.11: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von BCT und Mäuseinokulation bei 11 Proben von BCT-positiven Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

		BCT						
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T.c.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	<i>T.b./v./c.</i>	Total
	<i>T. b.</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>T. v.</i>	0	2	0	0	0	0	2
	<i>T. c.s.</i>	0	0	2	0	0	0	2
Maus	<i>T. b./c.</i>	0	0	3	1	0	0	4
	<i>T. v./c.</i>	0	0	2	0	0	0	2
	<i>T. b./v./c.</i>	1	0	0	0	0	0	1
	Total	1	2	7	1	0	0	11

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

Tab. 4.12: Übereinstimmung der Speziesdiagnostik von BCT und Mäuseinokulation bei 11 Proben von BCT-positiven Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung

		PCR						
		<i>T. b.</i>	<i>T. v.</i>	<i>T.c.</i>	<i>T. b./c.</i>	<i>T. v./c.</i>	<i>T.b./v./c.</i>	Total
	<i>T. b.</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>T. v.</i>	0	0	1	0	1	0	2
	<i>T. c.s.</i>	0	0	2	0	0	0	2
Maus	<i>T. b./c.</i>	0	0	4	0	0	0	4
	<i>T. v./c.</i>	0	0	2	0	0	0	2
	<i>T. b./v./c.</i>	0	0	1	0	0	0	1
	Total	0	0	10	0	1	0	11

Übereinstimmende Diagnose = dunkelgraue Felder; teilweise Übereinstimmung = hellgraue Felder

4.6 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR ANHAND WEITERER PARAMETER

4.6.1 Betrachtung der mittleren Hämatokritwerte

Eine Hämatokritmessung der Rinder wurde bei jeder der vierzehntägigen Untersuchungen während der ISMM-Studie durchgeführt.

Die mittleren Hämatokritwerte (Hkt-MW) der BCT- und PCR-positiven bzw. -negativen Rinder wurden hier zum Vergleich gegenübergestellt.

Sowohl vor der ISMM-Behandlung, als auch 14 Tage danach bzw. 14 Tage nach der zusätzlichen DIM-Behandlung lag der Hkt-MW der positiven Rinder stets unter dem Hkt-MW der negativen Rinder (Tab. 4.15). Die Unterschiede zwischen den mit der BCT und mit der PCR ermittelten Werten war auf den hohen Anteil der PCR-positiven Reagenten unter den parasitologisch negativen Rindern zurückzuführen: Der Hkt-MW der aparasitämischen, aber PCR-positiven Tiere lag stets zwischen den Werten der mit beiden Methoden positiv bzw. negativ diagnostizierten Tiere (Tab. 4.15).

Die wenigen BCT-positiven, aber negativen PCR-Reagenten hatten keinen bemerkenswerten Einfluss auf diese Ergebnisse.

Bei den Tieren mit Mischinfektionen wurde außerdem vor der ISMM-Behandlung mit beiden Methoden ein deutlich niedrigerer Hkt-MW ermittelt als bei den Tieren mit Einfachinfektionen (Abb. 4.12).

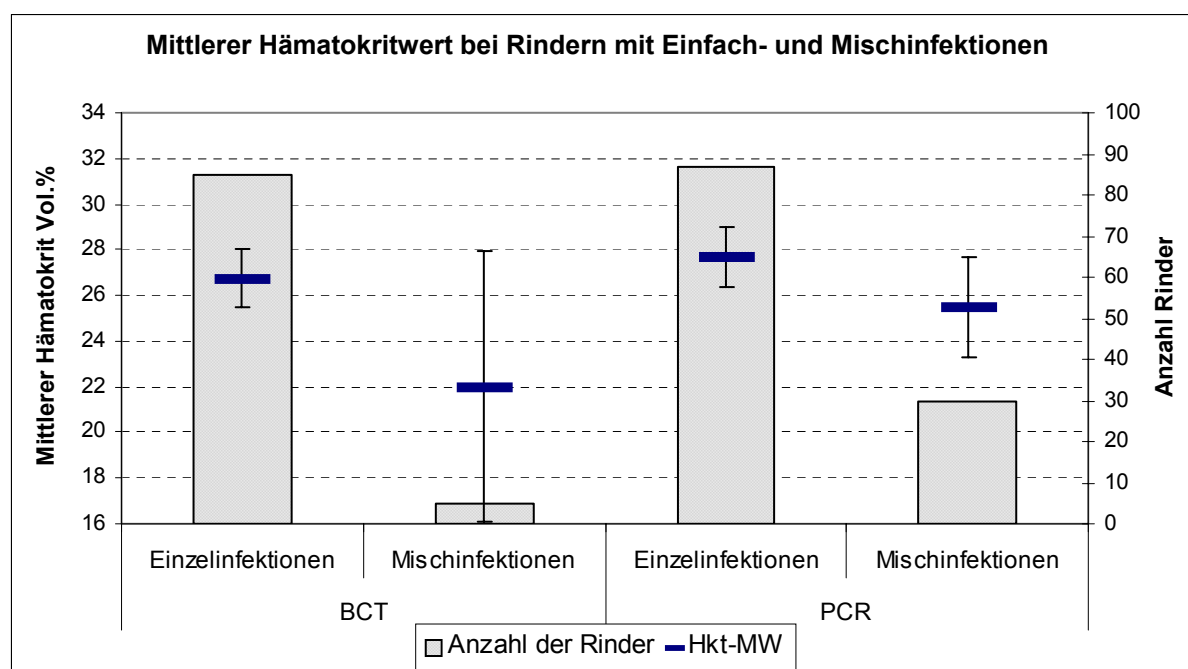


Abb. 4.12: Mittlerer Hämatokritwert mit 95%igem Konfidenzintervall bei BCT- und PCR-positiven Rindern mit Einfach- und Mischinfektionen vor der ISMM-Behandlung

