

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Das Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)

3.1.1 Ziel und Ablauf des Forschungsprojekts

Die vorliegende Arbeit war Teil eines internationalen Agrarforschungsprojektes mit der Kurzbezeichnung „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project PN 97.7860.6-001.00). Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung von 1998 bis 1999 finanziert. Die Problemstellung und die vorläufigen Ergebnisse dieses Projekts werden an dieser Stelle zusammenfassend beschrieben; die Zielsetzung der Untersuchungen dieser Arbeit sind als integraler Bestandteil des Gesamtprojekts zu verstehen.

Ziel des Forschungsprojektes war es, in der Provinz von Kénédougou, im südwestlichen Burkina Faso, die Prävalenz und das Ausmaß der Medikamentenresistenz von Trypanosomenpopulationen in Rinderherden, festzustellen. Es sollten Faktoren bestimmt werden, die für die Entstehung der Medikamentenresistenz und ihre Beständigkeit verantwortlich sind. Eine weitere Aufgabe war es, den Einfluss der Medikamentenresistenz auf die Produktivität des landwirtschaftlichen Nutztierbestandes zu ermitteln. Außerdem sollten geeignete Möglichkeiten zur Kontrolle der Medikamentenresistenz erarbeitet bzw. Kontrollmaßnahmen zur Bekämpfung der Trypanosomosis entwickelt werden.

Die Untersuchungen fanden im Projektgebiet der Provinz Kénédougou (Feldstudien) und an verschiedenen Instituten (Laboruntersuchungen) statt. Die Felduntersuchungen bestanden unter anderem aus einer Querschnittsstudie („Cross-sectional Study“) und einer Behandlungsstudie (Blockbehandlungsstudie, „Blocktreatment Study“). In der Querschnittsstudie wurden Rinderherden in allen vier Regionen der Provinz untersucht und die Trypanosomenprävalenzen in Rindern und die Tsetsefliegendichten bestimmt. Die erhobenen Daten waren Basis für die Planung der sich anschließenden Blockbehandlungsstudie, in der gezielt in Dörfern mit hohen Trypanosomenprävalenzen nach resistenten Trypanosomenpopulationen gesucht wurde. Von allen trypanosomenpositiven Rindern aus der Querschnittsstudie und der Blockbehandlungsstudie wurden Trypanosomenstabilate

hergestellt, die für weitere vergleichende Tests zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit in die genannten Institute überführt wurden.

3.1.2 Projektgebiet Provinz Kénédougou, Burkina Faso

Die im Südwesten von Burkina Faso gelegene Provinz von Kénédougou erstreckt sich westlich von Bobo Dioulasso über ein Gebiet von 8.265 km². Im Norden und Westen begrenzt durch das Nachbarland Mali schließen sich im Osten die Provinzen Kossi und Houet und im Süden die Provinz Komoé mit Verbindung zur Elfenbeinküste an (siehe Abb. 2). Das Klima der Region ist subtropisch heiß; die Regenzeit beginnt im Juni/Juli und endet meist im September. Kénédougou hat die meisten Niederschläge von Burkina Faso mit ca. 1000 bis 1200 mm pro Jahr. Die Bevölkerung umfasst rund 198.900 Einwohner, bestehend aus den Stämmen der Bobo, der Mossi und der transhumanten Fulani. Über 70% der Provinzbewohner betreiben Ackerbau, der restliche Anteil lebt von der Viehzucht in extensiver Haltung. Die traditionellen Getreidearten (Mais und Hirse) sowie Reis, Früchte (Mango-Plantagen) und Baumwolle sind die wichtigsten landwirtschaftlichen Erzeugnisse. Häufig werden die verschiedenen Getreidearten zusammen mit Baumwolle angepflanzt. Für den Anbau von Baumwolle ist der Einsatz von Zugochsen verbreitet (OUEDRAOGO, 1998).

In Kénédougou gibt es etwa 61.000 Rinder, 48.000 Schafe und 33.700 Ziegen. Das Zébu ist die beliebteste Rinderrasse. Nur etwa 10% des Rinderanteils wird von trypanotoleranten Rassen (z.B. Baoulé [Westafrican Shorthorn]) gebildet. Weit verbreitet sind die Métis-Rinder, eine Kreuzung aus Zebu und Baoulé. Die durchschnittliche Herdengröße pro Farm wird mit 14 Milchkühen und 4 Zugochsen angegeben, wobei die Zahlen innerhalb der verschiedenen Zonen von Kénédougou stark variieren (N'Dorola 74 Tiere, Samorogouan 105 Tiere, Orodara 23 Tiere, Koloko 67 Tiere). Die Herden werden im Durchschnitt dreimal im Jahr gegen Trypanosomosis behandelt, wofür etwa 80.000 F CFA (entspricht 800 Franz. Francs, ungefähr 122 Euro) pro Herde aufgewendet werden (OUEDRAOGO, 1998).

