

2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

2.1 Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen in afrikanischen Rinderherden

2.1.1 Mehrfachresistente *T. congolense*-Populationen¹ in Zebu-Rindern im Viehzuchtgebiet von Samorogouan, Burkina Faso

Mitteilung 1:

Clausen, P.-H., I. Sidibe, I. Kaboré and B. Bauer (1992): Development of multiple drug resistance of *Trypanosoma congolense* in Zebu cattle under high natural tsetse fly challenge in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Acta Trop.* **51**, 229-236.

Burkina Faso gehört zu den ärmsten Ländern der Welt. Das Bruttoinlandsprodukt (BIP) je Einwohner belief sich im Jahre 1994 auf 238 US-Dollar (Statistisches Bundesamt, 1997). Der Norden des Landes liegt im Sahel, in dem aufgrund der spärlichen Niederschläge kaum Landwirtschaft und nur wenig Viehzucht möglich ist. In der südlich angrenzenden sogenannten Sudanzone sind dagegen, wenn auch teilweise nur unter schwierigen Bedingungen, sowohl Ackerbau als auch Viehzucht möglich. Im südlichen Teil von Burkina Faso, der sich in die subtropische Feuchtsavanne Westafrikas erstreckt, zeugt eine üppige Vegetation von reichhaltigen Niederschlägen und der Fruchtbarkeit des Bodens. Neben Hirse, Erdnüssen, Sesam oder Maniok wird Baumwolle angebaut. Von den Arabern eingeführt, unter französischer Kolonialherrschaft gefördert und entwickelt, stellt die Baumwolle heute in Subsahara-Afrika den erfolgreichsten Zweig der Landwirtschaft dar. Das frankophone Westafrika ist in den letzten 30 Jahren zu der Nummer 2 der Nettoexportregionen geworden. Die Exporteinnahmen aus Baumwolle belaufen sich zur Zeit auf rund 1,5 Milliarden US-Dollar jährlich (Peltzer 2005).

¹ Definition Trypanosomenpopulation: Gruppe von Trypanosomen, die zu einer bestimmten Zeit in einem bestimmten Wirt oder in einer Kultur vorhanden ist (WHO 1998).

Der harte Lateritboden wird mit Zugochsen bearbeitet; die handgepflückte Baumwolle wird mit Ochsenkarren von den Feldern zu den Sammelplätzen transportiert. Ohne diese Zuganspannung wäre ein Baumwollanbau nicht denkbar.

Die subtropische Feuchtsavanne mit jährlichen Niederschlägen von 800 bis 1500 mm ist allerdings auch bevorzugtes Habitat der Tsetsefliege. In den feuchten Galeriewäldern entlang der Flussläufe finden sich Tsetsefliegen der Palpalis-Gruppe. Die offene Buschsavanne ist besiedelt mit Tsetsefliegen der Morsitans-Gruppe. Bei den hier gehaltenen Rindern handelt es sich in den südlichen Regionen zumeist um Kreuzungsrinder (Métis) zwischen den sogenannten trypanotoleranten westafrikanischen Lang- und Kurzhornrindern (N'Dama und Baoulé) und den trypanosensiblen Sahelrindern (Zebu), mit zunehmendem Zebu-Anteil in weiter nördlich gelegenen Regionen, die jährlich mehrmals mit Trypanoziden behandelt werden.

Im Viehzuchtgebiet von *Samorogouan*, in der gleichnamigen Zentralregion von *Kéné Dougou* gelegen (siehe **Abbildung 3**), wurde von 1978 bis 1984 mit finanzieller Unterstützung der Weltbank ein Zentrum zur Intensivierung der traditionellen Viehzucht geschaffen, genannt CEZIET („Centre d'Encadrement des Zones d'Intensification de l'Élevage Traditionnel“). Auf einer Gesamtfläche von 1.400 qkm entstanden 4 Farmen mit ortsfesten Rinderbädern zur Zeckenbekämpfung („Dips“) und Behandlungsständen.

Tsetsefliegen (*Glossina palpalis gambiensis*, *G. tachinoides* und *G. morsitans submorsitans*) und damit einhergehend Infektionen mit Trypanosomen (*T. congolense* und *T. vivax*) stellten von Anbeginn ein Problem in der Entwicklung einer profitablen Rinderproduktion in dieser Region dar. Aufgrund dessen wurden die zumeist reinrassigen, anfänglich noch 9.000 Zebu-Rinder entsprechend den Angaben der Tierärzte jährlich 4 x prophylaktisch mit Isometamidiumchlorid in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht (KGW) und 2 x therapeutisch mit Diminazenaceturat (3,5 mg/kg KGW) behandelt. Aufgrund unbefriedigender Behandlungsergebnisse wurden die Dosierungen im Laufe der Jahre verdoppelt. Pinder und Authie (1984) und Authie (1984) konnten bei *T. congolense*-Stämmen², die 1982-84 aus Rindern in *Samorogouan* isoliert wurden, erste Resistenzen gegenüber Isometamidiumchlorid in Mäusen nachweisen. *T. congolense*-Stämme, die 1982-84 gewonnen worden waren, erwiesen sich gegenüber Isometamidiumchlorid 4-8 x weniger empfindlich als Stämme, die von 1979-80 stammten.

Die hier vorliegenden Untersuchungen gehen auf eine Anfrage der CEZIET-Direktion an das CRTA (Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales) in *Bobo Dioulasso* zurück, die Resistenzsituation in den durch die Nagana auf wenige Tausend Tiere reduzierten Rinderherden zu untersuchen. Im April 1989 führte das CRTA eine entomologische und epidemiologische Studie durch. Aus den zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Region noch verbliebenen Rinderherden wurden stichprobenartig 350 Tiere ausgewählt, geblutet und parasitologisch mittels der „Dark ground phase contrast buffy-coat“ Technik (BCT) (Murray et al., 1977) auf Trypanosomen untersucht. Hierbei erwiesen sich 69% der Tiere als parasitologisch positiv. Trotz mehrfacher Behandlungen aller Trypanosomen-positiver Rinder mit Diminazenaceturat in einer Dosierung von 7 (zuletzt 14) mg/kg Körpergewicht (KGW) in 2-wöchigen Behandlungsintervallen war es nicht möglich, die Trypanosomenprävalenz

² Definition Trypanosomenstamm: Eine Trypanosomenpopulation, die aus einer Anzahl von Passagen *in-vivo* und/oder *in-vitro* aus einer Erstisolierung resultiert, ohne Aussage über Homogenität oder Charakterisierung der Population (WHO 1998).

entscheidend zu erniedrigen. Zudem waren die Tiere in einem schlechten Allgemeinzustand, kachektisch und hoch anämisch. Um abzuklären, ob neben eventuellen Neuinfektionen eine Trypanozid-Resistenz für diese hohen Prävalenzen verantwortlich zu machen ist, entschloss man sich, aus den verbliebenen Herden jeweils 2 bis 3 Trypanosomen-positive Rinder (n = 20) nach *Bobo Dioulasso* in das CRTA in einen fliegensicheren Stall zu überführen und dort unter kontrollierten Bedingungen zu behandeln. Hierbei erwies sich, dass mit keinem der kommerziell erhältlichen Trypanozide in der maximal empfohlenen Dosierung (Diminazenaceturat, 7 mg/kg KGW; Homidiumbromid, 1 mg/kg KGW; Isometamidiumchlorid, 1mg/kg KGW) *T. congolense*-infizierte Rinder erfolgreich therapiert werden konnten. *T. vivax*-Infektionen, die in Einfach- oder Mischinfektionen mit *T. congolense* vorlagen, ließen sich hingegen therapieren. Da die Rinder sich zum Teil in einem sehr schlechten Allgemeinzustand befanden, wurden *T. congolense*-Primärisolate³ gewonnen und auf gesunde, gut ernährte Zebu-Rinder (n = 3) passagiert, um auszuschließen, dass der Behandlungsmisserfolg auf eine Immunsuppression zurückzuführen ist (Frommel, 1988). Auch diese experimentell infizierten Rinder konnten mit Diminazenaceturat (7 mg/kg KGW) nicht erfolgreich therapiert werden. Behandlungsversuche mit Isometamidiumchlorid in hoher Dosierung (2mg/kg KGW) und unter langsamer intravenöser Applikation, wie bei Schillinger und Kollegen (1985) zur Therapie von resistenten Trypanosomen beschrieben, wurden aufgrund der Toxizität des Wirkstoffes in dieser Dosierung abgebrochen. Therapieversuche mit Diminazenaceturat in einer Dosierung von 14 und 17,5 mg/kg KGW (i.m.), Isometamidiumchlorid (bis 2 mg/kg KGW, i.v.) und Quinapyraminsulfat (5 mg/kg KGW, s.c.) in experimentell infizierten Ziegen endeten damit, dass die Parasitämien nach einer kurzen Aparasitämie wieder aufflammten oder die Tiere aufgrund der dosisabhängigen Toxizität der Trypanozide verendeten.

³ Definition Primärisolat: Lebende Organismen in der Kultur oder im Versuchstier nach Beimpfung einer Probe oder eines Teils einer Probe von einem natürlich infizierten Wirt (WHO 1998).

Der Therapieversuch wurde abgebrochen und die Rinder nach Rücksprache mit den Tierhaltern und nach Ablauf der Wartezeiten für die applizierten Medikamente auf dem städtischen Schlachthof von *Bobo Dioulasso* verwertet.

Für die Entstehung resistenter Trypanosomenpopulationen werden die im Feld häufig beobachteten Unterdosierungen durch die Veterinäre und Tierhalter verantwortlich gemacht. CEZIET ist ein Beispiel dafür, dass auch bei sachgerechter Applikation der Trypanozide es früher oder später in Regionen mit hohem Infektionsdruck zur Medikamentenresistenz kommen wird. Nach heutigem Kenntnisstand erscheint es unverantwortlich, ein Nutzungssystem (Ranch) unter der Voraussetzung aufzubauen, dauernd Chemoprophylaxe mit Trypanoziden vornehmen zu müssen (Seifert, 1992). In Regionen mit hohem Infektionsrisiko sollte daher, wie auch nachfolgend am CEZIET erfolgreich durchgeführt (Bauer et al., 1995), eine Tsetsefliegenbekämpfung initiiert werden. Die Anwendung von Trypanoziden könnte sich dann auf einen erneuten Ausbruch beschränken. Da die Rinder weder mit Diminazenaceturat noch mit Isometamidiumchlorid oder Homidiumbromid therapiert werden konnten, muss mit dem Vorliegen von mehrfachresistenten *T. congolense*-Populationen gerechnet werden, so dass auch der lange propagierte, strategische Einsatz des „sanative pair“ (Wechsel zwischen zwei verschiedenen Wirkstoffen, z.B. Isometamidiumchlorid und Diminazenaceturat) (Whiteside, 1960) aufgrund dieser Ergebnisse einer kritischen Neubewertung bedarf.