Tab.4.13: Mittlerer Hämatokritwert (Hkt-MW) mit 95%igem Konfidenzintervall (KI 95%) von den BCT- und PCR- positiven und negativen Rindern (Anzahl der Rinder =n) aus dem Stichprobenumfang (N) vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung und 14 Tage nach der DIM-Behandlung

Mittlere Hämatokritwerte						
Diagnose	Vor ISMM (N=180)		14 Tage nach ISMM (N=177)		14 Tage nach DIM (N=34)	
	n	Hkt-MW (KI 95%)	n	Hkt-MW (KI 95%)	n	Hkt-MW (KI 95%)
BCT+	90	26,5 (25,3-27,7)	35	25,9 (24,4-27,4)	5	27,6 (25,5-29,7)
PCR+	117	27,2 (26,1-28,3)	75	27,2 (25,9-28,4)	21	28,8 (27,5-30,1)
BCT-	90	30,8 (29,7-32,0)	142	29,8 (28,9-30,7)	29	29,3 (27,9-30,8)
PCR-	63	31,4 (30,1-32,7)	102	30,4 (29,4-31,4)	13	29,5 (26,7-32,3)
BCT+ / PCR+	83	26,4 (25,2-27,6)	34	25,9 (24,4-27,4)	5	27,6 (25,5-29,7)
BCT- / PCR-	56	32,0 (30,7-33,2)	101	30,4 (29,4-31,5)	13	29,5 (26,7-32,3)
BCT- / PCR+	34	29,0 (26,6-31,4)	41	28,2 (26,3-30,2)	16	29,2 (27,5-30,9)
BCT+ / PCR-	7	27,1 (19,6-34,7)	1	26,0 *	**	**

* Einzelwert; **Kein Wert

Bei jeder der vierzehntägigen Untersuchungen während der ISMM-Studie wurden alle Rinder mit einem Hämatokritwert ≤ 25 Vol.% zusätzlich zur ISMM-Prophylaxe mit DIM behandelt (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Es wurde davon ausgegangen, dass ein verhältnismäßig großer Anteil der anämischen Tiere trotz der parasitologisch negativen Diagnose mit Trypanosomen infiziert sei. Das Ziel dieser Vorgehensweise war es, möglichst viele tatsächlich infizierte Rinder - also auch die im direkten Erregernachweis nicht identifizierten mit Trypanoziden zu behandeln. Gleichzeitig sollten möglichst wenige nicht infizierte Rinder Trypanozide erhalten. Anhand der nachfolgenden Tabelle 4.14 wurde dargestellt, wie hoch die Anzahl bzw. der Anteil der Rinder mit einem Hämatokritwert ≤ 25 Vol.% bzw. >25 Vol.% und ≤ 28 Vol.% bzw. >28 Vol.% bei den BCT- und PCR-positiven und -negativen Rindern der PCR-Stichprobe vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung war. Der Hämatokritwert ≤ 28 Vol.% war bereits in anderen Studien der Grenzwert für eine Behandlung (BAUER *et al.*, 1999; ICPTV, 2000) und wurde deshalb zum Vergleich in Tabelle 4.14 mit aufgenommen.

Mit der PCR wurde überprüft, ob die Berücksichtigung des Hämatokritwertes als Entscheidungskriterium für eine zusätzliche DIM-Behandlung der Rinder im Hinblick auf das oben genannte Ziel sinnvoll war.

Aus Tabelle 4.14 geht hervor, dass 14 Tage nach der ISMM-Behandlung 25 BCT-negative Rinder mit einem Hämatokritwert ≤ 25 Vol.% ermittelt wurden. Von diesen Tieren, die eine zusätzliche DIM-Behandlung erhielten, waren 11 PCR-positiv und 14 PCR-negativ - d.h. also, dass auch 14 sehr wahrscheinlich negative Tiere behandelt wurden.

Von den aparasitämischen Tieren mit einem Hämatokritwert >25 Vol.% waren dagegen 29 PCR-positiv. Diese positiven Tiere blieben unbehandelt.

Tab.4.14: Anzahl (n) bzw. prozentualer Anteil der BCT- und PCR-positiven und -negativen Rinder der PCR-Stichprobe (N) vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung mit einem Hämatokritwert ≤ 25 Vol.%, >25 Vol.%, ≤ 28 Vol.% und >28 Vol.%

Vor der ISMM-Behandlung (N=180)								
Diagnose	≤ 25 Vol. %		>25 Vol. %		≤ 28 Vol. %		>28 Vol. %	
	n	%	n	%	n	%	n	%
BCT+	43	47,8	47	52,2	62	68,9	28	31,1
BCT-	16	17,8	74	82,2	30	33,3	60	66,7
PCR+	53	45,3	64	54,7	72	61,5	45	38,5
PCR-	6	9,5	57	90,5	20	31,7	43	68,3

14 Tage nach der ISMM-Behandlung (N=177)								
Diagnose	≤ 25 Vol. %		>25 Vol. %		≤ 28 Vol. %		>28 Vol. %	
	n	%	n	%	n	%	n	%
BCT+	14	40	21	60	25	71,4	10	28,6
BCT-	25	17,6	117	82,4	54	38,0	88	62,0
PCR+	25	33,3	50	66,7	46	61,3	29	38,7
PCR-	14	13,7	88	86,3	33	32,4	69	67,6

4.6.2 Betrachtung der Rasseverteilung

Vor der ISMM-Behandlung waren 58,3% (14/24) der Baoulés, 55,0% (60/109) der Kreuzungsrinder und 34,0% (16/47) der Zebus aus der Stichprobe parasitämisch. Mit der PCR wurden bei den Baoulés 83,3% (20/24), bei den Kreuzungsrindern 70,6% (77/109) und bei den Zebus 42,6% (20/47) positive Reagenten identifiziert.