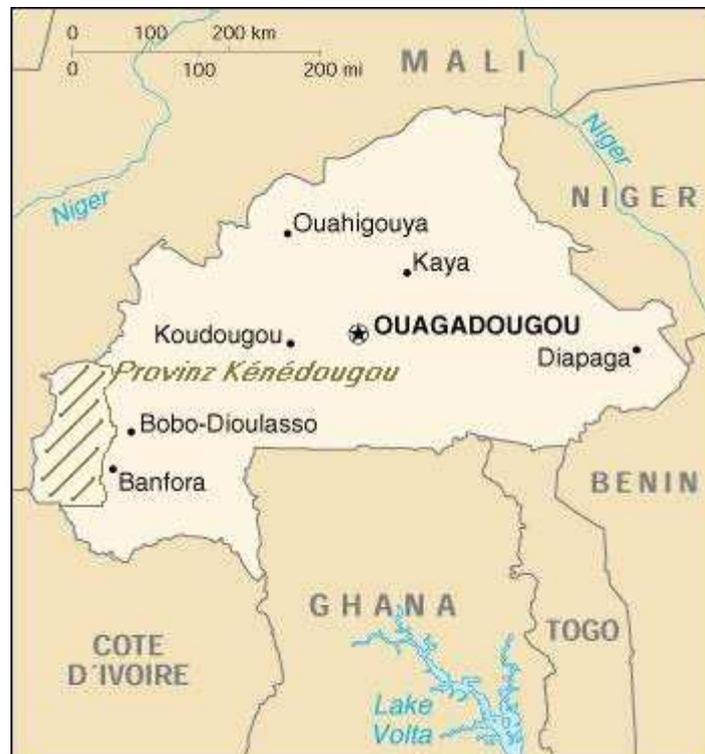


Abb. 2: Karte von Burkina Faso (Westafrika) mit der Provinz Kénédougou

Die Provinz besteht aus vier verschiedenen Regionen (N'Dorola im Norden, Samorogouan zentral, Koloko im Südwesten und Orodara im Südosten), die sich in ihren landwirtschaftlichen Produktionssystemen unterscheiden. N'Dorola ist die trockenste aller Regionen und bildet die nördliche Grenze der Tsetsefliegenverbreitung in der Provinz Kénédougou. Die Landwirtschaft konzentriert sich dort, neben der Viehwirtschaft (Zebu als dominierende Rinderrasse), auf den Anbau von Baumwolle. Die Zentralregion Samorogouan ist gekennzeichnet durch große Weideflächen und ist für die Rinderproduktion die wichtigste Region der Provinz. In den beiden südlichen Distrikten Koloko und Orodara findet man durch die starken jährlichen Regenfälle (≥ 1200 mm/Jahr) eine vielfältige Landwirtschaft, wobei hauptsächlich Baumwolle und Erdnüsse angebaut werden. Tsetsefliegen sind weit verbreitet (MCDERMOTT et al., 2000).

3.1.3 Querschnittsstudie, Juni-August 1998

Von Mitte Juni bis Mitte August 1998 wurden epidemiologische Untersuchungen im Rahmen einer Querschnittsstudie im gesamten Projektgebiet durchgeführt (Abb. 3). Ziel der Querschnittsstudie war es, die Prävalenzen von Trypanosomeninfektionen und die verschiedenen beteiligten Trypanosomenarten in einer repräsentativen Anzahl von Rinderherden zu bestimmen. Außerdem wollte man die Tsetsefliegendichte in der Region untersuchen. Vorläufige Ergebnisse sind in Veröffentlichungen von OUERDRAOGO (1998), WOITAG (1998) und MCDERMOTT et al. (2000) zu finden.

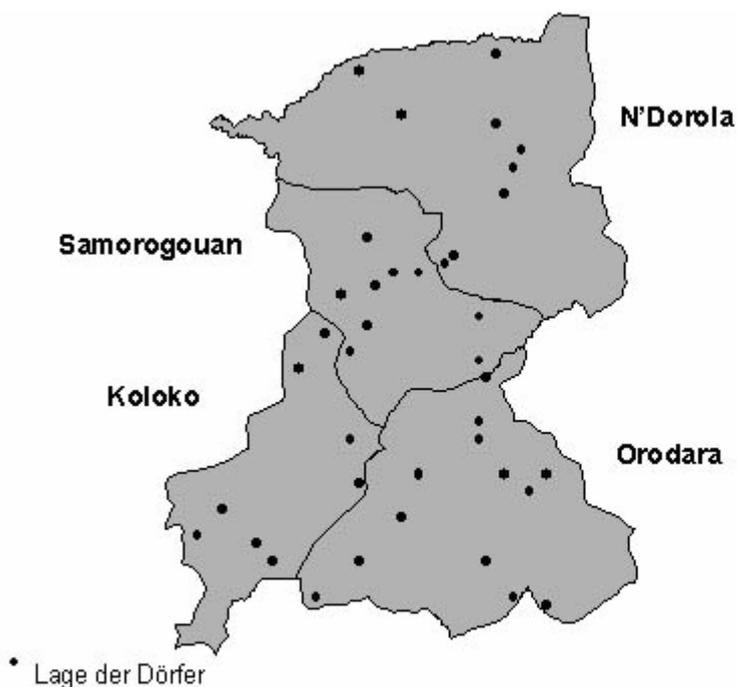


Abb. 3: Darstellung der vier Regionen in der Provinz Kénédougou und der Dörfer, in denen Rinderherden auf Trypanosomeninfektionen untersucht wurden.

Nach dem Zufallsprinzip wurden aus den vier Regionen 2000 Rinder aus 45 (von insgesamt 166) Dörfern ausgewählt und untersucht. In allen vier Regionen wurden Trypanosomeninfektionen in Rindern nachgewiesen. Die Anzahl der Infektionen nahmen von Norden nach Süden hin zu. Es wurden vorrangig *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen festgestellt. Mischinfektionen waren seltener (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Trypanosomenprävalenzen in Rindern der Provinz Kéné Dougou, Juni-August, 1998 (WOITAG, 1998)

Trypanosomenart	N'Dorola (%)	Samorogouan (%)	Orodara (%)	Koloko (%)
<i>T. congolense</i>	0.2	1.2	6.6	4.7
<i>T. vivax</i>	1.2	2.9	3.7	4.7
Mischinfektionen	0	0.2	0.2	0.6
Gesamt	1.4	4.3	10.5	10.0

In Kéné Dougou wurden in der Querschnittsstudie Glossinen der Palpalis- und der Tachinoides-Gruppe gefangen. Trypanosomenprävalenzen in Rindern und Glossinenvorkommen und -dichten sind in Abb. 4 dargestellt.