2.1.2. Mehrfachresistente *T. congolense*-Populationen in Rinderherden von Metekel, nord-westliches Äthiopien

Mitteilung 2:

Afewerk, Y., P.-H. Clausen, G. Abebe, G. Tilahun, D. Mehlitz (2000): Multiple-drug resistant *Trypanosoma congolense* populations in village cattle of Metekel district, north-west Ethiopia. *Acta Trop.* **76**, 231-238.

Die Provinz *Metekel* liegt 550 km nord-westlich von Addis Abeba, am südlichen Ufer des Tana Sees, der Quelle des Blauen Nils (*Abay Wenz*). Es herrscht ein subtropisches Klima mit jährlichen Niederschlagsmengen von bis zu 1200 mm. Der *Beles Wenz*, ein Nebenfluss des Blauen Nils, durchströmt mit seinen zahlreichen Nebenflüssen die fruchtbaren Niederungen der Provinz. Die extreme Dürre am Anfang der 80er Jahre und damit einhergehend die verheerende Hungersnot in den dicht besiedelten Hochgebietsregionen von Gojam, Welo, Tigray und Shewa veranlasste die sozialistische Zentralregierung in Addis Abeba, ein Umsiedlungsprojekt zu initiieren. Ziel war es, die Bevölkerung aus den Dürreregionen in die fruchtbaren Niederungen überzusiedeln und durch eine Mechanisierung der Landwirtschaft diese zu intensivieren. Im Rahmen des sogenannten „Tana-Beles-Resettlement“ Projektes wurden 1984-85 ca. 82.000 Menschen einschließlich ihrer Viehherden aus den o.g. Dürregebieten in 48 Dörfer entlang des *Beles Wenz* übersiedelt (Gebre, 2002). Die überambitiöse Mechanisierung der Landwirtschaft endete in einem Fiasko, viele Menschen starben an der Malaria und ihre Rinder an der Nagana. Die Ende der 80er Jahre durchgeführten entomologischen Untersuchungen zeigten hohe Abundanzen an Tsetsefliegen (*G. tachinoides*) (Beyene, 1993). Die Rinderherden in den Dörfern waren bis zu 59% mit Trypanosomen (*T. congolense* und *T. vivax*) parasitiert, und die lokalen Tierärzte berichteten über fragliche Behandlungserfolge (Beyene, 1993).

Ziel dieser Studie war es daher, in 4 Dörfern, die gezielt aufgrund von Vorberichten über Behandlungsmisserfolge ausgewählt wurden, (a) die Rinderherden auf Trypanosomen zu untersuchen und (b) die Empfindlichkeit der Trypanosomenpopulationen gegenüber Isometamidiumchlorid in einer sogenannten kontrollierten Blockbehandlungsstudie zu bestimmen. Bei Vorliegen eines Therapieversagens sollten Trypanosomenprimärisolate gewonnen werden und in Mäusen weiter auf ihre Empfindlichkeit gegen Isometamidiumchlorid und Diminazenaceturat charakterisiert werden. Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten Anhaltspunkte für eine strategische Trypanosomosebekämpfung im Untersuchungsgebiet und darüber hinaus liefern.

Im März 1997 wurde in der Rinderpopulation der vier Dörfer eine Querschnittsuntersuchung durchgeführt. Eine Zufallsstichprobe (*random sample*) von 484 Zebu-Rindern (*Bos indicus*) wurde auf Trypanosomen untersucht. In der BCT waren 17,2% der Tiere parasitologisch positiv, 47,6% der Infektionen entfielen auf *T. congolense*. Fünfzig parasitämische Rinder wurden anschließend mit Isometamidiumchlorid (Trypamidium[®], Rhône Mérieux, Frankreich) in der prophylaktischen Dosierung von 1mg/kg KGW behandelt und daraufhin in monatlichen Abständen über 3 Monate untersucht. Bereits einen Monat nach der Behandlung zeigten 23% (6/26) der zum Zeitpunkt der Behandlung mit *T. congolense*-positiven Rinder eine erneute Parasitämie mit *T. congolense*. Während der Untersuchungszeit wurden 50% der behandelten Tiere (25/50) erneut parasitologisch positiv. Von diesen Parasitämien entfielen 80% auf *T. congolense*.

Den Angaben des Herstellers entsprechend ist bei Gabe von 0,5 bis 1 mg/kg KGW Isometamidiumchlorid in Rindern („je nach Infektionsrisiko und Medikamentenempfindlichkeit der Trypanosomen im Untersuchungsgebiet“) mit einem prophylaktischen Schutz von wenigstens 2 bis 4 Monaten zu rechnen. Aufgrund der genannten Ergebnisse bestand somit für *T. congolense*-Populationen im Untersuchungsgebiet ein begründeter

Verdacht auf eine Abnahme ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff Isometamidiumchlorid.

Zur weiteren Abklärung der Untersuchungsergebnisse wurden einen bzw. zwei Monate nach der Behandlung von den erneut parasitärischen Rindern durch Überimpfung von Vollblut auf Mäusen Primärisolate gewonnen. Nach 2 bis 4 Passagen wurden Gruppen von 6 Mäusen infiziert und 24 Stunden nach der Infektion mit Isometamidiumchlorid in den Dosierungen 0,5, 1,0, 2,0 und 4,0 mg/kg KGW oder Diminazenaceturat in den Dosierungen 3,5, 7,0, 14,0 und 28,0 mg/kg KGW intraperitoneal (i.p.) behandelt. In keiner der Behandlungsgruppen konnte eine Maus geheilt werden.

Um abzuklären, ob die beobachtete Mehrfachresistenz auf Mischpopulationen unterschiedlicher Resistenz oder auf eine Population zurückzuführen ist, wurden von einem *T. congolense*-Stamm drei Klone⁴ gewonnen und jede klonierte Population für sich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber beiden Wirkstoffen getestet. Alle drei Klone erwiesen sich wie ihre Ausgangspopulationen resistent gegenüber beiden Wirkstoffen, so dass damit berechtigt vom Vorkommen mehrfachresistenter *T. congolense*-Populationen gesprochen werden kann.

Weiterführende Untersuchungen müssen abklären, in wieweit sich diese Aussage auf die gesamte Region verallgemeinern lässt. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte Befragung ergab, dass über die Hälfte der Tierhalter ihre Rinder 4 Mal im Jahr mit Trypanoziden behandelt und die meisten der Tierhalter mit dem Inhalt eines Päckchens Berenil[®] (Diminazenaceturat, 1,05 g aktive Substanz) 2-3 ausgewachsene Rinder behandeln, was einer 2-3-fachen Unterdosierung entsprechen würde. Durch wiederholte subkurative Behandlungen mit Isometamidiumchlorid konnten Peregrine und Mitarbeiter (1997) die Resistenz einer anfänglich empfindlichen *T. congolense*-Population (Klon IL 1180) in Mäusen in 11 Monaten um den Faktor 96 steigern. Es ist daher anzunehmen, dass es in

⁴ Definition Trypanosomenklon: Eine Trypanosomenpopulation, die durch Vermehrung aus einem einzigen Trypanosom entstanden ist (WHO 1998).

Metekel aufgrund der über 20-jährigen, z.T. in subkurativer Dosierung erfolgten Anwendungen von Trypanoziden, wie für andere Organismen beschrieben (Waller, 1994), zur Selektion chemoresistenter Populationen gekommen ist.

2.1.3 Feldmethoden zur Bestimmung der Isometamidium-Resistenz von Trypanosomen bei Rindern im westlichen Äthiopien

Mitteilung 3:

Tewelde, N., G. Abebe, M. Eisler, J. McDermott, M. Greiner, Y. Afework, M. Kyule, S. Münstermann, K.-H. Zessin, P.-H. Clausen (2004): Application of field methods to assess iosmetamidium resistance of trypanosomes in cattle in western Ethiopia. *Acta Trop.* **90**, 163-170.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen beschrieben. Eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei Peregrine (1994) und Geerts und Holmes (1998). Zur Zeit wird zwischen drei Untersuchungsmethoden unterschieden: Untersuchungen in Wiederkäuern, Untersuchungen in Mäusen und *in-vitro*-Methoden. Der Vorteil der Untersuchungen in Wiederkäuern, z. B. Rindern, liegt darin begründet, dass die Untersuchungsergebnisse direkte Aussagen über die therapeutische Dosierung im Zieltier erlauben. Von Nachteil sind die langen Untersuchungszeiten (Rinder müssen zur Überprüfung des Therapieerfolgs bis zu 100 Tage nach der Behandlung beobachtet werden) und der Umstand, dass nur wenige Trypanosomenstämme in Rindern getestet werden können. Da die Untersuchungen zudem in einem fliegensicheren Stall bzw. in einer Tsetsefliegen-freien Region durchgeführt werden müssen, um Neuinfektionen zu verhindern, sind hiermit erhebliche Kosten verbunden. Ziel dieser Untersuchungen war es, eine von Eisler und Mitarbeitern (2000a) beschriebene Methode zur schnellen Bestimmung der Isometamidiumresistenz von Trypanosomen unter Feld-

bedingungen auf ihre Praktikabilität und Aussagekraft zu untersuchen. In dieser Methode werden in einer Longitudinalstudie die Zeitspannen zwischen der Behandlung und einem erneuten Nachweis des Erregers im Blut der Rinder in Behandlungs- und Kontrollgruppen bestimmt und im Rahmen einer Überlebensanalyse (*survival analysis*), ein übliches Verfahren zur Untersuchung von Zeitspannen bis zum Eintritt eines Ereignisses (Greiner, 2003), miteinander verglichen. Der Effekt der prophylaktischen Behandlung auf die verschiedenen diagnostischen Zeitspannen („Überlebenszeiten“ in der generischen Terminologie der Survival-Analyse) wird durch Darstellung der Kaplan-Meier Überlebensfunktion (Stata Corporation, 2000) bestimmt.

