

Aus dem
Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Medikamentenempfindlichkeit
von *Trypanosoma congolense* (BRODEN, 1904) Stämmen
aus Rindern in Burkina Faso, Westafrika**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tanja Nikola Knoppe
Tierärztin aus Haunstetten
Berlin 2002

Journal Nr. 2595

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. D. Mehlitz
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. A. O. Heydorn
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. P. S. Glatzel

Tag der Promotion: 28. Juni 2002

Meinen lieben Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
2	LITERATURÜBERSICHT	9
2.1	Trypanosomosis - Krankheitsbild und Bedeutung	9
2.2	Die Erreger	11
2.2.1	<i>Klassifizierung</i>	11
2.2.2	<i>Morphologie</i>	11
2.2.3	<i>Immunbiologie – „Antigenvarianz“</i>	13
2.2.4	<i>Stoffwechsel</i>	14
2.2.5	<i>Trypanosoma congolense</i>	14
2.3	Bekämpfung der Trypanosomosen	16
2.3.1	<i>Bekämpfung der Vektoren (Tsetsefliegen)</i>	16
2.3.1.1	<i>„Spraying“</i>	16
2.3.1.2	<i>„Pour-on“</i>	17
2.3.1.3	<i>Tsetsefliegenfallen</i>	18
2.3.1.4	<i>Sterile-Männchen-Technik</i>	18
2.3.2	<i>Bekämpfung der Erreger (Trypanosomen)</i>	19
2.3.2.1	<i>Impfstoffe</i>	19
2.3.2.2	<i>Chemoprophylaxe und –therapie</i>	19
2.3.3	<i>Trypanotolerante Rinderrassen</i>	22
2.4	Chemoresistenz	22
2.4.1	<i>Vorkommen trypanozidresistenter Trypanosomen</i>	22
2.4.2	<i>Mechanismus der Medikamentenresistenz</i>	25
2.5	Untersuchungsmethoden zur Medikamentenempfindlichkeit	26
2.5.1	<i>In-vivo-Tests</i>	27
2.5.1.1	<i>Tests in Wiederkäuern</i>	27
2.5.1.2	<i>Tests in Labornagern</i>	28
2.5.2	<i>In-vitro-Tests</i>	30
2.5.2.1	<i>Photometrischer Test</i>	31
2.5.2.2	<i>Fluoreszenztest</i>	31
2.5.2.3	<i>Wachstumshemmtest</i>	32
2.5.2.4	<i>Langzeittest</i>	32
2.5.2.5	<i>Test für metazyklische T. congolense-Formen</i>	34

2.5.2.6	„Blood Incubation Infectivity Test“ (BIIT)	34
2.5.2.7	„Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT)	35
2.5.2.8	„Drug Incubation Glossina Infectivity Test“ (DIGIT)	36
2.5.2.9	[³ H] Hypoxanthin-Test	36
2.5.3	Andere Tests	38
2.5.3.1	„Isometamidium-Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ISMM-ELISA)	38
2.6	Untersuchungsmethoden in dieser Arbeit	38
3	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1	Das Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)	39
3.1.1	Ziel und Ablauf des Forschungsprojekts	39
3.1.2	Projektgebiet Provinz Kéné Dougou, Burkina Faso	40
3.1.3	Querschnittsstudie, Juni-August 1998	42
3.1.4	Blockbehandlungsstudie, November 1998 – Februar 1999	45
3.2	Trypanosomen (<i>T. congolense</i>)	46
3.2.1	Herkunft der <i>T. congolense</i> -Referenzklone	46
3.2.2	Herkunft der <i>T. congolense</i> -Primärisolate	48
3.2.2.1	Beschreibung der <i>T. congolense</i> -Primärisolate aus Samorogouan	48
3.2.2.2	Beschreibung der <i>T. congolense</i> -Primärisolate aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)	50
3.3	Versuchstiere	53
3.3.1	<i>Mastomys coucha</i>	53
3.4	Kultivierung von Trypanosomen in <i>Mastomys</i>	54
3.4.1	Anzüchtung von Trypanosomenstabilaten in <i>Mastomys</i>	54
3.4.2	Isolierung von Trypanosomen aus <i>Mastomys</i>	54
3.4.3	Konservierung von Trypanosomen	55
3.4.4	Parasitologische Untersuchungsmethoden	55
3.4.4.1	Nativpräparat	55
3.4.4.2	Haematokrit-Zentrifugations-Technik	55
3.4.4.3	Buffy Coat-Technik	56
3.4.4.4	Miniaturnanionen-Austausch-Zentrifugationstechnik	56
3.5	Untersuchung zur Medikamentenempfindlichkeit	57
3.5.1	Der Standard-Maustest (SMT)	57