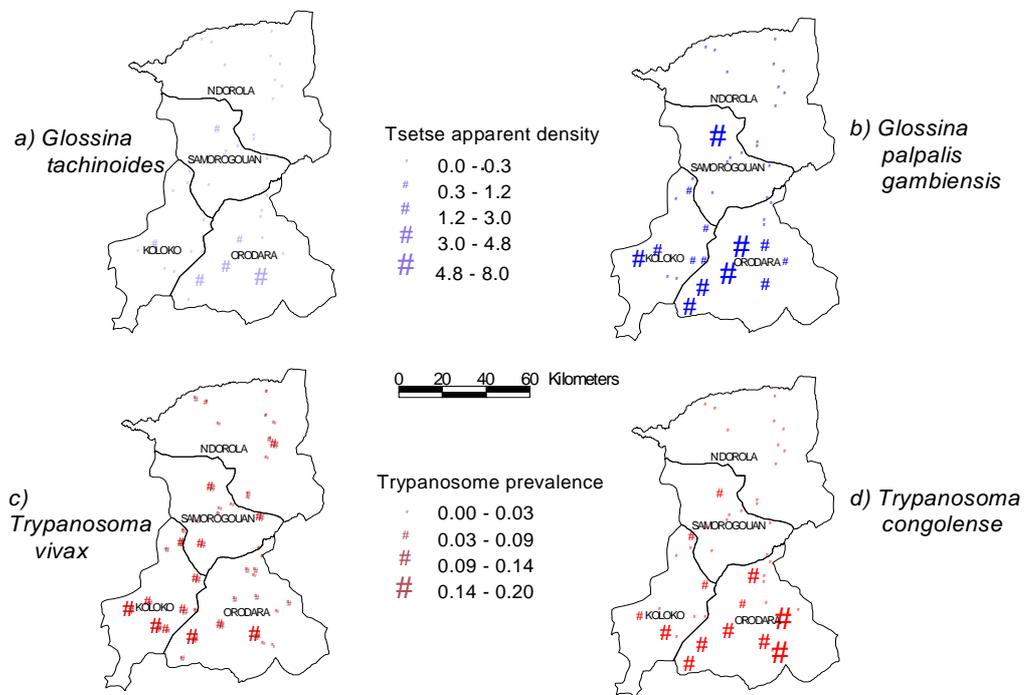


Abb. 4: Geographische Verteilung der Tsetsefliegendichten („tsetsefly apparent density“) und Trypanosomenprävalenzen in Rindern in den 45 Dörfern der Provinz Kénédougou, Juni/August 1998 (MCDERMOTT et al., 2000)

3.1.4 Blockbehandlungsstudie, November 1998 – Februar 1999

Die Blockbehandlungsstudie wurde im Anschluss an die Querschnittsstudie auf Basis der dort erhobenen Daten durchgeführt. Ziel der Blockbehandlungsstudie war es, Trypanozidresistenzen zu ermitteln. Die Studie dauerte von Mitte November 1998 bis Mitte Februar 1999. Man wählte aus den Regionen Orodara und Koloko neun Dörfer aus, die in der Querschnittsstudie Trypanosomenprävalenzen von mehr als 10% gezeigt hatten. Zusätzlich wurden Herden in Fama, einem Dorf in Samorogouan, in dem das Vorkommen von Mehrfachresistenzen in früheren Untersuchungen beschrieben worden war, untersucht. Insgesamt wurden 726 Rinder mit 1 mg/kg Isometamidium behandelt (sog. Blockbehandlung) und anschließend in Intervallen von zwei Wochen parasitologisch untersucht. Grundsätzlich hätte diese Blockbehandlung alle vorhandenen Trypanosomeninfektionen abtöten und Neuinfektionen der folgenden acht bis zwölf Wochen verhindern müssen. Folgeuntersuchungen der Rinder nach 14 Tagen zeigten jedoch Trypanosomeninfektionen in sechs von zehn Dörfern.

In Abb. 5 ist das Verhältnis trypanosomenpositiver Rinder vor und nach der Blockbehandlung dargestellt. Die Isometamidiumfehlerrate wurde definiert als prozentualer Anteil trypanosomenpositiver Tiere 14 Tage nach der Isometamidiumblockbehandlung im Verhältnis zu den trypanosomenpositiven Tieren zum Zeitpunkt der Behandlung. In den Dörfern Sokouraba, Dieri, Kotura und Toussian-Bandougou betrug die Fehlerrate zwischen 33 und 70%. In den Dörfern Samogohiri, Sipigui, Kolokaka und Fama wurden nach 14 Tagen keine trypanosomenpositiven Rinder diagnostiziert (WOITAG, 1999). Rinder, die 14 Tage nach der Isometamidiumblockbehandlung erneut trypanosomenpositiv waren, wurden mit Diminazen (3.5 mg/kg Körpergewicht) behandelt. In nachfolgenden Untersuchungen wurden auch Resistenzen gegen Diminazen beobachtet. 18% der diminazenbehandelten Rinder zeigten nach 14 Tagen Trypanosomeninfektionen (WOITAG, 1999).

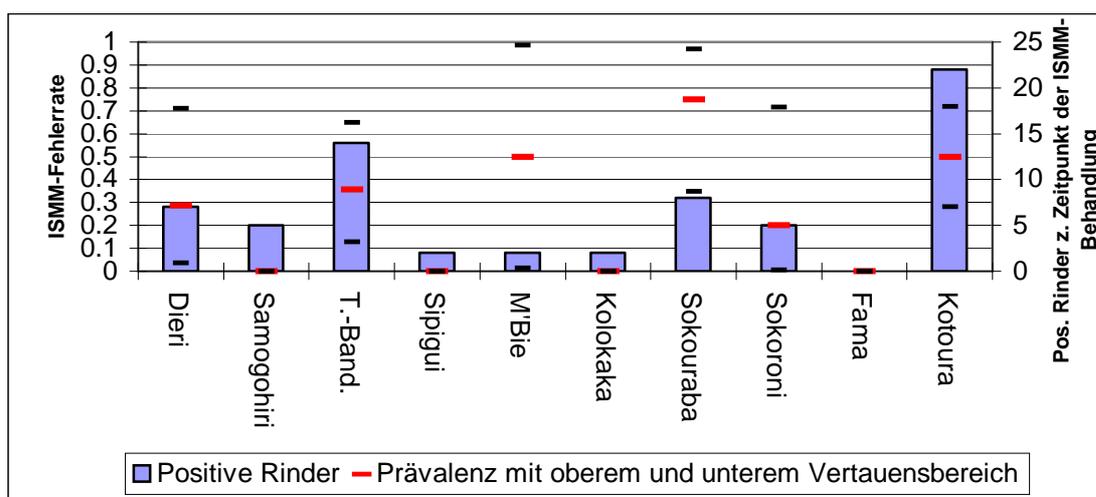


Abb. 5: Isometamidiumfehlerrate (BMZ-Special Project, Annual and Final Report 1998-1999)

Für weitere *in-vivo* und *in-vitro* Untersuchungen am CIRDES (Bobo Dioulasso), am ILRI (Nairobi) und an der FU Berlin (Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit) wurden im Feld von allen infizierten Rindern Primärisolate (Rinderblutstabilate bzw. Direktinokulationen in Mäuse) angefertigt. Die Einfuhr der Stabilate in die Bundesrepublik zum Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit (FU Berlin) wurde von der Berliner Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales nach §3 der Tierseuchenerreger-Einfuhrverordnung genehmigt.