Die Untersuchungen sollten in einer Region mit einem relativen hohen Infektionsrisiko durchgeführt werden. Im Februar/März 2001 wurde im westlichen Äthiopien, am oberen Lauf des *Didessa Wenz* (*Abay-Didessa* Tsetsegürtel) und in den Niederungen entlang der *Birbir* und *Sore-Geba* Flüsse (*Baro-Akobo* Tsetsegürtel), eine Querschnittsuntersuchung initiiert. Insgesamt wurden in 7 Siedlungen (*settlements*) 904 Rinder in der BCT untersucht. In der Region mit der höchsten Trypanosomenprävalenz (21,3%, *Kone* settlement; überwiegend *T. congolense*-Infektionen) wurde von April bis Juni 2001, in Anlehnung an die Arbeiten von Eisler et al. (2000a), eine Longitudinalstudie durchgeführt. Aus den Rinderpopulationen der drei Dörfer in *Kone* (*Cheleleki*, *Kolu* und *Burka*) wurden aus jedem Dorf entsprechend einer Zufallsauswahl 100 Tiere selektiert, mit Ohrmarken gekennzeichnet und am Tag -14 mit Diminazenaceturat (7 mg/kg KGW) behandelt. Vierzehn Tage später (Tag 0) wurden die so markierten Tiere in jedem Dorf zufällig einer Kontroll- oder Behandlungsgruppe zugeordnet. Die drei Behandlungsgruppen wurden mit Isometamidiumchlorid in der prophylaktischen Dosierung von 1 mg/kg KGW behandelt. Alle Gruppen wurden in 14-tägigen Abständen über 84 Tage mittels der BCT auf Trypanosomen untersucht. Parasitologisch wieder positive Rinder wurden, egal zu welcher Untersuchungsgruppe sie gehörten, erneut mit Diminazenaceturat (7 mg/kg KGW) behandelt. Mittels der Survival-Analyse sollte abgeklärt

werden, ob (a) der Infektionsdruck eine Isometamidiumprophylaxe rechtfertigt, ob (b) es Anzeichen für das Vorkommen von Isometamidium-resistenten Trypanosomenpopulationen gibt und ob (c) trotz erster Anzeichen eines Vorliegens resistenter Populationen eine weitere Prophylaxe mit Isometamidium zu rechtfertigen ist. Nach Eisler et al. (2000a) ist eine Prophylaxe aufgrund der hohen Kosten, Nebenwirkungen und der Gefahr der Selektion resistenter Populationen nur zu rechtfertigen, wenn mehr als 25% der Tiere in den Kontrollgruppen nach 8 Wochen (Tag 56) parasitologisch positiv sind. Der Verdacht einer Resistenz liegt nahe, wenn innerhalb von 8 Wochen mehr als 25% der Rinder in einer Behandlungsgruppe parasitologisch positiv sind, vorausgesetzt, dass die Medikamente korrekt appliziert wurden. Trotz des Verdachts des Vorliegens von Isometamidium-resistenten Populationen ist nach Eisler et al. (2000a) eine Weiterführung der Prophylaxe zu rechtfertigen, wenn das mittlere relative Risiko (*mean hazard ratio*) zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe im Untersuchungszeitraum von 8 Wochen über einem Wert von 2 liegt.

Da 25% der Tiere in den Kontrollherden von *Kone* bereits nach 42 Tagen (*Cheleleki* und *Kolu*), bzw. 28 Tagen (*Burka*) erneut parasitärisch waren, konnte somit nachträglich die Isometamidiumprophylaxe gerechtfertigt werden. In den Behandlungsgruppen zeigten am Ende der 8. Woche 22,9% der Tiere in *Cheleleki*, 20% in *Kolu* und 36% in *Burka* eine erneute Parasitämie; somit war für *Burka* das Kriterium auf einen Resistenzverdacht gegenüber Isometamidium bestätigt. Der Wert für das mittlere relative Risiko (*mean hazard ratio*) betrug 2,75 in *Cheleleki* und 2,25 in *Kolu*. Nur in *Burka* lag der Wert unter 2 (1,25), so dass in den Rinderherden von *Burka* keine weiteren prophylaktischen Behandlungen mit Isometamidiumchlorid zu rechtfertigen sind.

Die nach Eisler et al. (2000a) gewählte Einteilung der Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen und die genannten Kriterien zur Auswertung der parasitologischen Daten erlaubten eine qualitative Bewertung des Infektionsrisikos und der Resistenzlage in den drei

untersuchten Dörfern von Kone. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die vorgeschlagenen Grenzwerte entsprechend den Umständen (Empfänglichkeit der Rinderrasse, Pathogenität der Erreger etc.) variabel zu gestalten sind.

2.1.4 Epidemiologische Untersuchungen zur Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen bei Rindern in der Provinz von Kéné Dougou, Burkina Faso

Mitteilung 4:

McDermott, J.J., T. Woitag, I. Sidibe, B. Bauer, B. Diarra, D. Ouédraogo, M. Kamuanga, A. Peregrine, M. Eisler, K.-H. Zessin, D. Mehltz, P.-H. Clausen (2003): Field studies of drug-resistant cattle trypanosomes in Kéné Dougou Province, Burkina Faso. *Acta Trop.* **86**, 93-103.

Die bisherigen Arbeiten beschränkten sich zumeist auf die Untersuchung nur weniger Trypanosomen-Primärisolate oder Stämme, die aus wenigen Rindern gewonnen wurden. Aussagen über die Verbreitung, Ausprägung, Bedeutung und eventuelle Ursachen der Chemoresistenz bei Trypanosomen in Rinderpopulationen einer bestimmten Region lassen sich aufgrund des begrenzten Untersuchungsansatzes und -materials nicht ableiten. Hierzu bedarf es einer erweiterten Methodik und eines größeren Stichprobenumfangs.

Durch finanzielle Förderung des Bundesministeriums für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ) und Kooperation von europäischen Forschungseinrichtungen (Universität von Glasgow, FU Berlin) mit afrikanischen Einrichtungen (ILRI, CIRDES, PNGT) war es möglich, unter Federführung der FU Berlin von 1998 bis 1999 eine zweijährige epidemiologische Feldstudie zur Chemoresistenz von Trypanosomen in der Provinz von *Kéné Dougou* im Südwesten von Burkina Faso durchzuführen. Für *Kéné Dougou* hatte man sich aufgrund der Beschreibungen über das Vorkommen von chemoresistenten

Trypanosomenpopulationen (Pinder und Authie, 1984; Authie 1984, **Mitteilung 1**) entschieden.

Die wichtigste Zielsetzung des Projektes war es, das Vorkommen und die Verbreitung chemoresistenter Trypanosomenpopulationen bei Rindern in der Provinz zu bestimmen und deren Einfluss auf die Tiergesundheit (Hämatokrit und Gewichtsentwicklung) zu beurteilen. Weiterhin sollten Faktoren, welche zur Entstehung chemoresistenter Trypanosomenpopulationen führen, ermittelt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu dienen, Bekämpfungsstrategien für chemoresistente Trypanosomenpopulationen bei Rindern zu optimieren.

Die epidemiologische Feldstudie und deren parasitologischen Ergebnisse sind Inhalt der **Mitteilung 4**. Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der Medikamentenempfindlichkeit der gewonnenen Feldstämme⁵ wurden in Mäusen durchgeführt und sind Inhalt der **Mitteilung 6**. Ergebnisse über den Einfluss der Infektionen auf die Tiergesundheitsparameter Körpergewicht und Hämatokrit werden in der Dissertation von Woitag (2003) beschrieben. Die Ergebnisse der sozioökonomischen Untersuchungen (Chemoresistenzentwicklung und institutionelle Faktoren) finden sich bei Ouédraogo et al. (2003). Ziel der Dissertation von Gall (2002) war es, anhand des vorliegenden Untersuchungsmaterials den Behandlungserfolg mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu überprüfen (**Mitteilung 13** und **14**).

Die Region *KénéDougou* erstreckt sich über eine Fläche von ca. 60.000 qkm. Sie bezieht neben der gleichnamigen Provinz in Burkina Faso die angrenzenden Gebiete im Osten von Mali und dem Norden der Côte d'Ivoire mit ein und liegt inmitten der südlichen Sudanzone

⁵ Definition Trypanosomenfeldstamm: Eine Trypanosomenpopulation, die aus einer Anzahl von Passagen *in-vivo* und/oder *in-vitro* aus einer Erstisolierung resultiert. Es wird angestrebt, die Zahl der Passagen so gering wie möglich zu halten, um einer künstlichen Selektion unter Passagebedingungen und damit eine mögliche Veränderung biologischer Eigenschaften der Erregerpopulation zu begegnen.

Westafrikas. Charakteristisch für diese Vegetationszone sind Feuchtsavannen mit reichem Busch- und Baumbestand, Galeriewälder entlang von Flüssen und permanent feuchte Täler oder Senken. Die Jahresniederschläge zwischen 800 mm im Norden und 1.500 mm im Süden der Region fallen nahezu ausschließlich in der Regenzeit von Mai bis Oktober. Diese Niederschlagsmenge, die fruchtbaren Böden und ein relativ dichtes hydrographisches Netz, wozu einige ganzjährig wasserführende Flüsse (*Plandi*, *Banifing* und Seitenarme aus dem *Comoé*) zählen, sind ursächlich für das landwirtschaftliche Potential der Region und ihre starke Besiedlung mit Tsetsefliegen.

Die Provinz *KénéDougou* in Burkina Faso umfasst ein Gebiet von 8.265 qkm (ca. 3% des nationalen Territoriums) und ist in vier Zonen (*N'Dorola* im Norden, *Samorogouan* im Zentrum, sowie *Koloko* und *Orodara* im Südwesten bzw. Südosten) und weiter in 13 Distrikte unterteilt. In der Provinz leben 198.936 Menschen, der Viehbestand wird auf 60.945 Rinder, 48.109 Schafe und 33.735 Ziegen geschätzt (Ouédraogo, 2002).

In einer anfänglichen Querschnittsstudie sollte die Trypanosomenprävalenz in den Rinderherden geschätzt und die vorkommenden Tsetsefliegenarten und -dichten in der Provinz bestimmt werden. Aus der Liste der Dörfer mit Rinderhaltung wurde jedes dritte Dorf (n = 45) in die Studie aufgenommen. Die Auswahl der Rinder (n = 2000) erfolgte proportional zur Anzahl der Rinder eines Dorfes (Woitag, 2003). Neben den parasitologischen Untersuchungen der Rinder fanden sozioökonomische und entomologische Erhebungen in den Dörfern bzw. auf den angrenzenden Weiden statt.