Der Anteil der PCR-positiven Diagnosen übertraf den Anteil der BCT-positiven Diagnosen somit bei den Rindern jeder Rassezugehörigkeit. Bei den Zebus wurden 8,6 % mehr positive Tiere mit der PCR diagnostiziert als mit der BCT; bei den Kreuzungsrindern waren es 15,6% und bei den Baoulés 25% (Abb. 4.13).

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung waren 26,1% (6/23) der Baoulés, 16,8% (18/107) der Kreuzungsrinder und 23,4% (11/47) der Zebus parasitologisch positiv. Die PCR ergab bei 60,9% (14/23) der Baoulés, 46,7% (50/107) der Kreuzungsrinder und 23,4% (11/47) der Zebus eine positive Diagnose.

Mit der PCR wurde also ein über doppelt so hoher Anteil an positiven Tieren unter den Kreuzungsrindern und Baoulés ermittelt als mit der BCT. Der Anteil der positiven Tiere unter den Zebus war hingegen bei beiden Methoden gleich. Die BCT-negativen Rinder mit einem positiven PCR-Ergebnis kamen bei den Baoulés auf 34,5% (8/23) und machten bei den Kreuzungsrindern 29,9% (32/107) aus (Abb. 4.13).

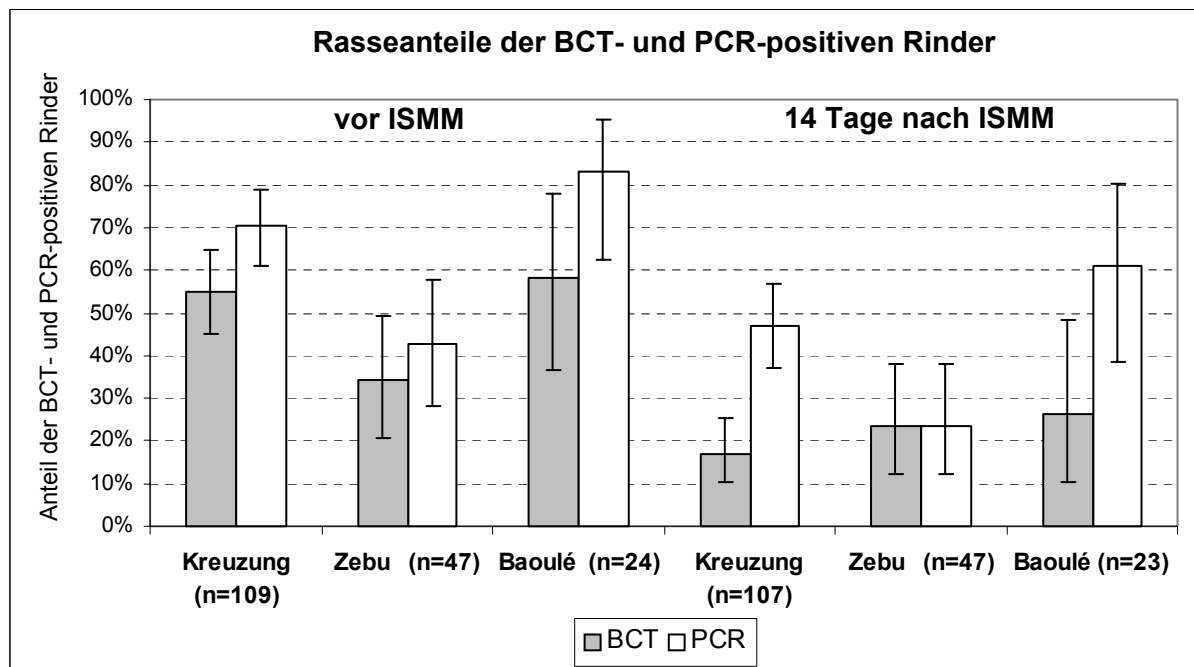


Abb. 4.13: Rasseanteile der BCT- und PCR-positiven Rinder vor und 14 Tage nach der ISMM-Behandlung mit 95%igem Konfidenzintervall

4.6.3 Betrachtung der Altersgruppen

Vor der ISMM-Behandlung waren 47,9% (35/73) der Kälber und Jungtiere sowie 51,4% (55/107) der adulten Rinder der Stichprobe (Kap. 3.5) BCT-positiv. Bei der PCR reagierten 60,3% (44/73) der Kälber und Jungtiere und 68,2% (73/107) der adulten Rinder positiv (Abb. 4.14).

Damit wurden mit der PCR 12,4% mehr positive Tiere unter den Kälbern und Jungtieren bzw. 16,8% mehr positive Tiere unter den Adulten diagnostiziert als mit der BCT.