3.2 Trypanosomen (*T. congolense*)

3.2.1 Herkunft der *T. congolense*-Referenzklone

Für diese Arbeit standen am Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit vier verschiedene *T. congolense*-Klone zur Verfügung. Angaben zu ihrer Herkunft sind in Tab. 6 dargestellt.

Die Klone IL 1180 und IL 3000 waren zu Beginn der Untersuchungen am Institut bereits vorhanden. Die Klone IL 2642 und IL 3338 wurden freundlicherweise vom International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenia, zur Verfügung gestellt.

Tab. 6: Übersicht über die Herkunft der *T. congolense*-Referenzklone

Primär- isolat	Klon	Ort der Isolierung	Jahr der Isolierung	Herkunft	ISMM-Empfind- lichkeit* im Rind	Referenzen
STIB 212	IL 1180	Tansania	1971	Löwe	sensitiv	GEIGY und KAUFMANN, 1973
EATRO 209	IL 2642	Uganda	1962	Rind	sensitiv	MORRISON et al., 1978 ; PEREGRINE et al., 1988
Trans Mara I	IL 3000	Kenia	1966	Rind	resistent	WELLDE et al., 1974
IL 3330	IL 3338	Äthiopien	1989	Rind	resistent	CODJIA et al., 1993

* ISMM = Isometamidiumchlorid

Aus Tests in Mäusen wurden für die Referenzklone folgende CD_{50} -Werte für Isometamidium und Diminazen publiziert (Tab. 7):

Tab. 7: Übersicht von CD_{50} -Werten der *T. congolense*-Referenzklone in Mäusen

Klon	CD_{50} für Isometamidium (mg/kg)	CD_{50} für Diminazen (mg/kg)	Referenzen
IL 1180	0.018	2.3	PEREGRINE et al., 1991
IL 2642	0.007	n.b.	WILKES et al., 1997
IL 3000	2.9	n.b.	WILKES et al., 1997
IL 3338	20.0	n.b.	WILKES et al., 1997

n.b. nicht bekannt

3.2.2 Herkunft der *T. congolense*-Primärisolate

Alle in dieser Arbeit untersuchten *T. congolense*-Primärisolate wurden aus Rinderherden der Provinz Kéné Dougou isoliert. Drei der Primärisolate wurden bereits 1982 und 1989 gewonnen. Die verbleibenden *T. congolense*-Primärisolate wurden im Rahmen des Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project) 1998/1999 gewonnen und stammen zumeist aus dem südlichen Teil der Provinz Kéné Dougou. Abb. 6 zeigt einen Überblick über die Lage dieser Dörfer in der Provinz, aus denen die Primärisolate stammen.



Abb. 6: Überblick über die Herkunft der *T. congolense*-Primärisolate aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project), die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden

3.2.2.1 Beschreibung der *T. congolense*-Primärisolate aus Samorogouan

Die Primärisolate aus den Jahren 1982 und 1989 wurden aus Rindern einer Farm (CEZIET-„Centre d'Encadrement des Zones d'Idensification de l'Elevage Traditionnel“) in Samorogouan gewonnen und waren zu Beginn der Untersuchungen bereits im Institut der

FU Berlin vorhanden. Die Primärisolate SA 82 und SA 95 wurden im August 1998 im Rahmen des obengenannten Forschungsprojekts in Samorogouan isoliert. Einen Überblick aller aus den Primärisolaten gewonnenen *T. congolense*-Populationen gibt Tab. 8.

Tab. 8: Übersicht über die in Samorogouan isolierten *T. congolense*-Populationen

Trypanosomen-population	Kurz-bezeichnung	Datum der Isolierung	Herkunft	Referenz
MBOI/BK/82/SA 53	SA 53	1982	Zébu	PINDER und AUTHIE, 1984 AUTHIE, 1984
MBOI/BK/89/SA 267	SA 267	1989	Zébu	CLAUSEN et al., 1992
MBOI/BK/89/SA 268	SA 268	1989	Zébu	CLAUSEN et al., 1992
MBOI/BK/98/SA 82	SA 82	1998	Zébu	BMZ-Special Project, 1998
MBOI/BK/98/SA 95	SA 95	1998	Zébu	BMZ-Special Project, 1998

PINDER und AUTHIE (1984) beschrieben für SA 53 eine Isometamidiumresistenz in Rindern. CLAUSEN et al. (1992) zeigten für SA 267 und SA 268 Resistenzen gegen Isometamidium und Diminazen in Rindern und Ziegen (siehe Tab. 9). Im Rahmen des BMZ-Special Projects wurden im August 1998 in Samorogouan 100 Rinder untersucht, von denen zwei Tiere parasitologisch positiv waren. Von beiden Tieren wurden Primärisolate gewonnen (MBOI/BK/98/SA82 und MBOI/BK/98/SA95). Die Untersuchung der Primärisolate im SMT und im DIIT sollte zeigen, ob die Resultate in Labornagern mit den Feldergebnissen in Rindern vergleichbar waren. Des weiteren sollte untersucht werden, ob eine Entwicklung der Chemoresistenz in dieser speziellen Region über einen Zeitraum von 16 Jahren aufzuzeigen ist.

Tab. 9: Übersicht der Medikamentenempfindlichkeiten der in Samorogouan isolierten *T. congolense* Populationen (PINDER und AUTHIE, 1984; CLAUSEN et al., 1992)

Trypanosomen-population	Kurzbezeichnung	Empfindlichkeit in Rindern	Empfindlichkeit in Ziegen	Empfindlichkeit in Mäusen
MBOI/BK/82/ SA 53	SA 53	ISMM R 1 mg/kg	n.b.	MEM ISMM 4 mg/kg ED ₇₅ ISMM 2 mg/kg ED ₇₅ DIM ≤5 mg/kg CD ₇₅ DIM 20 mg/kg
MBOI/BK/89/SA 267	SA 267	ISMM R 1 mg/kg DIM R 7 mg/kg	ISMM R 2 mg/kg DIM R 17.5 mg/kg	n.b.
MBOI/BK/89/SA 268	SA 268	ISMM R 1 mg/kg DIM R 7 mg/kg	n.b.	n.b.