Das Ergebnis der Querschnittsstudie zeigte einen deutlichen Nord-Süd-Anstieg der Trypanosomenprävalenz in den Rinderherden. In den beiden südlichen Zonen, *Orodara* und *Koloko*, lag die Trypanosomenprävalenz mit durchschnittlich >10% deutlich höher als in der zentral gelegenen Zone von *Samorogouan* (4,3%) und der im Norden gelegenen Zone *N'Dorola* (1,4%). Infektionen mit *T. congolense* und *T. vivax* dominierten bei der mikrosko-

pischen Untersuchung, Infektionen mit *T. brucei* wurden nur selten diagnostiziert. Trypanosomen-infizierte Rinder hatten mit durchschnittlich 28,1% (KI: 27,1-29,1) signifikant niedrigere Hämatokritwerte als nicht infizierte Tiere mit 32,5% (KI: 32,3-32,7) (Woitag, 2003).

Die unterschiedlichen Prävalenzen der Zonen korrelierten gut mit den Ergebnissen aus der entomologischen Erhebung, wonach im Süden der Provinz eine höhere Tsetsefliegendichte (vornehmlich *G. palpalis gambiensis* und *G. tachinoides*) festgestellt wurde als im Norden. Während im relativ trockenen Norden des *Kéné Dougou* mit einem Jahresniederschlag von unter 800 mm die Verbreitungsgrenze der Tsetsefliege liegt, bietet ihr der niederschlagsreichere Süden ideale Lebensbedingungen. Die Befragung der Tierhalter ergab, dass bei den Rindern zur Bekämpfung der Nagana überwiegend Isometamidiumchlorid und Diminazenaceturat (mit 3-4 jährlichen Behandlungen) eingesetzt werden (Ouédraogo, 2002).

Der Querschnittsuntersuchung folgte eine sogenannte Blockbehandlungsstudie, welche eine Beurteilung der Häufigkeit von Behandlungsversagen nach einer Applikation von Isometamidiumchlorid in einer prophylaktischen Dosierung von 1 mg/kg KGW ermöglichen sollte. Basierend auf den Ergebnissen der Querschnittsstudie wurden die Zonen *Orodara* und *Koloko* aufgrund der dortigen hohen Trypanosomenprävalenzen als Untersuchungsgebiete bestimmt. Zehn Dörfer, 9 mit einer Trypanosomenprävalenz von >10%, wurden in die Blockbehandlungsstudie aufgenommen. Außer den neun südlich in den beiden Zonen gelegenen Dörfern wurde ein im Norden der Zone *Koloko* gelegenes Dorf mit niedriger Prävalenz ausgewählt. Letzteres interessierte wegen seiner in früheren Untersuchungen festgestellten Resistenzsituation (**Mitteilung 1**). Dem dortigen Nachweis chemoresistenter Trypanosomen war eine lokale Tsetsefliegenbekämpfung durch das CIRDES gefolgt (Bauer et al., 1995).

In die Blockbehandlungsstudie wurden insgesamt 726 Rinder aufgenommen. Nach der Behandlung aller Tiere wurden die Rinder vierzehntägig über einen Zeitraum von drei

Monaten mit der BCT auf Trypanosomen untersucht. Unter der Voraussetzung der vollen prophylaktischen Wirksamkeit sollte der Infektionsschutz durch die Isometamidiumbehandlung über den gesamten Untersuchungszeitraum der Studie andauern (siehe auch **Mitteilung 2**). Die während der Folgeuntersuchungen dennoch parasitologisch positiven Rinder und Rinder mit einem Hämatokritwert <25% wurden zusätzlich mit Diminazen (3,5 mg/kg KGW) behandelt. Vor der Blockbehandlung (November 1998) betrug die mittlere Trypanosomenprävalenz in den 10 Dörfern 12,4%, wobei 70% der Parasitämien auf *T. congolense* und 23% auf *T. vivax* entfielen. Die Anfangsprävalenzen in den einzelnen Dörfern variierten sehr stark mit 27,5% bzw. 26,3% in *Kotoura* und *Toussian-Bandougou*, 16% in *M'Bie*, 12,5% in *Dieri*, *Sipigui* und *Sokouraba*, 11,4% in *Samogohiri*, 5,4% in *Sokoroni*, 3,3% in *Kolokaka* und 0% in *Fama*.

Die Isometamidium-Fehlerrate, definiert als Anzahl der parasitologisch positiven Fälle vierzehn Tage nach der Isometamidiumbehandlung im Verhältnis zu den parasitologisch positiven Fällen vor der Isometamidiumbehandlung, war erheblich. Sie betrug für die Gesamtpopulation 37,7% und variierte sehr stark zwischen den Dörfern (70% in *Sokouraba*, 60% in *Dieri*, 50% in *Kotoura* und *M'Bie*, 33% in *Toussian-Bandougou* und 14% in *Sokoroni*). Von diesen Parasitämien entfielen 92,6% auf *T. congolense* und 7,4% auf *T. vivax*. Die Rinder in den Dörfern *Samogohiri*, *Sipigui* und *Kolokaka* waren am 14. Tag nach der Isometamidiumbehandlung parasitologisch negativ.

Für Diminazenaceturat kann ein Verdacht auf Therapieversagen, ebenfalls definiert als die Anzahl der parasitologisch positiven Fälle vierzehn Tage nach der Diminazenbehandlung im Verhältnis zu den parasitologisch positiven Fällen vor der Behandlung, nur in den Rinderherden von *Sokouraba* (57,1%) und *Kotoura* (9,1%) geäußert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen das Vorkommen Isometamidium-resistenter Trypanosomenpopulationen (primär *T. congolense*) in den Rinderherden der südlichen

Distrikte von *KénéDougou*. Zudem besteht ein Verdacht für das Vorliegen von Diminazeneaceturat-resistenten Populationen. Der Grad der beobachteten Medikamentenresistenz zwischen den Dörfern war hoch variabel, eine geographische Zuordnung konnte jedoch nicht getroffen werden. So liegen die Dörfer *Sokouraba*, *Dieri* und *Kotoura*, in denen eine ausgeprägte Isometamidiumresistenz nachgewiesen wurde, in unmittelbarer Nachbarschaft zu *Samogohiri*, wo aufgrund dieser Untersuchungen keine Chemoresistenz nachgewiesen werden konnte. Herden mit einer höheren anfänglichen Trypanosomenprävalenz zu Beginn der Blockbehandlungsstudie zeigten eine höhere kumulative Inzidenz an Neuinfektionen während der 3-monatigen Isometamidiumprophylaxe.

2.1.5 Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen in periurbanen

Milchrinderherden Ugandas

Mitteilung 5:

Olila, D., J.J. McDermott, M.C. Eisler, E.S. Mitema, R.J. Patzelt, P.-H. Clausen, C.J. Poetzsch, K.-H. Zessin, D. Mehlitz, A.S. Peregrine (2002): Drug sensitivity of trypanosome populations from cattle in a peri-urban dairy production system in Uganda. *Acta Trop.* **84**, 19-30.

Uganda ist ein typisches Agrarland Äquatorialafrikas. Über 80% der arbeitsfähigen Bevölkerung lebt von der Landwirtschaft. Hier werden 50% des Bruttosozialprodukts und 90% der Exporterlöse (Kaffee) erwirtschaftet (MPED, 1996). Es werden fast alle benötigten pflanzlichen Nahrungsmittel im Überschuss produziert, es fehlt aber an tierischen Produkten, besonders an Milch und Fleisch. Aufgrund der hohen Nachfrage vollzieht sich, vor allem in den periurbanen Regionen von Kampala, Entebbe und Jinja am Viktoriasee, eine Entwicklung hin zu intensiveren Milcherzeugerbetrieben. Von den ca. 4,2 Millionen Rindern Ugandas sind etwa 4% durch Einkreuzung von exotischen Milchrassen (Holstein-Friesian) genetisch

aufgewertet. Diese produzieren 16% der ugandischen Milchmenge (MAAIF, 1993). Viehseuchen sind eines der Haupthindernisse bei der Steigerung der tierischen Produktion. Neben Rinderpest, Lungenseuche, Maul- und Klauenseuche und Ostküstenfieber wird auch die Trypanosomose (Nagana) zu den bedeutungsvollsten Rinderkrankheiten in Uganda gezählt (MPED, 1996).

Auch die Schlafkrankheit, verursacht durch *T. b. rhodesiense*, ist endemisch in den Uferregionen des Viktoriasees. Das erste epidemische Auftreten der Schlafkrankheit wurde hier von 1900 bis 1910 beobachtet (Ormerod, 1961). Seitdem litt Uganda unter drei weiteren großen Epidemien. Die letzte Epidemie von 1976-1989 gipfelte 1980 in 8.465 Patienten (Mbulamberi, 1989). Ursachen waren der Zusammenbruch der Tsetsefliegenkontrollmaßnahmen in den 70er Jahren und die Ausdehnung des Habitats der Tsetsefliegen (*G. fuscipes fuscipes*) durch die zunehmende Verbuschung der ländlichen Regionen aufgrund des allgemeinen wirtschaftlichen und politischen Niedergangs in Uganda (Enyaru et al., 1993). In den 80er Jahren, mit der wiederkehrenden politischen Stabilität, wurden die Bekämpfungsmaßnahmen wieder aufgenommen. Dennoch wurde noch 1987 von 1.000 Neuerkrankungen berichtet (Smith et al., 1998). Erst die Verknüpfung von Schlafkrankheitsüberwachungsmaßnahmen mit einer Behandlung des Tierreservoirs und einer Bekämpfung der Tsetsefliegenpopulation brachte einen durchschlagenden Erfolg (Mbulamberi, 1998).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden von 1994 bis 1996 im Süd-Osten Ugandas, in *Mukono County* durchgeführt. *Mukono County* liegt 20 km östlich von Kampala und grenzt im Süden an den Viktoriasee. Wegen seiner Fruchtbarkeit mit jährlichen Niederschlägen von bis zu 1.500 mm ist das Gebiet relativ dicht besiedelt und ermöglicht eine intensive Landwirtschaft. Von besonderer Bedeutung ist auch hier die Milchviehhaltung. Aufgrund des bedeutenden landwirtschaftlichen Potentials und des Umstandes, dass sowohl die Nagana als auch die Schlafkrankheit in der Region endemisch sind und aufgrund der Marktnähe und der

damit einhergehenden ökonomisch interessanten Absatzmärkte, wurde *Mukono County* als Untersuchungsgebiet ausgewählt. In einer Langzeitstudie sollten Einflussfaktoren auf die Produktion der periurbanen Milchviehherden benannt und quantifiziert werden. Als beeinflussende Faktoren wurden Tiervariablen, Krankheitsfaktoren sowie Farm- und Managementfaktoren untersucht. Außerdem wurden Tier- und Umweltfaktoren auf ihren Einfluss auf Trypanosomen- und Helmintheninfektionen und auf die Seroprävalenz von *Theileria parva*, *Anaplasma marginale* und *Babesia bigemina* überprüft (Pöttsch, 1999). Die vorliegende Mitteilung beschränkt sich auf die Untersuchungen zur Prävalenz und Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomeninfektionen in den untersuchten Milchviehherden. Angaben zu den weiterführenden Untersuchungen finden sich in der Dissertation von Pöttsch (1999).