3.5.2	<i>Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT)</i>	58
3.5.3	<i>Beschreibung der verwendeten Trypanozide</i>	59
3.5.3.1	<i>Isometamidiumchlorid</i>	59
3.5.3.2	<i>Diminazenaceturat</i>	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Vermehrung von <i>T. congolense</i>-Primärisolaten	60
4.1.1	<i>Vermehrung der <i>T. congolense</i>-Primärisolate aus Samorogouan</i>	60
4.1.2	<i>Vermehrung der <i>T. congolense</i>-Primärisolate aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)</i>	60
4.2	Untersuchungen zur Medikamentenempfindlichkeit	63
4.2.1	<i>Ergebnisse des Standard-Maustests (SMT)</i>	63
4.2.1.1	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Referenzklone im SMT</i>	63
4.2.1.2	<i>Festlegung der Kriterien zur Beurteilung „sensitiver“ bzw. „resistenter“ Trypanosomenpopulationen</i>	65
4.2.1.3	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Stämme aus Samorogouan im SMT</i>	66
4.2.1.4	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Stämme aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project) im SMT</i>	69
4.2.2	<i>Ergebnisse des „Drug Incubation Infectivity Tests“ (DIIT)</i>	73
4.2.2.1	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Referenzklone im DIIT</i>	73
4.2.2.2	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Stämme aus Samorogouan im DIIT</i>	76
4.2.2.3	<i>Verhalten der <i>T. congolense</i>-Stämme aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project) im DIIT</i>	78
4.2.3	<i>Übersicht der ermittelten Medikamentenempfindlichkeiten aller untersuchten <i>T. congolense</i>-Stämme im SMT und DIIT</i>	81
5	DISKUSSION	83
5.1	Medikamentenempfindlichkeit der untersuchten <i>T. congolense</i>-Referenzklone	83
5.1.1	<i>Empfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Referenzklone im SMT</i>	83
5.1.2	<i>Empfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Referenzklone im DIIT</i>	85

5.1.3	<i>Vergleich SMT – DIIT</i>	86
5.2	Medikamentenempfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Stämme aus Samoroguan	88
5.3	Medikamentenempfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Stämme aus dem Forschungs-projekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)	90
5.3.1	<i>Empfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Stämme aus der Querschnittsstudie</i>	91
5.3.2	<i>Empfindlichkeit der <i>T. congolense</i>-Stämme aus der Blockbehandlungsstudie</i>	91
5.4	Vergleich der beschriebenen Methoden zur Bestimmung resistenter <i>T. congolense</i>-Stämme	93
5.4.1	<i>Isometamidium-Blockbehandlungsstudie des Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)</i>	93
5.4.2	<i>Tests in Wiederkäuern</i>	93
5.4.3	<i>In-vitro-Tests</i>	94
5.4.4	<i>Labornager (Mastomys)</i>	94
5.4.5	<i>DIIT als Kombination eines in-vivo und in-vitro-Testsystems</i>	96
5.4.6	<i>Schlussbetrachtungen</i>	97
6	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY – RESUME	99
6.1	Zusammenfassung	99
6.2	Summary	101
6.3	Résumé	103
7	ANHANG	105
7.1	Verwendete Medien, Lösungen, Materialien und Geräte	105
7.1.1	<i>Medien</i>	105
7.1.2	<i>Puffer</i>	106
7.1.3	<i>Sonstige Lösungen</i>	107
7.1.4	<i>Chemikalien</i>	108
7.1.5	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	109
7.1.6	<i>Geräte</i>	110
7.2	Verwendete Begriffe und ihre Definitionen (WHO, 1999)	112