ISMM R = resistent gegen Isometamidium
 DIM R = resistent gegen Diminazenaceturat
 MEM = Minimale Effektive Dosis (Dosis, nach deren Anwendung, für mind. ein bis mehrere Tage keine Parasiten im Blut mehr nachweisbar sind)
 ED75 = Effektive Dosis, nach deren Anwendung an parasitärischen Mäusen, spätestens nach vier Tagen im Blut von 80% der Mäuse keine Trypanosomen mehr nachweisbar sind
 CD75 = Dosis, nach deren Anwendung über einen bestimmten Untersuchungszeitraum hinweg die Mäuse nicht wieder parasitärisch werden
 n.b. = nicht bekannt

3.2.2.2 Beschreibung der *T. congolense*-Primärisolate aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)

Aus der Querschnittsstudie wurden fünf Trypanosomenstabilate (Ursprung: Direktinokulationen in Mäuse) aus den Regionen Koloko und Orodara (Regionen mit hohen Trypanosomenprävalenzen) ausgesucht und im Institut der FU Berlin in *M. coucha* injiziert (siehe Tab. 10).

Tab. 10 : Übersicht über die in der Querschnittsstudie gewonnenen und im Institut der FU Berlin in *M. coucha* inokulierten Trypanosomenstabilate

Trypanosomenpopulation	Kurzbezeichnung	Datum der Isolierung (Rind)	Ort der Isolierung	Herkunft (Rind)
MBOI/BK/98/01 18 (M)	DRI 18	Jul.1998	Dieri (Orodara)	Zébu
MBOI/BK/98/03 92 (M)	SRI 92	Jul.1998	Samoghohiri (Orodara)	Zébu
MBOI/BK/98/38 1640 (M)	SBA 1640	Aug.1998	Sokouraba (Koloko)	Zébu
MBOI/BK/98/38 1642 (M)	SBA 1642	Aug.1998	Sokouraba (Koloko)	Zébu
MBOI/BK/98/44 1950 (M)	KRA 1950	Aug.1998	Kotoura (Koloko)	Zébu

(M) = mausadaptiert

Die ausgewählten Primärisolate der Blockbehandlungsstudie waren jeweils am Tag kurz vor der Isometamidiumbehandlung hergestellt worden, mit Ausnahme des Stabilats FAM 1788 aus Fama (Direktinokulation in Mäuse bei der Nachuntersuchung sechs Wochen nach der Blockbehandlung). In Berlin wurden diese *T. congolense*-Primärisolate in die zwei Gruppen „Primärisolate aus erfolgreich therapierten Rindern“ und „Primärisolate aus nicht erfolgreich therapierten Rindern“ eingeteilt. Die Gruppe der „Primärisolate aus erfolgreich therapierten Rindern“ stammte aus infizierten Rindern, die nur in der ersten Untersuchung (Tag der Blockbehandlung) parasitologisch positiv waren, jedoch nach 14 Tagen und bei den nachfolgenden Kontrolluntersuchungen im Anschluss an die Isometamidiumblockbehandlung keine Trypanosomeninfektion mittels Buffy Coat-Technik zeigten. Die Gruppe der „*T. congolense*-Primärisolate aus nicht erfolgreich therapierten Rindern“ stammte aus Rindern, die sowohl in der ersten als auch in den anschließenden (BCT-) Untersuchungen nach der Isometamidiumbehandlung *T. congolense*-Infektionen aufwiesen. Das Stabilat FAM 1788 wurde zur Gruppe der „Primärisolate aus nicht erfolgreich therapierten Rindern“ zugeordnet, da diese Trypanosomenpopulation im Zeitraum der Prophylaxiswirkung von Isometamidium (sechs Wochen nach Behandlung) isoliert wurde.

Insgesamt 27 Trypanosomenstabilate (aus 13 „erfolgreich therapierten Rindern“ und 14 „nicht erfolgreich therapierten Rindern“) aus der Blockbehandlungsstudie wurden zur Anzüchtung in *M. coucha* injiziert. 24 von ihnen waren Rinderblutstabilate; bei drei Stabilitaten (TBU 2113, TBU 2130 und FAM 1788) handelte es sich um bereits mausadaptierte Trypanosomenpopulationen (hervorgegangen aus den Direktinokulationen in Mäuse) (siehe Tab. 11 und Tab. 12).

Tab. 11: Übersicht über die in der Blockbehandlungsstudie gewonnenen und im Institut der FU Berlin in *M. coucha* inokulierten Trypanosomenstabilate – Herkunft aus erfolgreich therapierten Rindern

Trypanosomenpopulation	Kurzbezeichnung	Datum der Isolierung	Ort der Isolierung	Herkunft (Wirtstier)
MBOI/BK/98/01 49	DRI 49	Nov.1998	Dieri	Zébu
MBOI/BK/98/03 117	SRI 117	Nov.1998	Samoghohiri	Zébu
MBOI/BK/98/03 2154	SRI 2154	Nov.1998	Samoghohiri	Zébu
MBOI/BK/98/03 2161	SRI 2161	Nov.1998	Samoghohiri	Zébu
MBOI/BK/98/03 2179	SRI 2179	Nov.1998	Samoghohiri	Zébu
MBOI/BK/98/04 2099	TBU 2099	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/04 2130 (M)	TBU 2130	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/06 2076	SPI 2076	Nov.1998	Sipigui	Zébu
MBOI/BK/98/07 2050	MBI 2050	Nov.1998	M'Bie	Zébu
MBOI/BK/98/12 366	KKA 366	Nov.1998	Kolokaka	Zébu
MBOI/BK/98/12 392	KKA 392	Nov.1998	Kolokaka	Zébu
MBOI/BK/98/40 2242	SNI 2242	Nov.1998	Sokoroni	Zébu
MBOI/BK/98/40 2321	SNI 2321	Nov.1998	Sokoroni	Zébu

ISMM = Isometamidium
T.-Band. = Toussian-Bandougou
(M) = mausadaptiert

Tab. 12: Übersicht über die in der Blockbehandlungsstudie Rindern gewonnenen und im Institut der FU Berlin in *M. coucha* inokulierten Trypanosomenstabilate – Herkunft aus nicht erfolgreich therapierten Rindern