Zur Abschätzung der Trypanosomenprävalenz wurde im Juni 1994 im Untersuchungsgebiet von *Mukono County* eine Querschnittsuntersuchung durchgeführt. Aus der Gesamtzahl von 187 periurbanen Milchfarmen wurden 50 Farmen mittels einer proportional stratifizierten Zufallsauswahl ausgewählt. Die Stratifizierung erfolgte nach dem Herdenbestand. Auf den kleinen Farmen (1-10 Rinder) wurde jedes Tier in die Untersuchung einbezogen, auf mittleren (11-30 Rinder) und großen Farmen (mehr als 30 Rinder) jedes zweite Tier. Insgesamt wurden Blutproben von 486 Rindern genommen und mittels der Hämatokrit-Zentrifugations-Technik (HCT) und der Miniatur-Anionenaustauscher-Zentrifugationstechnik (m-AECT) auf Trypanosomen untersucht. Alle Tiere wurden nachfolgend mit Isometamidiumchlorid in einer Dosis von 1 mg/kg KGW behandelt und daraufhin über 3 Monate in monatlichen Abständen parasitologisch verfolgt. Nach der Blockbehandlung mit Isometamidium sank die Anfangsprävalenz von 18,9% am Ende der beiden Folgemonate auf unter 1% (0,4 und 0,7%), um am Ende des dritten Monats wieder auf 3,2% anzusteigen. Von den Parasitämien zu Beginn der Studie entfielen 78,2% auf *T. brucei* und 10,9% auf *T. vivax*. Bei 10,9% der Infektionen handelte es sich um Mischinfektionen mit *T. brucei* und *T. vivax*. Infektionen mit

T. congolense, den für Rinder besonders pathogenen Erreger, konnten nicht dargestellt werden. Die Fliegendichte im Untersuchungsgebiet, erhoben mit je 4 NGU-Fallen in 15 Untersuchungsmonaten, war mit 0,33 Glossinen je Falle und Tag (ausschließlich *G. f. fuscipes*) als niedrig zu werten (Pötzsch, 1999). Die Blutmahlzeiten der untersuchten Tsetsefliegen wiesen in 33,3% der Proben Rinder und in 52,3% der Fälle Reptilien (z.B. Varanidae) als Nahrungswirte aus.

Der starke Abfall der Prävalenz von 18,9% auf 0,4-3,2% in den ersten drei Monaten nach der Blockbehandlung ist ein deutliches Anzeichen dafür, dass die im Untersuchungsgebiet zirkulierenden Trypanosomenpopulationen noch empfindlich auf Isometamidium reagierten.

Die Annahme, dass die Trypanosomenpopulationen in *Mukono* zum Untersuchungszeitpunkt hoch empfindlich auf Isometamidium reagierten (Pötzsch, 1999), konnte in Folgeuntersuchungen bestätigt werden. Aus Rindern gewonnene *T. brucei*- und *T. vivax*-Primärisolate erwiesen sich in experimentellen Behandlungsstudien sowohl in Rindern als auch in Mäusen als hochempfindlich gegenüber Isometamidiumchlorid (0,5 mg/kg KGW) und Diminazenaceturat (3,5 mg/Kg KGW) (**Mitteilung 5**). Auch die von Scheer (2001) *in vitro* in Blutstromform-Kulturen adaptierten *T. brucei*-Populationen aus *Mukono* erwiesen sich als Isometamidium-empfindlich, wobei nur geringgradige Abstufungen der Sensitivität beobachtet wurden (**Mitteilung 8**).

Die Pathogenität der untersuchten *T. brucei*-Populationen aus *Mukono* erwies sich für Rinder als niedrig (**Mitteilung 5**). Nach experimenteller Infektion von naiven Boran Rindern (*Bos indicus*) kam es nur zu geringen, sporadischen Parasitämien mit leichter klinischer Symptomatik wie Müdigkeit, Nasenausfluss und Tränenfluss. Bereits einen Monat nach Infektionsbeginn waren die Rinder wieder klinisch unauffällig. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beschreibungen von anderen Autoren (Mulligan, 1970; Hoare, 1972) über den Verlauf von latenten *T. brucei*-Infektionen in Rindern. Nur in Ausnahmefällen, insbesondere

im Verlaufe von experimentellen *T. brucei*-Infektionen, kann es zu ausgeprägten klinischen Erscheinungen, zum Teil unter Beteiligung des Zentralen Nervensystems (ZNS), kommen (siehe **Mitteilung 11**).

Um abzuklären, ob die isolierten *T. brucei*-Populationen potentiell für Menschen infektiös sind, untersuchte Olila (1999) einige Primärisolate im „Blut-Inkubations-Infektiositäts-Test (BIIT)“ (Rickman und Robson, 1970). Schon am Anfang des letzten Jahrhunderts zeigte Laveran (1902), dass Mäuse, die mit *T. b. brucei* infiziert waren, durch Injektion von Humanserum geheilt werden konnten. Diese lytische Wirkung des normalen Humanserums konnten dann später York et al. (1930) auch *in-vitro* demonstrieren. Behalten nach Inkubation im Humanserum *T. brucei*-Populationen ihre Infektiosität für Labornager, so wird die Population als Humanserum-resistent bzw. potentiell infektiös für den Menschen angesehen (= BIIT-positiv). Von den 41 von Olila (1999) untersuchten *T. brucei*-Primärisolaten aus Rindern reagierten 26,8% im BIIT positiv. Auch wenn diese Ergebnisse noch einer kritischen Überprüfung bedürfen, so stehen sie doch in Einklang mit den Ergebnissen neuerer Untersuchungen über die Bedeutung der Rinder als Reservoirtiere für den Erreger der Schlafkrankheit in Ostafrika. Hatte man noch früher angenommen, dass Wildtiere, insbesondere Buschböcke (*Tragelaphus scriptus*), die bedeutendsten Reservoirwirte für *T. brucei rhodesiense* darstellen, so wird in jüngster Zeit vermehrt über die Bedeutung der Rinder als Reservoirtiere berichtet (Onyango et al., 1966; Tietjen et al., 1991; Hide et al., 1996). Molekularbiologische Untersuchungen scheinen die Bedeutung der Rinder als Tierreservoir für *T. b. rhodesiense* zu bestätigen. Mit der Identifizierung und Charakterisierung eines sogenannten Serum-Resistenz-Assoziierten (SRA)-Gens in *T. brucei rhodesiense* (De Greef et al., 1989; De Greef and Hamers, 1994) ergeben sich neue Möglichkeiten zur eindeutigen Diagnostik dieses Parasiten. In allen bisherigen Untersuchungen konnte in den aus den verschiedensten Schlafkrankheitsgebieten Ostafrikas gewonnenen und bis *dato* als *T. b. rhodesiense* klassifizierten Isolaten das SRA-Gen

dargestellt werden, während es in *T. b. brucei* und *T. b. gambiense* nicht zu amplifizieren war (Gibson et al., 2002; Radwanska et al., 2002). In allen untersuchten Human-Isolaten und Isolaten von Rindern aus Uganda, die im Human-Serum-Resistenz-Test positiv reagierten, konnten Welburn et al. (2001) das SRA-Gen nachweisen.

Vor dem Hintergrund des relativ niedrigen Infektionsrisikos mit für Rinder nur geringfügig pathogenen und zudem medikamentenempfindlichen Erregern erscheint die Trypanosomose-situation in den untersuchten Rinderbeständen im *Mukono County* aus der Sicht der Tierhalter als nur wenig problematisch. Durch eine medikamentelle Behandlung der klinisch erkrankten Rinder mit Diminazenaceturat, eventuell abwechselnd eingesetzt mit Isometamidiumchlorid im Sinne von Whiteside (1960) als „*sanative pair*“, sollte mittelfristig die Trypanosomose in den Milchviehbeständen zu kontrollieren sein. Um die Behandlungshäufigkeit zu senken und damit eine verstärkte Selektion von resistenten Mutanten zu verhindern, sollten nur die klinisch erkrankten Tiere behandelt werden. Aufgrund der Schlafkrankheitsproblematik sollten zur Überprüfung der endemischen Situation und Vorbeuge erneuter Epidemien weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung humaninfektiöser *T. brucei*-Populationen in den Rindern eingeleitet werden.

2.2 Charakterisierung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen in Mäusen und Rindern

Behandlungsversuche unter Feldbedingungen haben den Vorteil, dass Ergebnisse mit einer gewissen Annäherung auf die Gesamtpopulation der Rinder übertragbar sind, vorausgesetzt die untersuchte Stichprobe war ausreichend groß und wurde zufällig gewählt. Damit können Aussagen über den zu erwartenden Behandlungserfolg in der entsprechenden Rinderpopulation gemacht werden. Strategische Entscheidungen über den weiteren Medikamenteneinsatz lassen sich unmittelbar nach dem Versuchsende formulieren. Von Nachteil bei diesen Untersuchungen sind die erheblichen Aufwendungen an Personal und Material. Bei nicht ausreichender Vorinformation der Tierhalter über Sinn und Bedeutung der Untersuchungen kann es zu Verfälschungen infolge zusätzlicher Behandlungen durch die Tierhalter kommen. Bei Longitudinaluntersuchungen sind saisonale Änderungen im Infektionsdruck nur schwer vorher zu bestimmen. Nur bei ausreichend hohem Infektionsdruck lassen sich z.B. in Blockbehandlungsstudien Aussagen über die prophylaktische Wirkung von Isometamidiumchlorid machen. Auch sind der Einfluss von Tiervariablen (z.B. Körperkondition), sowie Farm- und Managementparameter und Umweltfaktoren auf den Therapieerfolg zu berücksichtigen. Problematisch ist auch die Bewertung der Versuchsergebnisse, wenn das untersuchende Medikament nur über eine kurze prophylaktische Wirkung verfügt, wie das Diminazenaceturat, und daher eine erneute Parasitämie nach der Behandlung nicht zwangsläufig als Therapieversagen zu beurteilen ist, sondern auch auf eine Neuinfektion zurückzuführen sein könnte.

