

## 6 ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY - RESUME

Die durch Tsetsefliegen übertragene Trypanosomose der Nutztiere (Nagana) verursacht in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara erhebliche ökonomische Verluste. Bei der Bekämpfung dieser Tierseuche steht der Einsatz von Trypanoziden im Vordergrund. Aufgrund ihres nunmehr über 40-jährigen Einsatzes haben sich Resistenzen gegenüber den beiden bedeutendsten Wirkstoffen Isometamidiumchlorid (ISMM) und Diminazenazeturat (DIM) gebildet. Vorkommen und Verbreitung von resistenten Trypanosomenpopulationen wurden in Rinderherden in der Provinz Kénédougou im Südwesten von Burkina Faso (Westafrika) mittels parasitologischer Methoden im Rahmen eines durch das BMZ geförderten Projektes (1998 – 1999) bestimmt.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Eignung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Überprüfung der prophylaktischen Wirkung von ISMM und des therapeutischen Erfolgs von DIM zu testen.

Die mit der PCR analysierten Blutproben stammten von Rindern, die im Rahmen der Blockbehandlungsstudie des BMZ-Projektes untersucht wurden. Eine Gesamtpopulation von 738 Rindern aus 10 Dörfern mit einer erhöhten Trypanosomenprävalenz von über 10% wurde zu Beginn der Studie mit ISMM (1 mg/kg KGW) behandelt. Erneut parasitologisch positive Rinder wurden bei den 14-tägig stattfindenden Nachuntersuchungen zusätzlich mit DIM (3,5 mg/kg KGW) behandelt.

Vor der ISMM-Behandlung wurden parasitologisch mit der sogenannten „Buffy Coat Technik“ (BCT) bei 90 der 738 untersuchten Rinder (12,2%) Trypanosomen diagnostiziert. Mit der PCR wurden Blutproben der 90 BCT-positiven Rinder und dieselbe Anzahl Blutproben BCT-negativer Rinder, welche zufällig aus den 648 Blutproben BCT-negativer Rinder ausgewählt wurden, untersucht. Mit den Primerpaaren für *Trypanosoma brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* wurden in drei Simplex-PCR-Läufen insgesamt 92,2% (83) der 90 parasitologisch positiven Rinder bestätigt. Von den 90 parasitologisch negativen Rindern reagierten 37,8% (34) positiv.

Vierzehn Tage nach der ISMM-Applikation wurde der prophylaktische Erfolg mit beiden Methoden überprüft. Dabei wurden wiederum Trypanosomeninfektionen diagnostiziert. Von den parasitologisch positiven Rindern reagierten 97,1% (34/35) und von den parasitologisch negativen Rindern reagierten 28,8% (41/142) PCR-positiv. Auch 14 Tage nach einer zusätzlichen DIM-Therapie von 34 Rindern, die nach der ISMM-Prophylaxe parasitämisch waren, wurden mit beiden Methoden Trypanosomeninfektionen festgestellt. Dabei waren alle parasitologisch positiven Rinder (5) sowie 55,2% (16) der parasitologisch negativen Rinder PCR-positiv.

Während vor der ISMM- Prophylaxe ca. 30% mehr positive Rinder mit der PCR im Vergleich zur BCT nachgewiesen wurden, waren es nach der ISMM-Prophylaxe 114% bzw. nach der

zusätzlichen DIM-Therapie 320%. Die Zunahme der diagnostischen Differenz zwischen den beiden Methoden ist sehr wahrscheinlich auf ein häufigeres Unterschreiten der parasitologischen Nachweisgrenze nach den Trypanozidbehandlungen zurückzuführen. Die Abtötung der sensiblen Trypanosomenpopulationen führte zu allgemein niedrigeren Parasitämien, wenngleich resistente Populationen überlebten.

Auf der Ebene der beteiligten Dörfer hatte dieser Unterschied zur Folge, dass mit der BCT im Gegensatz zur PCR das Auftreten trypanozidresistenter Infektionen mancherorts nicht erkannt wurde.