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. Mehlitz gilt mein allerherzlichster Dank für die Überlassung der Arbeit, die Unterstützung und wissenschaftliche Beratung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit, und seinem Engagement, welches mir unter anderem den spannenden Aufenthalt in Burkina Faso ermöglichte.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Dr. P.-H. Clausen für die jederzeit „offene Tür“, die unermüdliche Bereitschaft zur Beratung und Unterstützung bei der Planung und Umsetzung, die Geduld und wertvollen Anregungen bei der Abfassung dieser Arbeit und seine geschätzte Vermittlung im Austausch mit den anderen Projektbeteiligten.

Frau Dr. A. Scheer und Herrn U. Tietjen danke ich für die Einführung in die Methodik der *in-vivo*- und *in-vitro*-Kultivierung von Trypanosomen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Tietjen, für seine liebe Hilfsbereitschaft und die wertvollen Tipps im Umgang mit den kleinen Parasiten.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfe und Beistand. Herrn Dr. M. Greiner danke ich für seine Beratung im Rahmen der Testvalidierung. Frau A. Wiemann, Frau P. Köhler, Frau K. Seidl, Frau E. Wendt und Frau A. Etzhold danke ich für die jederzeit freundliche Unterstützung bei meiner Laborarbeit. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern im Bereich der Tierpflege. Vor allem Frau G. Schröter danke ich sehr herzlich für die unermüdliche Hege und Pflege der *Mastomys*.

Den Mitarbeitern des „Centre International de Recherche-Development sur l’Elevage en Zone subhumide“ (CIRDES) in Bobo-Dioulasso danke ich für die gewährte Gastfreundschaft in ihrem Institut während meines Aufenthaltes in Burkina Faso.

Mein ganz besonders lieber Dank gilt meinen Eltern, ihrem Vertrauen in mich und dass sie mich immer in meinen beruflichen Wünschen und Entscheidungen unterstützt und gefördert haben.

LEBENS LAUF

Tanja Nikola Knoppe, geboren 19.12.1969 in Haunstetten

Berufliche Erfahrung	11/99 bis heute	Anstellung bei Klifovet AG, München Organisation & Überwachung der Durchführung von klinischen Feldstudien im Rahmen der Zulassung neuer Veterinärprodukte Weiterbildung zum internen Auditor (IHK-Zertifikat)
Postgraduierte Studien	06/97 – 10/99	Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
	02/98 – 10/99	Anstellung als nicht vollbeschäftigte wissenschaftliche Mitarbeiterin
	06/97 – 02/98	Beginn der Dissertation im Rahmen eines drittmittelfinanzierten BMZ/GTZ- Forschungsprojektes „Epidemiology of Drug Resistance in Trypanosomes in West Africa“
Studium	05/97	Approbation als Tierärztin
	10/93 – 05/97	Studium der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
	10/91 – 06/93	Studium der Veterinärmedizin, Universität Budapest, Ungarn
Berufliche Ausbildung	08/89 – 06/91	Ausbildung zur Tierarzthelferin, Kleintierpraxis Dr. Radmacher, Bonn
Schulische Ausbildung	08/86 – 06/89	Theodor-Storm-Gymnasium, Husum Abschluss Abitur
	08/81 – 07/86	Stiftisches Gymnasium, Düren
	08/80 – 07/81	Immanuel-Kant-Gymnasium, Münster
	1979 - 1980	Grundschule Berg Fidel, Münster
	1977 - 1979	Grundschule Schenefelder Landstraße, Hamburg
	1976 - 1977	Grundschule am Danhalm, Jever

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbst und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die Arbeit ist erstmalig und nur an der Freien Universität Berlin eingereicht worden.

München, 10. Februar 2002

Tanja Nikola Knoppe