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung war der Anteil der parasitologisch positiven Tiere bei den Kälbern und Jungtieren auf 18,1% (13/72) und bei den erwachsenen Rindern auf 21,0% (22/105) gesunken. Der Anteil der PCR-positiven Reagenten unter den Kälbern und Jungtieren bzw. unter den adulten Rindern hatte sich auf 33,3% (24/72) bzw. 48,8% (51/105) verringert.

Die Differenz zwischen den BCT- und PCR-positiven Diagnosen war im Vergleich zu vor der ISMM-Behandlung bei beiden Altersgruppen größer, wobei der Unterschied bei den adulten Tieren mehr ins Auge fiel. Der Anteil PCR-positiver Diagnosen lag bei den Kälbern und Jungtieren um 15,2% und bei den Adulten um 27,8% höher als bei der BCT (Abb. 4.14).

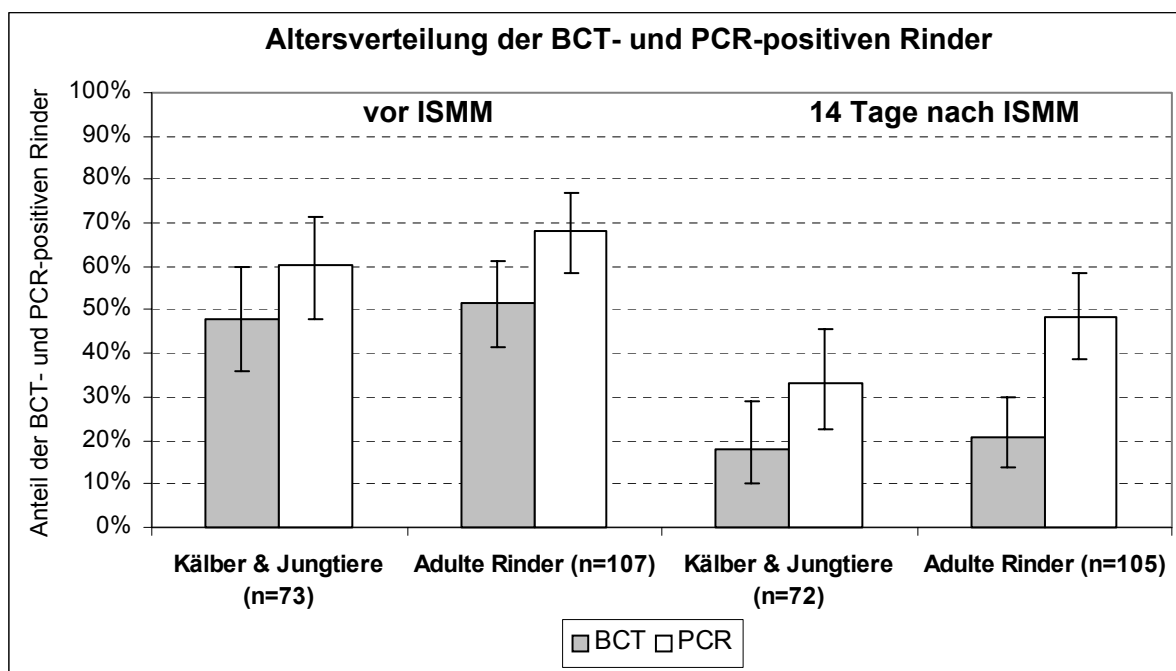


Abb. 4.14: Altersverteilung der BCT- und PCR-positiven Rinder vor und 14 Tage nach der ISMM-Behandlung mit 95%igem Konfidenzintervall

4.6.4 Betrachtung der Geschlechtsverteilung

Vor der ISMM-Behandlung waren 46% (46/100) der weiblichen und 55% (44/80) der männlichen Tiere aus der Stichprobe (Kap. 3.5) parasitologisch positiv. Mit der PCR wurden 62% (62/100) positive Reagenten unter den Kühen und 69% (55/80) positive Reagenten unter den Bullen ermittelt. Im Vergleich zur BCT wurden mit der PCR 14% mehr positive unter den männlichen Tieren und 16% mehr positive unter den weiblichen Tieren festgestellt (Abb. 4.15).

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung waren noch 15,2% (15/99) der Kühe und 25,6% (20/78) der Bullen parasitologisch positiv. Mit der PCR reagierten 40,4% (40/99) der weiblichen und 44,9% (35/78) der männlichen Tiere positiv. Im Vergleich zur BCT wurden mittels PCR 25,2% mehr positive weibliche und 19,3% mehr positive männliche Tiere diagnostiziert. Der Anteil der BCT-negativen weiblichen Tiere mit einem positiven PCR-Ergebnis (61,0%) war dabei bedeutend größer, als der Anteil der BCT-negativen männlichen Tiere mit einem positiven PCR-Ergebnis (39,0%) (Abb. 4.15).