Durch experimentelle Infektionen von Labornagern oder Wiederkäuern in Versuchstiereinrichtungen lassen sich solche Einflussfaktoren erheblich reduzieren.

2.2.1 Medikamentenempfindlichkeit von aus Rindern isolierten *T. congolense*-Stämmen in Mäusen und im „Drug Incubation Infectivity Test“

Mitteilung 6:

Knoppe, T.N., B. Bauer, J.J. McDermott, A.S. Peregrine, D. Mehlitz, P.-H. Clausen (2006): Isometamidium sensitivity of *Trypanosoma congolense* stocks from cattle in West Africa tested in mice and the drug incubation infectivity test. *Acta Trop.* **97**, 108-116.

In diesen Untersuchungen sollten *T. congolense*-Stämme aus Rindern der Provinz von *Kéné Dougou* (**Mitteilung 1** und **4**) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Isometamidiumchlorid im sogenannten „Standard-Maustest“ (Sones et al., 1988) und im „Drug Incubation Infectivity Test“ (Kaminsky et al., 1990) experimentell überprüft werden. Die genannten Testsysteme sollten zuvor mit Hilfe von anerkannten Referenzstämmen bekannter Isometamidiumempfindlichkeit auf ihre Aussagekraft validiert werden.

Im Standard-Maustest (SMT) werden Mäuse 24 Stunden nach Infektion mit dem zu untersuchenden Trypanosomenstamm mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen behandelt und anschließend über 30 Tage parasitologisch untersucht.

Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) ist eine Kombination aus einem *in-vitro*- und *in-vivo*-Verfahren. Trypanosomen werden aus parasitärischen Mäusen gewonnen und in ein verschiedene Medikamentenkonzentrationen enthaltendes Medium überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wird die Trypanosomensuspension auf Mäuse überimpft. Die Infektiosität der Trypanosomen für Mäuse ist ein Maß für die Medikamentenempfindlichkeit des betreffenden Trypanosomenstammes. Bei Konzentrationen von 1 mg/kg im SMT und 50 ng/ml im DIIT konnten die beiden Testsysteme eindeutig zwischen den Isometamidiumempfindlichen (IL 1180; IL 2642) und -resistenten (IL 3000; IL 3338) Referenzklone unterscheiden.

Insgesamt wurden 16 *T. congolense*-Stämme in beiden Testsystemen untersucht:

Der von Pinder und Authie (1984) aus einem Zebu-Rind 1982 in *Samorogouan* isolierte und von ihnen als Isometamidium-resistent beschriebene Stamm (**SA 53**) erwies sich auch in diesen Untersuchungen als resistent. Im SMT konnte keine der mit diesem Stamm infizierten Mäuse mit 1 mg/kg Isometamidium geheilt werden.

Zwei Trypanosomenstämme aus *Samorogouan* (**SA 267** und **SA 268**), die sowohl in Rindern als auch in Ziegen resistent waren (**Mitteilung 1**), zeigten dies auch bei den Ergebnissen im SMT und DIIT. Behandlungen im SMT mit bis zu 20 mg Isometamidiumchlorid pro kg konnten keine der infizierten Mäuse heilen. Im DIIT blieb die Infektiosität für Mäuse auch nach Inkubation in der höchsten Isometamidiumkonzentration (500 ng/ml) noch zu 80 bis 100% erhalten.

Aufgrund der beschriebenen Resistenzproblematik in *Samorogouan* (**Mitteilung 1**) wurde 1990 von Bauer et al. (1995) in dieser Region eine Tsetsefliegenbekämpfung initiiert, die nach 11 Monaten zu einer deutlichen Abnahme der Tsetsefliegendichte und damit zur Reduktion des Infektionsdrucks und der Trypanosomenprävalenz in den Rinderherden führte. 1998 wurden in *Samorogouan* im Rahmen des BMZ Projektes, wie beschrieben, erneut Untersuchungen von Rinderherden durchgeführt. In einer Herde von 100 Rindern wurden parasitologisch nur zwei Trypanosomen-positive Tiere gefunden, aus denen ein *T. congolense*-Primärisolat in Mäusen gewonnen werden konnte. Nach wenigen Passagen in Mäusen wurde dieser Feldstamm (**SA 95**) im SMT und DIIT auf seine Medikamentenempfindlichkeit getestet. SA 95 war sowohl im SMT als auch im DIIT resistent gegenüber Isometamidiumchlorid. Es konnte daher gezeigt werden, dass die Anfang der 90er Jahre durchgeführte Tsetsefliegenbekämpfung die Fliegendichte und damit einhergehend das Trypanosomoserisiko und die Trypanosomenprävalenz in den Rinderherden deutlich gesenkt hatte, dass aber die Trypanozidresistenz, wenn auch auf einem niedrigen

Niveau, noch nach 10 Jahren in der Region zu finden ist. Die scheinbar lange Persistenz von resistenten Trypanosomenpopulationen in Rindern deckt sich mit Berichten aus Äthiopien (Mulugeta et al., 1997; Peregrine et al., 2000).

Vier weitere der in dieser Studie im SMT und DIIT untersuchten *T. congolense*-Stämme wurden 1998 in der Querschnittsstudie aus Rindern in *Kéné Dougou* isoliert (**Mitteilung 4**) und erwiesen sich ebenfalls in beiden Testsystemen als resistent gegenüber Isometamidiumchlorid. Die weiteren acht untersuchten Stämme stammten aus der Blockbehandlungsstudie (1998-1999) (**Mitteilung 4**), die vor der Behandlung isoliert worden waren. Drei dieser Stämme wurden aus Rindern gewonnen, bei denen die Isometamidiumbehandlung scheinbar erfolgreich war, da am 14. Tag nach der Behandlung in der BCT parasitologisch keine Trypanosomen mehr dargestellt werden konnten. Es wurde deshalb angenommen, dass diese Stämme Isometamidium-sensitiv sind. Im SMT und im DIIT wurden sie jedoch eindeutig als resistent charakterisiert. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit der BCT die Infektionen in den Rindern unerkant blieben und so ein Therapieerfolg vorgetäuscht wurde. Weiterführende Untersuchungen mit der PCR konnten den Verdacht auf Vorliegen von Isometamidium-resistenten Populationen in diesen Rindern erhärten (siehe **Mitteilung 13**).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beiden untersuchten Testsysteme, der Standard-Maustest und der „Drug Incubation Infectivity Test“, zur Beurteilung der Medikamentenempfindlichkeit von *T. congolense*-Stämmen geeignet sind. Alle in dieser Arbeit untersuchten *T. congolense*-Feldstämme aus *Kéné Dougou* konnten in Bezug auf ihre Isometamidiumempfindlichkeit im SMT und im DIIT eindeutig charakterisiert werden und erwiesen sich als resistent. Es wurden vergleichbare Ergebnisse mit beiden Methoden erzielt. Der DIIT ist durch die *in-vitro*-Phase methodisch sehr aufwendig, so dass zur Überprüfung einer größeren Anzahl von *T. congolense*-Stämmen der SMT einfacher und praktikabler in der Anwendung

ist. Bis zur Einführung eines routinemäßig einsetzbaren reinen *in-vitro*-Testverfahrens erscheint der SMT für *T. congolense*-Feldstämme als der geeignetere Test zur Überprüfung der Trypanozidempfindlichkeit.

2.2.2 Standardisierte Methoden zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen in Mäusen und Rindern

Mitteilung 7:

Eisler, M.C., J. Brandt, B. Bauer, P.-H. Clausen, V. Delespaux, P.H. Holmes, A. Ilemobade, N. Machila, H. Mbwambo, J. McDermott, D. Mehlitz, G. Murilla, J.M. Ndung'u, A.S. Peregrine, I. Sidibe, L. Sinyangwe, S. Geerts (2001): Standardised tests in mice and cattle for the detection of drug resistance in tsetse-transmitted trypanosomes of African domestic cattle. *Vet. Parasitol.* **97**, 171-182.

Tests zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen werden zumeist in Mäusen oder in Wiederkäuern (Rinder oder Ziegen) durchgeführt. Auch wenn sich die in Mäusen ermittelte effektive bzw. kurative Dosis nicht direkt auf Rinder übertragen lässt (Sones et al., 1988), so sind doch gewisse Hinweise auf die zu erwartende Medikamentenempfindlichkeit bzw. Resistenz der Trypanosomen im Zieltier möglich. Da sich *T. vivax* mit Ausnahme einiger experimentell über viele Passagen adaptierter Laborstämme (Leefflang et al., 1976) im allgemeinen nicht in Labornagern über mehrere Parasitämien vermehren lässt und auch die meisten *T. congolense*-Primärisolate nicht in Mäusen wachsen (Diarra, 2001; Knoppe, 2002), werden alternativ für die Untersuchung dieser Trypanosomenarten oftmals kleine Wiederkäuer (zumeist Ziegen) oder Jungrinder eingesetzt. Der Vergleich von aus diesen Untersuchungen gewonnenen Daten wird allerdings dadurch erschwert, dass bis heute keine Standardisierung der Versuchsparemeter erfolgte. So werden die Untersuchungsergebnisse u.a. beeinflusst durch die Größe der Infektionsdosis (Sones und Holmes, 1992;

Mamman et al., 1995) und, relativ zur Infektion, den Zeitpunkt der Medikamentenapplikation (Jennings et al., 1977). Des weiteren sollten die Versuchsparameter so bestimmt werden, dass eine größere Anzahl von Stabilaten⁶ unter erträglichem Aufwand getestet werden kann, damit auch Aussagen über größere regionale Untersuchungen ermöglicht werden. Diesen Zielsetzungen stellte sich eine international besetzte Expertengruppe in einem Seminar, das vom 31. Mai bis 4. Juni 1999 am ILRI in Nairobi, Kenia, stattfand (ICPTV, 2000). Die **Mitteilung 7** ist das Ergebnis dieses Treffens. Die Veröffentlichung präsentiert Richtlinien für die Durchführung von standardisierten Untersuchungsmethoden für die *in-vivo*-Testung von Trypanosomen in Mäusen und Rindern.