Trypanosomenpopulation	Kurzbezeichnung	Datum der Isolierung	Ort der Isolierung	Herkunft (Wirtstier)
MBOI/BK/98/01 13	DRI 13	Nov.1998	Dieri	Zébu
MBOI/BK/98/04 136	TBU 136	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/04 2054	TBU 2054	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/04 2113 (M)	TBU 2113	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/04 2114	TBU 2114	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/04 2129	TBU 2129	Nov.1998	T.-Band.	Zébu
MBOI/BK/98/07 2033	MBI 2033	Nov.1998	M'Bie	Zébu
MBOI/BK/98/44 1921	KRA 1921	Nov.1998	Kotoura	Baoulé
MBOI/BK/98/44 1932	KRA 1932	Nov.1998	Kotoura	Zébu
MBOI/BK/98/44 2340	KRA 2340	Nov.1998	Kotoura	Baoulé
MBOI/BK/98/44 2343	KRA 2343	Nov.1998	Kotoura	Baoulé
MBOI/BK/98/44 2347	KRA 2347	Nov.1998	Kotoura	Baoulé
MBOI/BK/98/44 2361	KRA 2361	Nov.1998	Kotoura	Zébu
MBOI/BK/98/41 1788 (M)	FAM 1788	Jan.1999	Fama	Zébu

ISMM = Isometamidium
T.-Band. = Toussian-Bandougou
(M) = mausadaptiert

3.3 Versuchstiere

3.3.1 Mastomys coucha

Zur Isolierung, Anzucht und Vermehrung der Trypanosomen wurden an der FU Berlin Labornager der Gattung *M. coucha* (rotäugige Variante, MEHLITZ, 1978; KRUPPA et al., 1990), sogenannte „Afrikanische Vielzitzenmäuse“ aus der institutseigenen Zucht verwendet. Die Tiere waren zwischen vier bis acht Wochen alt, beiderlei Geschlechts und wogen je nach Alter zwischen 20 bis 50 g. Für den Maustest wurden pro Versuchsgruppe gleich große Mäuse verwendet. Ihre Haltung erfolgte auf spezieller Einstreu (Altromin, animal breeding

fibre) in Makrolonkäfigen bei pelletiertem Futter (Altrom 1324) und Wasser ad libitum. Das Stallklima wurde bei einer durchschnittlichen Temperatur von 20-22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% konstant gehalten.

Die Durchführung der Versuche mit *M. coucha* zur Isolierung, Anzucht und Vermehrung von Trypanosomen war nach § 8 des Tierschutzgesetzes vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit in Berlin genehmigt worden (Antrag vom 10.12.1998 – Genehmigungsnummer G 0001/99).

3.4 Kultivierung von Trypanosomen in *Mastomys*

3.4.1 Anzucht von Trypanosomenstabilaten in *Mastomys*

Die Trypanosomenstabilate lagerten bis zu ihrer Verwendung in speziellen Cryoröhrchen in Flüssigstickstoff bei -196°C. Zur Anzucht wurde das gewünschte Trypanosomenstabilat im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sein Inhalt mit etwa 0.5 ml Puffer (EBSS, PSG oder Medium) verdünnt, in eine 2ml -Spritze aufgenommen und anschließend intraperitoneal (i.p.) in zwei *M. coucha* inokuliert. Mit Hilfe parasitologischer Untersuchungsmethoden (Hamatokrit-Zentrifugations-Technik bzw. Nativpräparat, siehe 3.4.4) wurde die Trypanosomenart und die Parasitämdichte in den Nagern festgestellt. Die mausadaptierten *T. congolense*-Referenzklone erreichten für nachfolgende Tests ausreichend hohe Parasitenzahlen in *Mastomys*, während die Trypanosomenpopulationen aus Rinderblutstabilaten, zunächst erst durch ein bis zwei Passagen an die Labornager angepasst werden mussten. Dazu wurden einige Tropfen Schwanzblut einer parasitämischen *Mastomys* in einem Milliliter Puffer oder Medium aufgefangen und jeweils i.p. in zwei weitere *Mastomys* inokuliert.

3.4.2 Isolierung von Trypanosomen aus *Mastomys*

Bei Erreichen einer hohen Parasitämie (im Nativpräparat mindestens 50-100 Trypanosomen pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung) wurde die untersuchte *M. coucha* mit Chloroform betäubt und Blut mittels Herzpunktion in eine 2ml-Spritze aufgezogen, die 25 I.E. Heparin zur Hemmung der Blutgerinnung enthielt. Es wurde zuerst aus der desinfizierten Schwanzspitze der betäubten *Mastomys* einige Tropfen Blut in einem mit Medium oder Puffer gefüllten Eppendorf-Röhrchen gesammelt und anschließend die Herzpunktion

durchgeführt. Nach Bestimmung der Trypanosomenanzahl mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer wurde je nach Verwendung das Blut mit Puffer oder Medium verdünnt (zur Initiierung eines Standard-Maustests, siehe 3.5.1) oder mit der mAECT-Methode (siehe 3.4.4.4) die Trypanosomen von den Blutzellen getrennt (zur Initiierung eines DIIT, siehe 3.5.2).

3.4.3 Konservierung von Trypanosomen

Von jeder neuen, aus den Primärisolaten gewonnenen und an *Mastomys* adaptierten Trypanosomenpopulation wurde zur Sicherung und für eine spätere Verwendung neue Trypanosomenstabilate hergestellt. Dazu wurde frisch gewonnenes trypanosomenhaltiges Mäuseblut zu gleichen Teilen mit einem glycerinhaltigen Trypanosomeneinfriermedium versetzt, in Cryoröhrchen abgefüllt und diese in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene[®]) gesteckt. Die Einfrierbox wurde in einen Gefrierschrank gestellt und innerhalb von 24 Stunden auf -70°C mit einer Geschwindigkeit von $1-2^{\circ}\text{C}$ pro Minute heruntergekühlt. Anschließend wurden die Cryoröhrchen dem Behälter entnommen und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.4.4 Parasitologische Untersuchungsmethoden

3.4.4.1 Nativpräparat

Zur Herstellung eines Nativpräparates („Wet Blood Film“) wurde ein Tropfen Schwanzblut einer infizierten Maus auf einen entfetteten Objektträger gebracht, darüber ein Deckgläschen so aufgelegt, dass sich das Blut darunter gleichmäßig verteilte und bei Ansicht im Mikroskop die Blutzellen einschichtig nebeneinander lagen. Bei 400facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 40x) ließ sich nach Durchmustern des Präparates anhand der festgestellten durchschnittlichen Anzahl der Trypanosomen pro Gesichtsfeld die Parasitendichte im Milliliter Blut schätzen. Ein Trypanosom pro Gesichtsfeld entsprach ungefähr $1-1.5 \times 10^6$ Trypanosomen pro Milliliter Blut. Als Berechnungsgrundlage diente das Verhältnis der Erythrocytenzahl pro Gesichtsfeld im Bezug auf die Erythrocytenzahl pro Milliliter Blut (KITTLAUSZ, 1982).