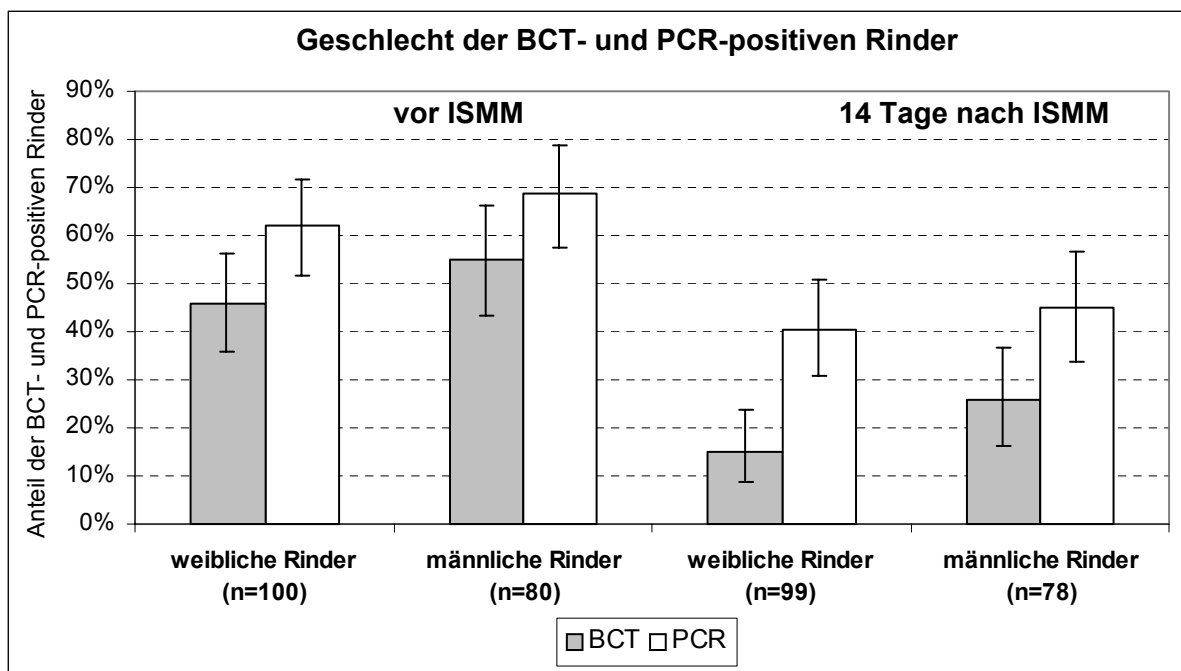


Abb. 4.15: Geschlecht der BCT- und PCR-positiven Rinder vor und 14 Tage nach der ISMM-Behandlung mit 95%igem Konfidenzintervall

4.7 ERGEBNISSE DER MULTIPLEX-PCR UND DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG

Im Hinblick auf eine mögliche Kostenreduzierung der PCR wurde eine Auswahl von Proben, die mit der Simplex-PCR als Einfach- bzw. Mischinfektionen identifiziert worden waren, erneut mit der Multiplex-PCR (mit drei Primerpaaren pro Reaktionsansatz), analysiert.

4.7.1 Proben mit Einfachinfektionen

Die Multiplex-PCR mit Einfachinfektionen wurde zum Sensitivitätsvergleich mit der Simplex-PCR durchgeführt. Als Einfachinfektionen wurden hier Proben definiert, die bei einem der Simplex-PCR-Läufe positiv reagiert hatten. Von diesen Proben wurden 53, worunter sich die beiden (einzigen) Einfachinfektionen mit *T. brucei*, 18 Einfachinfektionen mit *T. vivax* und 33 Einfachinfektionen mit *T. congolense* savannah befanden, erneut mit der Multiplex-PCR analysiert (Kap. 3.5.2).

Die Ergebnisse der Simplex- und Multiplex-PCR stimmten bei allen untersuchten Proben überein. Im Unterschied zur Simplex-PCR entstand bei der Multiplex-PCR aber mehrfach ein unspezifisches ca. 200 bp großes Produkt, das besonders mit den negativen Kontrollproben mit Rinder-DNA deutliche Banden bei der Elektrophorese ausprägte (Abb. 4.2 und Abb. 4.16). Dasselbe Produkt wurde auch - etwas schwächer ausgeprägt - bei einigen Feldproben und positiven Kontrollproben festgestellt (Abb. 4.16).