Die mit beiden Methoden am häufigsten diagnostizierte Trypanosomenspezies war *T. congolense* gefolgt von *T. vivax* und *T. brucei*. Vor der ISMM- Prophylaxe wurden mit der PCR im Vergleich zur BCT insbesondere mehr Infektionen mit *T. brucei* und mehr Mischinfektionen identifiziert, die zumeist in Verbindung auftraten. Nach der ISMM- Prophylaxe wurden wiederum alle Spezies parasitologisch diagnostiziert, während mit der PCR nur noch *T. congolense* savannah und *T. vivax* nachweisbar waren. Die beiden Spezies waren mit der PCR auch noch nach der DIM-Therapie nachweisbar, wogegen parasitologisch nur noch *T. congolense* identifiziert wurde.

Die Identität der PCR-Amplifikate wurde mit spezifischen DNA-Sonden verifiziert. Von den bei der Elektrophorese negativ beurteilten PCR-Ansätzen erzeugten außerdem bis zu 10,7% Hybridisierungssignale, wodurch die Sensitivität der PCR noch gesteigert wurde.

Zur Vereinfachung und Kostenreduzierung der Methode wurde eine Multiplex-PCR mit den drei verwendeten Primerpaaren getestet. Eine wiederholte Analyse von Proben mit Einfachinfektionen erbrachte dieselben Ergebnisse wie mit der Simplex-PCR. Proben mit Mischinfektionen wurden hingegen nur etwa zur Hälfte als solche identifiziert, während bei den übrigen Proben Einfachinfektionen nachgewiesen wurden. Bei manchen Proben entstand ein unspezifisches DNA-Produkt.

Für einen Einsatz bei Feldstudien müsste die Multiplex-PCR optimiert werden, um die kompetitive Hemmung der Primerpaare bei Mischinfektionen zu minimieren und die Entstehung unspezifischer Produkte zu vermeiden.

Die Simplex-PCR wird aufgrund der Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit als geeignete Methode zur Überprüfung des Behandlungserfolges von *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen bei Rindern unter Feldbedingungen beurteilt. In Verbindung mit der DNA-Sondenhybridisierung konnte damit die Existenz von Isometamidium- und Diminazen-resistenten *T. congolense*- und *T. vivax*-Populationen bei Rindern in der Provinz Kéné Dougou in Burkina Faso bestätigt werden. Bei *T. brucei*- Infektionen ist die Eignung der Methode aufgrund der Tendenz dieser Spezies, in das ZNS auszuwandern und sich somit der Trypanozidwirkung und dem Nachweis im Blut zu entziehen, eingeschränkt.

**PCR and DNA probe hybridization to monitor the efficacy of drug treatment in cattle naturally infected with *Trypanosoma* spp. in the province of Kéné Dougou in Burkina Faso, West Africa.**

The Tsetse transmitted African animal trypanosomosis (Nagana) causes considerable economic losses in sub-Saharan Africa. The use of trypanocidal drugs is the most widely accepted means of controlling the disease. Since they have been on the market for more than 40 years, resistance has developed against the two most important compounds isometamidium chloride (ISMM) and diminazene aceturate (DIM). Under a BMZ-funded project (1998 - 1999), the occurrence and distribution of drug resistant trypanosome populations in cattle were investigated with parasitological methods in the province of Kéné Dougou in southwest Burkina Faso.

The objective of the present study was to assess the polymerase chain reaction (PCR) as a tool to monitor the efficacy of prophylactic treatment with ISMM and curative treatment with DIM.

The PCR blood samples originated from cattle, which were examined during the block treatment study of the BMZ-project. The study involved 10 villages with a high trypanosomosis prevalence (>10%) where a total of 738 cattle were treated with ISMM (1mg/kg b.w.). Cattle, parasitaemic during one of the fortnightly follow-up visits, were treated additionally with DIM (3.5 mg/kg b.w.).

Before the ISMM treatment was administered, trypanosomes were diagnosed parasitologically with the so-called "buffy coat technique" in 90 out of 738 cattle (12%). Blood samples from the 90 BCT-positive cattle plus another 90 randomly selected blood samples from 648 blood samples of BCT-negative cattle were analysed with the PCR using primers for *Trypanosoma brucei*, *T. vivax* and *T. congolense* savannah. Out of the BCT positive blood samples, 92.2% (83) were identified with the PCR. Out of the 90 BCT-negative samples 37.8% (34) were PCR positive.