Für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Feldstämmen (>50) wird zur Vereinfachung des Versuchsaufbaus ein Protokoll mit nur einer Dosierung (*single-dose mouse test*) vorgeschlagen. Pro Versuchsansatz werden zwei Gruppen (eine Behandlungs- und eine Positivkontrollgruppe) zu je sechs Mäusen gleichen Geschlechts, Alters und Gewichts zusammengestellt. Die Mäuse werden mit 10^5 Trypanosomen intraperitoneal infiziert. Eine Therapie erfolgt 24 Stunden später entweder mit 1 mg/kg Isometamidium oder 20 mg/kg Diminazen. Die Mäuse der Positivkontrollgruppe erhalten eine Injektion mit isotonischer NaCl-Lösung. Anschließend werden für 60 Tage zweimal wöchentlich einige Tropfen Schwanzblut der Mäuse im Nativpräparat mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Der Test gilt dann als auswertbar, wenn fünf von sechs der unbehandelten Mäuse aus der Positivkontrollgruppe im Verlauf der Untersuchungen parasitologisch positiv werden und aus der Behandlungsgruppe mindestens fünf Mäuse überleben, bis sie entweder parasitärisch werden oder bis zum Ablauf des Untersuchungszeitraumes von 60 Tagen. Sind nach Ablauf von 60 Tagen mindestens fünf Mäuse aus der Behandlungsgruppe geheilt (parasitologisch negativ), wird der untersuchte Trypanosomenstamm als sensitiv gegenüber dem eingesetzten

⁶ Definition Trypanosomenstabilat: Eine Probe lebend konservierter Trypanosomen, die zu einem gegebenem Zeitpunkt gewonnen wurde (WHO 1998).

Wirkstoff gewertet. Wenn weniger als 5 Mäuse geheilt sind, wird der Stamm als resistent gegenüber der eingesetzten Dosis beurteilt. Der sogenannte Einfach-Dosis-Test (*single-dose mouse test*) ermöglicht einen raschen Vergleich über die Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen aus geographisch unterschiedlichen Regionen (Eisler et al., 2001). Für eine genauere Charakterisierung der Medikamentenempfindlichkeit einzelner Stämme wurde der sogenannte Mehrfach-Dosis-Test (*multi-dose mouse test*) konzipiert.

Im Mehrfach-Dosis-Test mit 5 Behandlungsgruppen und 6 Mäusen pro Gruppe werden für Isometamidiumchlorid die Dosierungen 0,01, 0,1, 0,5, 3,0 und 20 mg/kg KGW empfohlen. Die Dosisempfehlungen für Diminazenaceturat entsprechen 1,0, 3,0, 10, 20 und 60 mg/kg KGW. Die anderen Untersuchungsparameter entsprechen dem Einfach-Dosis-Test. Basierend auf den Ergebnissen des Mehrfach-Dosis-Tests kann die Minimale Effektive Dosis (*minimal effective dose*) bzw. die Minimale Kurative Dosis (*minimal curative dose*) für den untersuchten Trypanosomenstamm berechnet werden.

Da weder der Einfach-Dosis-Test noch der Mehrfach-Dosis-Test in Mäusen eine genaue Vorhersage über die kurative Dosis im infizierten Rind erlaubt, müssen weiterhin Rinder mit dem betreffenden Trypanosomenstamm infiziert werden, um zu klären, ob das entsprechende Medikament in der angegebenen Dosierung wirksam ist. Außerdem bieten nur Wiederkäuer die Möglichkeit, *T. vivax*-Feldstämme zu untersuchen. Im vorgeschlagenen Protokoll werden aufgrund der beobachteten biologischen Variabilität des Behandlungserfolges in Rindern (Hawking, 1963; Peregrine et al., 1991; Ndoutamia et al., 1993) pro zu untersuchendem Trypanosomenstamm wenigstens drei (möglichst sechs) Tiere für jede Behandlungsgruppe empfohlen. Bevorzugt werden drei bis sechs Monate alte Jungrinder, möglichst aus der lokalen Rinderpopulation bzw. -rasse. Etwa einen Monat vor dem geplanten Versuchsbeginn sollen die Tiere in einen fliegensicheren Stall verbracht und direkt nach der Aufstallung gegen Helminthen, Trypanosomen (3,5 mg/kg Diminazen) und bakterielle Infektionen behandelt

werden. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wird zweimal wöchentlich der Hämatokrit bestimmt. Zu Versuchsbeginn wird in jedes Tier die zu testende Trypanosomenpopulation i.v. in die Jugularvene injiziert. Anschließend wird mindestens zweimal wöchentlich bei jedem Tier der Hämatokrit bestimmt und das Blut in der BCT auf Trypanosomen untersucht. Mit der ersten Parasitenwelle werden die Tiere gewogen und intramuskulär entweder mit 0,5 mg/kg Isometamidium oder 3,5 mg/kg Diminazen behandelt. Wenn in einem Überwachungszeitraum von 100 Tagen nach Behandlung die Tiere nicht mehr parasitämisch werden, gilt die Trypanosomenpopulation als sensitiv gegenüber der gewählten Therapie und Dosierung. Werden während der Beobachtungszeit Erreger parasitologisch nachgewiesen (*relapse*), erfolgt bei Gewichtskontrolle eine Behandlung mit dem jeweils anderen Medikament in der angegebenen Dosis (*sanative pair*). Eine Diminazenbehandlung sollte dabei nicht früher als 30 Tage nach einer Isometamidiumapplikation erfolgen. Lassen sich nach Ablauf weiterer 100 Untersuchungstage keine Trypanosomen im Blut darstellen, so gilt die Population als sensitiv gegenüber der letzten Behandlung. Wird eine Parasitämie sichtbar, so erfolgt noch am selben Tag eine Therapie mit Homidium (1,0 mg/kg). Zwischen einer Diminazen- und einer Homidiumbehandlung sollten ebenfalls mindestens 30 Tage liegen.

Der Einfach-Dosis-Test erlaubt eine schnelle Untersuchung einer großen Anzahl von Trypanosomenstämmen (insbesondere von *T. brucei brucei*), vergleichbar einem *Screening*-Verfahren, wie es bei größeren regionalen Untersuchungen notwendig ist. Die in diesem Test gewonnenen Ergebnisse geben den verantwortlichen Veterinärbehörden wertvolle Entscheidungshilfen zur strategischen Ausrichtung ihrer Bekämpfungsprogramme. In Regionen, in denen *T. vivax*-Infektionen im Vordergrund stehen, werden weiterhin Untersuchungen in Wiederkäuern unerlässlich sein. Bei einem bedeutenden Vorkommen von *T. congolense*-Infektionen sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass nur ca. 20% der Primärisolate in Mäusen wachsen (Diarra, 2001; Knoppe, 2002).

Letztendlich entscheiden über die Wahl der Untersuchungstechnik die zur Verfügung stehenden infrastrukturellen und finanziellen Mittel.

2.3. Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung von *in-vitro*-Verfahren zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomen

Der Fortschritt in der Kultivierung trypomastigoter Stadien (Blutstromformen) von *T. brucei* (Hirumi et al., 1977), *T. congolense* (Hirumi und Hirumi, 1984; Gray et al., 1985), *T. vivax* (Brun und Mooloo, 1982), *T. evansi* (Zweygarth et al., 1982) und die Einführung von Methoden zur zellfreien (axenischen) Kultivierung aller *T. brucei*-Subspezies (Baltz et al., 1985) ermöglichte die Einführung von *in-vitro*-Testsystemen zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit (Borowy et al., 1985; Kaminsky et al., 1989).

In-vitro-Methoden besitzen gegenüber *in-vivo*-Untersuchungen in Hinsicht auf eine Teststandardisierung den Vorteil, dass die Wirkung des Trypanozids auf den Parasiten selbst gemessen wird und Einflussfaktoren wie Medikamentenverteilung und Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit, Wirkung von Metaboliten, Einfluss des Immunsystems des Wirtes oder differenziertes Verhalten unterschiedlicher Trypanosomen in verschiedenen Wirtsspezies unbeachtet bleiben (Ali und Hassan, 1984; Kaminsky et al., 1989).

Weitere wichtige Gesichtspunkte sind geringere Kosten, die Verwendung kleinerer Substanzmengen und der geringere Bedarf an Versuchstieren.

Die *in-vitro*-Testsysteme wurden allerdings bisher mit nur wenigen, an Kulturbedingungen adaptierten Laborstämmen entwickelt und auch meist mit diesen etablierten Trypanosomenpopulationen durchgeführt. Bisher liegen wenige Arbeiten vor, in denen Trypanosomenfeldstämme kultiviert und *in-vitro* auf ihre Medikamentenempfindlichkeit getestet wurden. Des weiteren bleibt abzuklären, ob ein konsistenter Zusammenhang zwischen den *in-vivo*- und den *in-vitro*-ermittelten Testergebnissen besteht.

2.3.1 Anwendung von *in-vitro*-Methoden zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomenfeldstämmen

Mitteilung 8:

Clausen, P.-H., C. Pellmann, A. Scheer, U. Tietjen, G. Schares, B. Bauer, A.S. Peregrine and D. Mehlitz (2000): Application of *in vitro* methods for the detection of drug resistance in trypanosome field isolates. Proceedings of the Workshop on Drug delivery and resistance in the context of integrated disease management, held 31 May–4 June 1999, Nairobi, Kenya. Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors **2**, 9-12.

Arbeiten mit *T. brucei*:

Sechzehn aus Rindern isolierte *T. brucei*-Stämme aus dem Südosten Ugandas (*Mukono County*) wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Isometamidiumchlorid *in-vitro* untersucht. Ziel der Untersuchungen war es, verschiedene *in-vitro*-Systeme auf ihre Anwendbarkeit für *T. brucei*-Feldstämmen zu prüfen und mit Ergebnissen aus den *in-vivo*-Untersuchungen zu vergleichen (siehe **Mitteilung 5**). Es wurden drei Testsysteme ausgewählt, der [³H]-Hypoxanthine Incorporation Assay, der [¹⁴C]-labelled Isometamidium Uptake Test und der Long-Term *in vitro* Viability Assay.