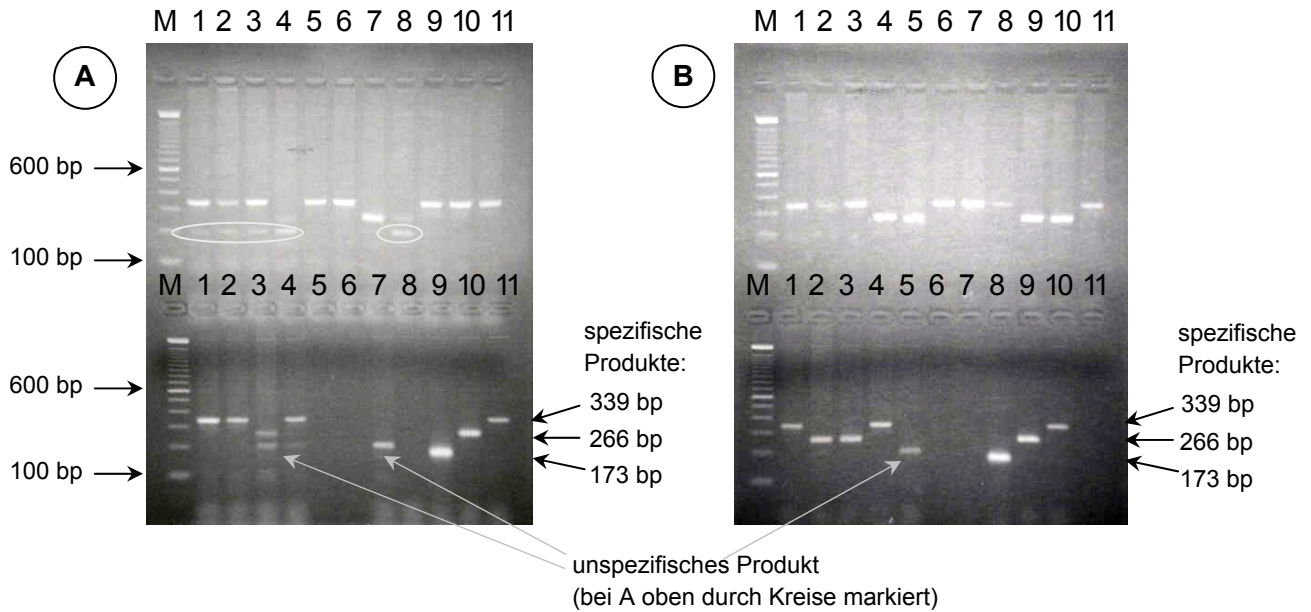


Abb. 4.16: Multiplex-PCR von Proben mit Einfachinfektionen

Position der Proben bei A oben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. c.s.*, Bahn 3 = *T. c.s.*, Bahn 4 = *T. vivax*, Bahn 5 = *T. c.s.*, Bahn 6 = *T. c.s.*, Bahn 7 = *T. vivax*, Bahn 8 = *T. vivax*, Bahn 9 = *T. c.s.*, Bahn 10 = *T. c.s.*, Bahn 11 = *T. c.s.*

Position der Proben bei A unten: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. c.s.*, Bahn 3 = *T. vivax*, Bahn 4 = *T. c.s.*, Bahn 5 = leer, Bahn 6 = leer, Bahn 7 = negatives Rind, Bahn 8 = DNase- und Rnase freies Wasser, Bahn 9 = *T. brucei* (100 pg DNA), Bahn 10 = *T. vivax* (100 pg DNA), Bahn 11 = *T. c.s.* (100 pg DNA)

Position der Proben bei B oben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. c.s.*, Bahn 3 = *T. c.s.*, Bahn 4 = *T. vivax*, Bahn 5 = *T. vivax*, Bahn 6 = *T. c.s.*, Bahn 7 = *T. c.s.*, Bahn 8 = *T. c.s.*, Bahn 9 = *T. vivax*, Bahn 10 = *T. vivax*, Bahn 11 = *T. c.s.*

Position der Proben bei B unten: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. vivax*, Bahn 3 = *T. vivax*, Bahn 4 = *T. c.s.*, Bahn 5 = negatives Rind, Bahn 6 = leer, Bahn 7 = DNase- und Rnase freies Wasser, Bahn 8 = *T. brucei* (100 pg DNA), Bahn 9 = *T. vivax* (100 pg DNA), Bahn 10 = *T. c.s.* (100 pg DNA), Bahn 11 = leer

4.7.2 DNA-Sondenhybridisierung der PCR-Produkte

Alle Multiplex-PCR-Produkte der Proben mit Einfachinfektionen wurden auf eine Nylonmembran geblottet, die nacheinander mit den spezifischen DNA-Sonden für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* hybridisiert wurde.

Jedes Amplifikat erzeugte ein sichtbares Hybridisierungssignal. Die Hybridisierungssignale von Amplifikaten, die nur schwache Elektrophoresebanden ausgeprägt hatten, waren dabei auch schwächer als die Signale von Amplifikaten mit kräftigen Elektrophoresebanden (Abb. 4.17).

Die unspezifischen DNA-Produkte, welche eine Elektrophoresebande auf der Höhe von ca. 200 bp ausgeprägt hatten, zeigten keinerlei Hybridisierungsreaktionen (Abb. 4.17).

Rd	Tc	Tc	Tc	H₂O
Tv	Tc	Tc	Tv	Tv
Tc	Rd	Tc	H₂O	Tc
Tc	Tc	Tv	Tc	Tb
Tv	Tc	Tc	Tc	Tc
Tv	Tv	Tc	Tc	Tc
Tv	Tv	Tc	Tc	Tv
Tv	H₂O	Tc	Rd	Tb
Tv	Tc	Tc	Tc	Tc
Tv	Tc	Tc	Tv	Tv
Tc	Tc	Tc	Tv	Tv
Tc	Tc	Tb	Tv	Tc

Abb. 4.17: DNA-Sondenhybridisierungen von Amplifikaten der Multiplex-PCR mit Einfachinfektionen gemäß Simplex-PCR-Ergebnis. Die Nylonmembran wurde nacheinander mit den spezifischen Sonden für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* analysiert.

Die nebenstehende Tabelle gibt die Probenpositionen bei den unten abgebildeten Hybridisierungen wieder. Die fettgedruckten Proben sind Kontrollproben.

Abkürzungen:

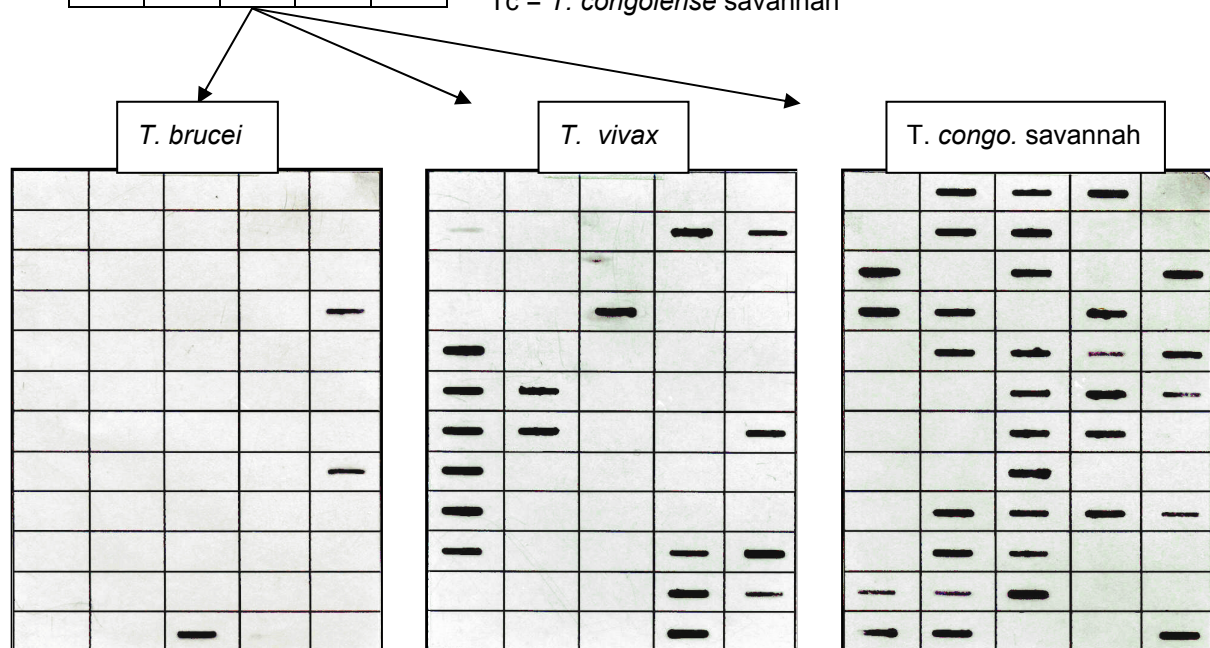
Rd = negative Kontrollprobe mit Rinder-DNA

H₂O = DNase- und RNase freies Wasser

Tb = *T. brucei*

Tv = *T. vivax*

Tc = *T. congolense savannah*



4.7.3 Proben mit Mischinfektionen

Alle Proben mit Mischinfektionen, d. h. Proben, die bei zwei oder allen drei Simplex-PCR-Läufen positiv reagiert hatten, wurden ebenfalls erneut mit der Multiplex-PCR analysiert. Damit sollte die Möglichkeit zur Darstellung von Mischinfektionen mit unbekanntem Parasitenkonzentrationen (Feldproben) in einem PCR-Lauf beurteilt werden.

Unter den 32 Proben mit Mischinfektionen befanden sich jeweils 14 Proben mit einer Kombination von *T. brucei* und *T. congolense savannah* bzw. *T. vivax* und *T. congolense savannah* sowie vier Proben mit Dreifachinfektionen (Tab. 4.15). *T. congolense savannah* war somit in jeder Probe enthalten, während *T. brucei* und *T. vivax* in je 56,2% der Proben enthalten waren (Tab. 4.15).

Mit der Multiplex-PCR reagierten alle Proben positiv, wobei bei 53,1% der Proben mindestens zwei Amplifikationsprodukte nachweisbar waren. Bei 46,9% der Proben wurde jedoch nur ein Amplifikationsprodukt gebildet (Tab. 4.15).

Bei fast allen Negativkontrollen mit Rinder-DNA und bei einigen der Testproben entstand wiederum ein unspezifisches Produkt auf dem Niveau von etwa 200 bp mit der Multiplex-PCR, welches deutlich sichtbar nur wenig über dem spezifischen Produkt von *T. brucei* lag (Abb. 4.18).

Tab. 4.15: Simplex- und Multiplex-PCR-Ergebnisse der 32 untersuchten Mischinfektionen

Trypanosomen spp.	Simplex-PCR	Multiplex-PCR
<i>T. brucei</i> / <i>T. vivax</i>	0	0
<i>T. brucei</i> / <i>T. congolense savannah</i>	14	12 + 2 *
<i>T. vivax</i> / <i>T. congolense savannah</i>	14	2
<i>T. brucei</i> / <i>T. vivax</i> / <i>T. congolense s.</i>	4	1
<i>T. brucei</i>	0	3
<i>T. vivax</i>	0	1
<i>T. congolense savannah</i>	0	11
Summe	32	32

* Zwei der Dreifachinfektionen (Simplex-PCR) wurden mit der Multiplex-PCR als Mischinfektionen mit *T. brucei* und *T. congolense savannah* identifiziert