The efficacy of a prophylactic treatment was assessed a fortnight after the administration of ISMM. Trypanosomes were again detected using either method. Parasitaemia, based on BCT, occurred in 19.8% of the cattle. The detection rate of BCT-positives with the PCR reached 97.1% (34/35) with the post-treatment samples. Furthermore, 28.8% (41/142) of the BCT-negative samples were positive according to the PCR. A fortnight after an additional curative DIM treatment of 34 cattle, which had been parasitologically positive after the prophylactic treatment with ISMM, again trypanosome infections were diagnosed using either method. All BCT-positive cases (5) were confirmed by the PCR. Another 55.2% (16) positive cases were identified using the PCR.

Whereas about 30% more positive cases were identified with the PCR compared to the BCT before the prophylactic treatment with ISMM, 114% more positive cases were detected after

the ISMM-prophylaxis and 320% after the DIM-therapy, respectively. The increasing discrepancy in the number of positives with either method is almost certainly due to a larger number of cattle with a lower parasitaemia beyond the detection limit of the BCT after trypanocide treatment. The elimination of the sensible trypanosome populations led to generally lower parasitaemias, although resistant populations survived.

In consequence, treatment failure remained parasitologically undetected in a number of villages when compared with the PCR.

*T. congolense* was the most frequently diagnosed species with either method followed by *T. vivax* and *T. brucei*. Before the prophylactic treatment, particularly mixed infections and infections with *T. brucei*, which were mostly associated with the former, were identified more frequently by PCR than by BCT. After the ISMM-prophylaxis, all previously identified trypanosome species were detected again with the BCT, whereas only *T. congolense* savannah and *T. vivax* were detected with the PCR. Both of the latest were identified again with the PCR after the curative treatment with DIM, whereas the only parasitologically identified species was *T. congolense*.

The PCR results were confirmed by specific DNA probes. Moreover, up to 10.7% signals appeared with electrophoresis-negative PCR samples, leading to a further increase in the PCR sensitivity.

In order to facilitate the procedure and reduce costs, a multiplex PCR was tested with the three primer pairs. When samples with single infections were analysed, the multiplex PCR results were exactly the same as the simplex PCR results. However, out of samples with mixed infections only 53% were identified as such, whereas the other samples were diagnosed as single infections. In some cases an unspecific product appeared.

For use in field studies, the multiplex PCR should be optimised in order to minimize the competitive inhibition among the primer pairs and to avoid the amplification of unspecific products.

The above mentioned results demonstrate that the simplex PCR seems to be ideally suited to monitor the success of drug treatment in trypanosome-infected cattle in the field. In combination with the results of the DNA probes, the existence of isometamidium- and diminazene-resistant trypanosome populations in cattle in the province Kéné Dougou in Burkina Faso could be confirmed. Since *T. brucei* might invade the central nervous system where it is inaccessible to the drugs, the test may be curtailed for this species.

**Détermination de l'efficacité des traitements trypanocides chez des bovins infectés par la trypanosomose animale africaine dans la province du Kéné Dougou au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest, par la PCR et l'hybridation de l'ADN.**

La trypanosomose animale africaine (TAA), transmise par des mouches tsé-tsé, cause des pertes économiques considérables en Afrique subsaharienne. La lutte contre la TAA repose encore, chez les animaux domestiques, en grande partie sur l'utilisation des trypanocides. Comme ces produits sont déjà utilisés depuis plus de 40 ans, des chimiorésistances contre les substances les plus importantes, le chlorure d'isometamidium (ISMM) et l'acéturate de diminazène (DIM), se sont développées. Un projet financé par la BMZ et conduit en 1998 et 1999 a permis d'étudier par des méthodes parasitologiques la prévalence et le niveau de chimiorésistance des populations de trypanosomes infestant les bovins de la province du Kéné Dougou, au sud-ouest du Burkina Faso.

Le premier objectif de cette thèse était de tester la possibilité d'utiliser la réaction en chaîne de polymérase (PCR) pour estimer le succès du traitement prophylactique avec l'ISMM et du traitement thérapeutique avec le DIM.

Les échantillons du sang analysés avec la PCR provenaient des bovins examinés dans le cadre du projet de la BMZ, pendant le traitement en bloc. Cette étude, portant sur 738 têtes de bétail, a été conduite dans 10 villages où la prévalence de la TAA était élevée (>10%). Les animaux ont d'abord subi un traitement avec l'ISMM (1 mg/kg poids vif), puis ceux qui restaient parasitémiqes après le traitement avec l'ISMM furent traités de nouveau avec le DIM (3,5 mg/kg poids vif).