3.4.4.2 Haematokrit-Zentrifugations-Technik

Diese Methode („Haematocrit Centrifugation Technique“, HCT), beschrieben 1969 und 1970 von WOO, modifiziert 1972 von WALKER, wurde nach Ablauf der geschätzten Präpatenzzeit angewendet. Da empfindlicher als das Nativpräparat lassen sich Trypanosomeninfektionen

bereits in einem wesentlich früheren Parasitämienstadium feststellen. Die Trypanosomendichte wird angegeben als Anzahl der Trypanosomen pro Kapillare.

In ein zur Hälfte mit WALKER-Lösung gefülltes, heparinisierendes Mikrohämatokritröhrchen wurden drei bis vier Tropfen Schwanzblut einer infizierten Maus aufgenommen. Nach vorsichtigem Schwenken und Verschließen des Röhrchens mit speziellem Kitt zentrifugierte man für acht bis zehn Minuten bei 10.000 g. In der Überlaufrinne einer Zählkammer nach NEUBAUER wurde der Grenzbereich der Kapillare zwischen Erythrozyten und Plasma, der sogenannte „Buffy Coat“, bei 400facher Vergrößerung (Okular 10x, Spitzobjektiv Ph3 40/0.85 Öl, D=1.5) unter Zugabe von Immersionsöl untersucht. In dieser Zone wurden vorhandene Trypanosomen sichtbar. Aufgrund der Eigenschaft von *T. congolense*, sich an Zellen anzuheften, wurde zur leichteren Diagnose die WALKER-Lösung zugesetzt. Eine damit verbundene Erhöhung des spezifischen Gewichtes der roten Blutzellen führte zu einer besseren Trennung von den Trypanosomen. Die Parasiten waren dadurch mikroskopisch leichter zwischen den Blutzellen zu entdecken.

3.4.4.3 Buffy Coat-Technik

In Fällen, in denen zur Untersuchung kein Mikroskop mit Ölobjektiv zur Verfügung stand (z.B. für Untersuchungen im Feld während der Querschnittsstudie und Blockbehandlungsstudie), wurde diese Methode (auch „Buffy Coat Dark Ground Centrifugation Technique“, BCT genannt), die mit der HCT vergleichbar ist, angewendet.

Ein Mikrohämatokritröhrchen wurde mit einigen Tropfen Blut gefüllt und durch Spezialkitt verschlossen. Nach dem Zentrifugieren ritzte und schnitt man die Kapillare etwa einen Millimeter unterhalb des „Buffy Coat“ mit Hilfe eines Diamantschneiders so auf, dass sich die oberste Schicht der Erythrocytensäule zusammen mit der Plasmasäule in einer Hälfte des Röhrchens befanden. Der Inhalt dieser Hälfte wurde auf einen Objektträger gebracht, vorsichtig vermischt, mit einem Deckgläschen (22x22 mm) abgedeckt und bei 250facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 25x) im Phasenkontrastmikroskop untersucht (MURRAY, 1977). Die Parasitendichte wurde als Anzahl pro Gesichtsfeld bzw. pro 40 Gesichtsfelder angegeben.

3.4.4.4 Miniatur-Anionen-Austausch-Zentrifugationstechnik

Das Verfahren (auch bekannt als „miniature-Anion Exchanger-Centrifugation Technique“, m-AECT) ist geeignet, sehr niedrige Parasitämien von Trypanosomen im Wirtstier nachzuweisen und ermöglicht gleichzeitig eine Trennung der Parasiten von den Blutzellen.

Das Wirkungsprinzip erklärt sich durch die unterschiedlichen Oberflächenladungen der einzelnen Blutbestandteile und ist in hohem Maße abhängig von Ionenstärke und pH-Wert. Die stärker negativ geladenen Blutzellen werden in der Zellulose-Säule zurückgehalten, während die schwächer negativ geladenen Trypanosomen sie durchwandern und sich im Eluat ansammeln (LANHAM und GODFREY, 1970).

Vorgequollene DEAE-Zellulose (Whatman, England) wurde in PS-Lösung suspendiert, der pH-Wert mit Phosphorsäure auf 8,0 eingestellt, bei 121 °C, 1bar, 20 min autoklaviert und im Anschluss zur Kalibrierung der Ionenkonzentrationen mit PSG-Lösung (sterilfiltriert, Verhältnis zum Wasseranteil 4:6) mehrmals gewaschen. Eine 10ml-Spritze wurde vertikal in ein Stativ eingespannt, ihr unteres Ende mit einem Papierrundfilter (Schleicher&Schuell) und einem Zellstofftupfer verschlossen, die gewaschene Zellulose-Suspension hineinpipettiert und erneut mit ca. 40ml PSG-Lösung gespült. Etwa ein Milliliter durch Herzpunktion gewonnenen Blutes wurde auf die Säulenoberfläche gegeben. Man ließ es in die Zellulose eindringen und spülte anschließend mit PSG-Lösung. Das Eluat wurde in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 400g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Trypanosomenpellet mit Puffer (PSG mit 20%igem Ziegenserumanteil) resuspendiert. Das Erscheinen der Parasiten im Eluat konnte durch Auffangen eines Tropfens auf einen Objektträger und Durchmustern im Mikroskop kontrolliert werden.

3.5 Untersuchung zur Medikamentenempfindlichkeit

Zur Feststellung der Medikamentenempfindlichkeit wurden zwei Testverfahren angewendet. Der Standard-Maustest ist eine reine *in-vivo*-Methode, der die Medikamentensensitivität einer Trypanosomenpopulation anhand des Therapieerfolges nach Trypanozidbehandlung von mit Trypanosomen infizierten Mäusen beurteilt.

Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) kombiniert *in-vitro*- mit *in-vivo*-Verfahren und charakterisiert nach Inkubation in einer Medikamenten-Medien-Lösung die Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen durch ihre Infektiosität für Mäuse.

3.5.1 Der Standard-Maustest (SMT)

In dieser Arbeit wurden im Standard-Maustest trypanosomeninfizierte Mäuse mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen behandelt und anschließend 30 Tage lang mit

der HCT-Methode auf das Vorhandensein bzw. Wiedererscheinen von Parasiten im Blut untersucht.

Zunächst wurde die zu testende Trypanosomenpopulation in zwei Spendermäusen angezüchtet und vermehrt. Bei ausreichend hoher Parasitämie wurden die Trypanosomen durch Herzpunktion gewonnen und ihre Anzahl je Milliliter Blut mittels NEUBAUER-Zählkammer bestimmt. Für jede Medikamentenkonzentration wurden Mausgruppen zu je fünf Tieren (alle gleiche Alters- und Gewichtsklasse) zusammengestellt, als Kontrollgruppe dienten drei Tiere. Die Mäuse wurden mit $1-2 \times 10^5$ Trypanosomen i.p. infiziert und nach 24 Stunden mit dem Medikament in verschiedenen Konzentrationen i.p. behandelt. Dazu wurden die Tiere gewogen und entsprechend ihres Körpergewichtes dosiert. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt. Für die Referenzklone wurden Konzentrationen von 0/0,25/1/5/10/15/20 mg/kg Isometamidium verwendet. Diminazen wurde in den Konzentrationen 0/3,5/7/14/21/35 mg/kg getestet. In den folgenden 30 Tagen wurde drei- bis fünfmal wöchentlich mit der HCT-Methode auf das Auftreten von Trypanosomen im Schwanzblut untersucht. Mäuse, in denen nach dem vierten Tag p.i. bis zum Ende der Untersuchung keine Trypanosomen nachweisbar waren, galten als erfolgreich behandelt.

Anhand der erzielten Ergebnisse (und unter Berücksichtigung der Literatur) konnte in trypanozidsensitive und –resistente Referenzklone unterschieden werden. Gemäß dieser Einteilung wurden die Dosierungen für die nachfolgenden Untersuchungen der *T. congolense*-Stämme aus Burkina Faso festgelegt.

3.5.2 Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT)

Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) wurde als Kombination aus *in-vitro*- und *in-vivo*-Verfahren von KAMINSKY et al. (1990) für *T. b. brucei*, *T. b. evansi* und *T. vivax* und von SUTHERLAND et al. (1991) für *T. congolense* vorgestellt. Die Ergebnisse dieses Tests hatten gezeigt, dass bei Trypanosomen eine enge Korrelation zwischen ihrer Medikamentenempfindlichkeit und ihrer Infektiosität nach Inkubation in einem Trypanozid besteht. Sensitive Trypanosomenpopulationen konnten nach Trypanozidinkubation keine Mäuse mehr infizieren, während resistente Trypanosomenpopulationen weiterhin infektiös für Mäuse blieben. KAMINSKY et al. (1990) inkubierten die Trypanosomenpopulationen für 24h in verschiedenen Isometamidium- bzw. Diminazenkonzentrationen, während SUTHERLAND et al. (1991) nur eine 10min-Inkubation in verschiedenen Isometamidiumkonzentrationen verwendeten.

In dieser Arbeit wurde der DIIT in Anlehnung an SUTHERLAND et al. (1991) durchgeführt. Zusätzlich sollte der Test auch für Diminazen etabliert werden. Vor Versuchsbeginn wurden aus Spendertieren gewonnene Trypanosomenpopulationen mittels mAECT-Methode von den Blutzellen getrennt und in PSG mit 20prozentigem Ziegenserumanteil auf ca. $1-2 \times 10^5$ Trypanosomen pro Milliliter verdünnt. In einer 24-Lochplatte wurden die Referenzklone (1ml Trypanosomensuspension/Loch bei fünf Löchern/Medikamentenkonzentration) in den Konzentrationen 0/0,5/5/50/500 ng/ml Isometamidium und 0/0,1/0,5/1/5/10 µg/ml Diminazen für 10 Minuten bei 35°C, 5% CO₂ und 95% Luft inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkzeit (10 min) wurden die Trypanosomen in jedem Loch aufgespült, aus jedem Loch 0.5 ml Trypanosomen/Medikamenten- bzw. reine Trypanosomenlösung in je eine Maus i.p. inokuliert und diese anschließend 30 Tage lang drei bis fünfmal wöchentlich mittels HCT-Methode untersucht. Tiere, die an zwei aufeinander-folgenden Untersuchungstagen parasitologisch positiv waren, galten als infiziert.

3.5.3 Beschreibung der verwendeten Trypanozide

Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf den aktiven Wirkstoff, der in den handelsüblichen Präparaten enthalten ist.

3.5.3.1 Isometamidiumchlorid

Es wurde Isometamidiumchlorid (Samorin[®], Trypamidium[®], Rhône Mérieux, Frankreich, Chargennr. N194971A) käuflich erworben und daraus Stammlösungen hergestellt. Für den Maustest wurden Isometamidiumlösungen von 20 mg/ml angefertigt, portioniert und bei -20 °C gelagert.

Für den DIIT wurde eine Stammlösung von 2 mg/ml gefertigt, sterilfiltriert (0.2 µm) und ebenfalls in kleinen Portionen eingefroren. Lösungsmittel war Aqua bidestillata. Am Verwendungstag aufgetaut wurden über Verdünnungsreihen die für Maustest und DIIT benötigten Konzentrationen hergestellt.

3.5.3.2 Diminazenaceturat

Diminazenaceturat wurde durch das handelsübliche Präparat Berenil[®] (Hoechst AG, Deutschland, Chargennr. 299L757) kommerziell bezogen. Ein Gramm Granulat entsprachen 445 mg aktiver Substanz Diminazendiaceurat. Stammlösungen zur Behandlung von Mäusen von 35 mg/ml und für den DIIT von 1 mg/ml wurden hergestellt und bis zu ihrer Verwendung portioniert bei -20°C gelagert.