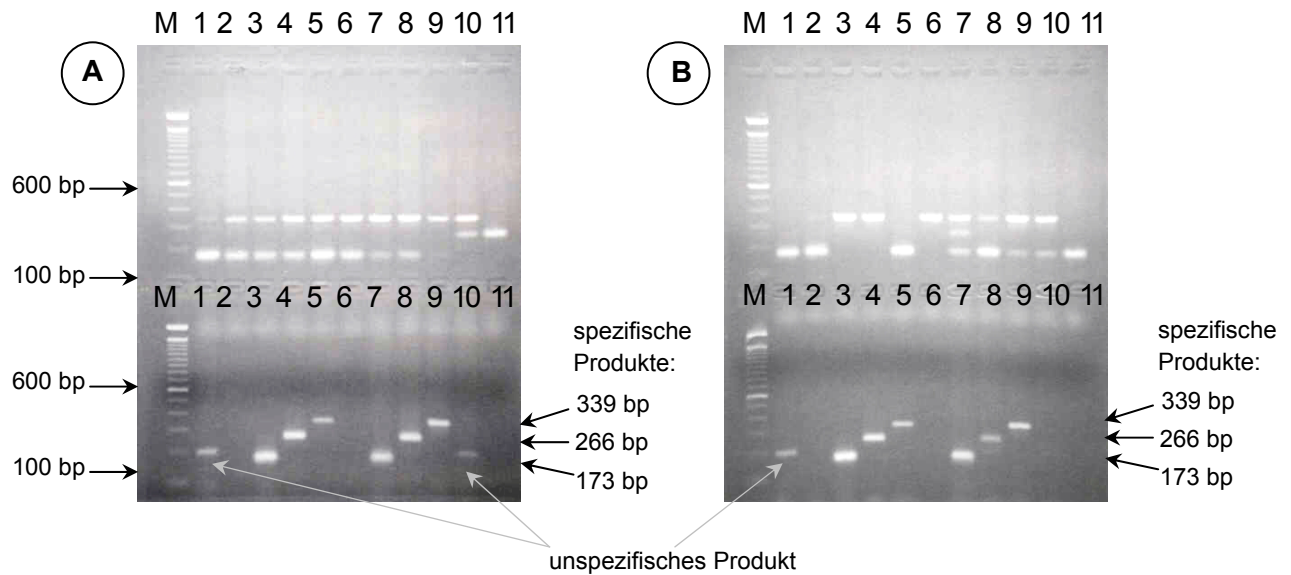


Abb. 4.18: Multiplex-PCR von Proben mit Mischinfektionen (oben) und Einfachinfektionen (unten)

Position der Proben bei A oben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 3 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 4 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 5 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 6 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 7 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 8 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 9 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 10 = *T. v.* / *T. c.s.*, Bahn 11 = *T. v.* / *T. c.s.*

Position der Proben bei A unten: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = negatives Rind, Bahn 2 = DNase- und Rnase freies Wasser, Bahn 3 = *T. brucei* (100 pg DNA), Bahn 4 = *T. vivax* (100 pg DNA), Bahn 5 = *T. c.s.* (100 pg DNA), Bahn 6 = leer, Bahn 7 = *T. brucei* (Einfachinf.), Bahn 8 = *T. vivax* (Einfachinf.), Bahn 9 = *T. c.s.* (Einfachinf.), Bahn 10 = negatives Rind (Feldprobe), Bahn 11 = leer

Position der Proben bei B oben: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 2 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 3 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 4 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 5 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 6 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 7 = *T. b.* / *T. v.* / *T. c.s.*, Bahn 8 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 9 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 10 = *T. b.* / *T. c.s.*, Bahn 11 = *T. v.* / *T. c.s.*

Position der Proben bei B unten: Bahn M = 100 bp-DNA-Leiter, Bahn 1 = negatives Rind, Bahn 2 = DNase- und Rnase freies Wasser, Bahn 3 = *T. brucei* (100 pg DNA), Bahn 4 = *T. vivax* (100 pg DNA), Bahn 5 = *T. c.s.* (100 pg DNA), Bahn 6 = leer, Bahn 7 = *T. brucei* (Einfachinf.), Bahn 8 = *T. vivax* (Einfachinf.), Bahn 9 = *T. c.s.* (Einfachinf.), Bahn 10 = negatives Rind (Feldprobe), Bahn 11 = leer

4.7.4 DNA-Sondenhybridisierung der PCR-Produkte

Alle PCR-Produkte aus den Multiplex-PCR-Läufen mit Mischinfektionen wurden auf eine Nylonmembran geblottet und nacheinander mit den drei spezifischen Sonden für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* analysiert. Jedes bei der Elektrophorese nachgewiesene spezifische DNA-Produkt erzeugte auch ein Hybridisierungssignal, wobei die Amplifikate, die nur schwache Elektrophorese-Banden ausgeprägt hatten, auch nur schwache Hybridisierungssignale erzeugten (Abb. 4.19). Das unspezifische Produkt auf Höhe von ca. 200 bp bildete bei der Hybridisierung keinerlei sichtbare Reaktion (Abb. 4.19)

Rd	Tbc	Tvc	Tvc	H₂O
Tvc	Tvc	Tvc	Tvc	Tvc
Tbc	Rd	Tvc	H₂O	Tvc
Tb	Tv	Tc	Tb	Tv
Tc	Rd	Tbvc	Tbc	Tvc
Tvc	Tbc	Rd	Tvc	Tbvc
Tbc	Tbc	Tbc	Tbc	Tb
Tv	H₂O	Tc	Rd	Rd
Tbc	Tbvc	Tbc	Tbc	Tbc
Tbc	Tbvc	Tbc	Tc	Tvc
Tvc	Tb	Tv	Tc	Rd
H₂O	Tb	Tv	Tc	Rd

Abb. 4.19: DNA-Sondenhybridisierungen von PCR-Produkten der Multiplex-PCR mit Einfach- und Mischinfektionen gemäß Simplex-PCR-Ergebnis.

Die nebenstehende Tabelle gibt die Probenpositionen bei den unten abgebildeten Hybridisierungen wieder. Die fettgedruckten Proben sind Kontrollproben.

Abkürzungen:

Rd = negative Kontrollprobe mit Rinder-DNA

H₂O = DNase- und RNase freies Wasser

Tb = *T. brucei*

Tv = *T. vivax*

Tc = *T. congolense savannah*

→ bei den Mischinfektionen wurden die Abkürzungen kombiniert