Avant le traitement avec l'ISMM, une recherche de trypanosomes a été effectuée par la technique du «buffy coat» (BC) : 90 des 738 bovins examinés étaient positifs (12,2%). Tous les échantillons trouvés positifs au cours de cet examen initial ainsi que 90 des 648 prélèvements négatifs, sélectionnés de façon aléatoire, ont été analysés par PCR. Avec les amorces spécifiques des espèces *Trypanosoma brucei*, *T. vivax* et *T. congolense* type savane, 92,2% (83) des 90 échantillons trouvés positifs en BC et 37,8% (34) des 90 des échantillons négatifs en BC se sont révélés positifs.

L'efficacité du traitement prophylactique des bovins avec l'isometamidium (ISMM : 1 mg/kg poids vif) a été contrôlé 14 jours après l'application du médicament. Des infections trypanosomiennes ont encore été identifiées avec les deux méthodes. Avec la PCR, 97,1% (34/35) des animaux positifs en BC et 28,8% (41/142) des animaux négatifs en BC ont été trouvés positifs. De même, 14 jours après le traitement thérapeutique avec le diminazène (DIM : 3,5 mg/kg poids vif) des 34 bovins qui étaient toujours parasitémiqes (en BC) après la prophylaxie avec l'ISMM, des trypanosomes ont été détectés par les deux méthodes. Tous ceux qui étaient positifs en BC (5) et 55,2% (16) des négatifs en BC ont été trouvés positifs avec la PCR.

Alors qu'il y avait environ 30% d'animaux positifs en plus avec la PCR qu'avec le BC avant le traitement avec l'ISMM, il y en avait 114% après ce traitement et 320% après le traitement avec le DIM. L'augmentation de la différence de sensibilité entre les deux méthodes est très probablement due à l'accroissement du nombre de parasitémiées inférieures à la limite de détection de la technique BC. L'élimination des populations trypanosomiennes sensibles par les traitements explique les parasitémiées généralement plus faibles, et ce malgré la persistance des populations trypanosomiennes résistantes.

Par conséquent, dans plusieurs cas l'existence d'infections trypanosomiennes résistantes n'a pas été identifiée par le BC au niveau des villages.

L'espèce la plus souvent diagnostiquée par les deux méthodes était *T. congolense* suivie par *T. vivax* et *T. brucei*. Avant la prophylaxie avec l'ISMM, la PCR a mis en évidence plus d'infections avec *T. brucei* et plus d'infections mixtes, comprenant du reste généralement *T. brucei*, que le BC. Après ce traitement, les trois espèces étaient de nouveau identifiées parasitologiquement alors que la PCR ne mettait en évidence que *T. vivax* et *T. congolense* type savane. Ces deux espèces étaient encore identifiées par PCR après le traitement avec le DIM, tandis que seul *T. congolense* était identifié parasitologiquement.

L'identité des produits de PCR a été vérifiée avec des sondes spécifiques de l'ADN. De plus, 10,7% des produits de PCR, négatifs selon l'électrophorèse, ont donné des signaux positifs après hybridation qui a donc encore augmenté la sensibilité de la PCR.

Afin de simplifier et de réduire le coût de la méthode, une PCR-multiplex a été testée en utilisant les trois paires d'amorces. Pour des échantillons porteurs d'infections simples, les résultats étaient identiques à ceux de la PCR classique. Par contre, seules environ la moitié des infections mixtes ont été identifiées avec la PCR-multiplex, tandis que le reste des échantillons était reconnu comme infections simples. Parfois un produit non spécifique a été amplifié.

En vue d'une possible utilisation dans des études de terrain, il serait nécessaire d'améliorer la méthode pour diminuer l'inhibition comparative entre les amorces et éviter l'amplification des produits non spécifiques.

D'après les résultats de cette thèse, la PCR apparaît comme une méthode idéale pour l'estimation du succès des traitements chez des bovins infectés avec *T. congolense* et *T. vivax*. En combinaison avec l'hybridation de l'ADN, elle a bien confirmé l'existence d'une résistance parmi des souches de *T. congolense* et de *T. vivax* chez des bovins dans la province du Kéné Dougou au Burkina Faso. La méthode est moins efficace lors d'infections avec *T. brucei* sans doute à cause de la tendance de cette espèce d'envahir le système nerveux central et ainsi d'échapper à l'effet des trypanocides et au diagnostic dans le sang.