Mit dem [³H]-Hypoxanthine Incorporation Assay (Desjardins et al., 1980; Brun und Kunz, 1989; Ross und Taylor, 1990) wird der Einbau Tritium-markierten Hypoxanthins in Trypanosomen bestimmt. In einer Präinkubationsphase werden die Parasiten verschiedenen Medikamentenverdünnungen ausgesetzt, wobei ihnen gleichzeitig das für den Purinstoffwechsel nötige Hypoxanthin entzogen wird. In der folgenden Inkubationszeit wird der Kultur radioaktiv markiertes Hypoxanthin zugesetzt. Anschließend werden die Trypanosomen mittels eines „Zellharvesters“ auf Glasfaserfilter gebracht und der Einbau im Szintillationszähler (β-Counter) gemessen.

Der [^{14}C]-labelled *Isometamidium Uptake* Test ermittelt die maximale Aufnahmekapazität von Isometamidium in Blutstromformen (Zilberstein et al., 1993). Gereinigte Blutstromformen werden mit verschiedenen Konzentrationen radioaktiv markierten Isometamidiums für kurze Zeit (30 Sekunden bis 5 Minuten) inkubiert. Die Reaktion wird durch Zentrifugation beendet und das aufgenommene Isometamidium im Szintillationszähler ermittelt (Zilberstein et al., 1993; Wilkes et al., 1995). Für *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* (Frommel und Balber, 1987) und *T. congolense* (Sutherland et al., 1991a; Mulugeta et al., 1997; Wilkes et al., 1995) wurde ein Zusammenhang zwischen reduzierter Medikamentenakkumulation und Chemoresistenz beobachtet.

Beim *Long-term in vitro Viability Assay* (Kaminsky et al., 1989, 1993; Zweygarth et al., 1991) wird über einen Zeitraum von 10 Tagen die Lebensfähigkeit der trypomastigoten Trypanosomen auf Fibroblasten-Zellkulturen unter dem Einfluss der jeweiligen Medikamente untersucht. Täglich werden Anzahl, Beweglichkeit, Aussehen und Form der Parasiten mikroskopisch kontrolliert, und nach 10 Tagen werden Wachstum und Morphologie bewertet.

Ergebnisse:

Mit dem [^3H]-*Hypoxanthine Incorporation Assay* konnten die resistenten und sensitiven Referenzstämme bekannter Isometamidiumempfindlichkeit nicht unterschieden werden. Die 24-stündige Inkubation scheint für Isometamidium zur Entfaltung seiner vollen trypanoziden Aktivität unzureichend. Eine Verlängerung der Inkubationsperiode könnte nur mit axenisch wachsenden Populationen erreicht werden. Die Adaptation der Feldstämme an zellfreie Kulturbedingungen war allerdings nicht erfolgreich.

Der [^{14}C]-labelled *Isometamidium Uptake Test* zeigte Korrelationen zwischen der Höhe der Isometamidiumakkumulation und dem Grad der Medikamentenempfindlichkeit der Referenzstämme. Allerdings war eine eindeutige Charakterisierung der Feldstämme mit diesem Test nicht möglich. Im Gegensatz zu *T. congolense* scheint es für *T. brucei* keine

übereinstimmende Beziehung zwischen der maximalen Aufnahmekapazität von Isometamidium und der Medikamentenempfindlichkeit der *T. brucei*-Feldstämme zu geben.

Der *Long-Term in vitro Viability Assay* ermöglichte schließlich eine eindeutige Abgrenzung der resistenten von den sensitiven Referenzstämmen. Die untersuchten Feldstämme erwiesen sich wie zuvor in den *in vivo*-Untersuchungen (siehe **Mitteilung 5**) als Isometamidiumempfindlich, wobei geringgradige Abstufungen der Sensitivität beobachtet wurden. Der *Long-Term in vitro Viability Assay* kann daher zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von *T. brucei*-Feldstämmen empfohlen werden.

Arbeiten mit *Trypanosma congolense*:

Wie beschrieben, ist *T. congolense* neben *T. vivax* der wirtschaftlich bedeutendere Nagana-Erreger für Rinder. Über eine Abnahme der Medikamentenempfindlichkeit wurde insbesondere bei *T. congolense* berichtet (Pinder und Authie, 1984; Clausen et al., 1992a; Codjia et al., 1993). Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um *in-vivo*-Untersuchungen, da sich die Kultivierung von *T. congolense* weitaus schwieriger gestaltet als die von *T. brucei*-Feldstämmen. Eine Etablierung von Blutstromform-Kulturen direkt aus natürlich infizierten Wirtstieren (Primärisolate) ist bis heute in der Literatur nicht beschrieben (Gray und Peregrine, 1993).

Ziel der Untersuchungen war es daher, (a) Blutstromformen von Feldstämmen aus experimentell infizierten Mäusen in nährzellhaltigen Kultursystemen zu etablieren, (b) *in-vitro* über eine Kultivierung von Insektenformen (prozyklische Formen) Blutstromform-Kulturen zu initiieren, und (c) über „*in-vivo*-derived“ metazyklische Formen (d.h. Gewinnung metazyklischer Formen aus der Tsetsefliege) Blutstromform-Kulturen zu etablieren.

Ergebnisse:

(a) Direktkultivierung von Blutstromformen aus experimentell infizierten Labornagern:

Bemühungen, Blutstromform-Kulturen von 9 Feldstämmen aus Burkina Faso, Liberia und Tansania in nährzellhaltigen Kultursystemen zu etablieren (*bovine endothelial-cell monolayers*, Iscove's Modifizierte Dulbecco's Medium, Zugabe von Pferde- oder Ziegen-serum) führten zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Die Überlebenszeit der Trypanosomen betrug im allgemeinen 6-8 Tage, mit Ausnahme eines Stammes aus Liberia (MSUS/LR/86/DO 27), der noch nach 80-tägiger Kultivierung infektiös für Labornager war, was einen Hinweis auf ein Vorliegen von Blutstromform-Kulturen lieferte.

(b) Initiierung von Blutstromform-Kulturen aus prozyklischen Kulturen:

Zur Gewinnung und Kultivierung von metazyklischen Formen ist es notwendig, den gesamten Entwicklungszyklus der Trypanosomen in der Tsetsefliege *in-vitro* nachzuvollziehen. Labornager wurden infiziert, Blutstromformen gewonnen und mittels verschiedener Medien und Zusätze (MEM, 2mM Glutamin, 20% FBS; MEM, 2mM Glutamin, 10mM Prolin, 20% FBS; CMP, 20% FBS) bei 28°C axenisch, also ohne Nährzellen, in prozyklische Formen (Darmformen) überführt. Durch Zugabe von 3mM Zitronen- und 3mM Aconitsäure konnte die Transformation gesteigert werden. Von den untersuchten Trypanosomenstämmen (7 aus Burkina Faso, 2 aus Liberia, 1 aus Tansania) bildete nur ein Stamm aus Burkina Faso (MBOI/BK/86/Sa 268 CRTA) nach 27 Tagen spontan einen epimastigoten Parasitenrasen. Auf Mäuse überimpft, konnten in den Kulturen infektiöse Trypanosomen nachgewiesen werden. Versuche, aus diesen Kulturen permanente Blutstromform-Kulturen zu entwickeln, schlugen jedoch fehl.

(c) Etablierung von Blutstromform-Kulturen aus metazyklischen Trypanosomen:

Blutstromform-Kulturen lassen sich mit metazyklischen Trypanosomen, isoliert aus den Mundwerkzeugen infektiöser Tsetsefliegen, initiieren. Glossinen (*G. morsitans*

submorsitans) wurde eine infektiöse Blutmahlzeit auf experimentell infizierten *Mastomys coucha* (Afrikanische Vielzitzen-Maus) angeboten. Danach wurde den Fliegen im 2-Tage-Rhythmus Rinderblut unter einer Silikonmembran zur Lebenserhaltung angeboten. Nach ca. 14-17 Tagen wurden die Fliegen seziiert und die Mundwerkzeuge (Labrum, Hypopharynx) in Iscove's Modifizierte Dulbecco's Medium (IMDM) überführt. Aus 4 gefundenen Proboscis-Infektionen von Epimastigoten und Metazyklischen konnten jedoch keine *in-vitro* Kulturen entwickelt werden.

Aufgrund des ungelösten Problems der *in-vitro*-Kultivierung von *T. congolense*-Feldstämmen wurde ein xenodiagnostisches Verfahren entwickelt (**Mitteilung 9**).

2.3.2. Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von *T. congolense* im „Drug Incubation Glossina Infectivity Test“ (Xenodiagnose)

Mitteilung 9:

Clausen, P.-H., F.H. Leendertz, A. Blankenburg, U. Tietjen, D. Mehlitz, I. Sidibe, B. Bauer (1999): A drug incubation glossina infectivity test (DIGIT) to assess the susceptibility of *Trypanosoma congolense* bloodstream forms to trypanocidal drugs (Xenodiagnosis). *Acta Trop.* **72**, 111-117.

Der DIGIT wurde in Anlehnung an den „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) (Kaminsky et al., 1990) entwickelt. Der DIIT ist eine Kombination aus einem *in-vitro*- und einem *in-vivo*-Verfahren (siehe auch **Mitteilung 6**). Man untersucht die Infektiosität der Parasiten für Mäuse nach ihrer Inkubation in einem Trypanozid. Dazu werden Trypanosomen aus parasitärischen Mäusen gewonnen und in ein Nährmedium unter Medikamentenzusatz überführt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit inokuliert man die Trypanosomen in Mäuse. Anschließend werden die Mäuse über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen kontrolliert und das Auftreten von Parasitämien in Abhängigkeit von der Medikamentenkonzentration festgestellt. Die Ergeb-

nisse zeigten, dass bei Trypanosomen eine enge Korrelation zwischen ihrer Medikamentenempfindlichkeit und ihrer Infektiosität nach Inkubation in einem Trypanozid besteht. Medikamentenempfindliche Trypanosomenpopulationen konnten nach Trypanozidinkubation keine Mäuse mehr infizieren, während resistente Trypanosomenpopulationen weiterhin infektiös für Mäuse blieben.

Im DIGIT wurden die Mäuse durch Tsetsefliegen (Glossinen) ersetzt (**Mitteilung 9**). Die zu untersuchenden Trypanosomenpopulationen wurden für 30 Minuten oder 12 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Trypanozids (Diminazenaceturat oder Isometamidiumchlorid) bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Membran an Tsetsefliegen (*G. m. submorsitans*) verfüttert. Die dosisabhängige Reduktion der Infektiosität für Tsetsefliegen ist ein Maß für die Trypanozidempfindlichkeit der untersuchten Trypanosomenpopulationen. Diminazen- und Isometamidium-resistente *T. congolense*-Stämme konnten eindeutig von empfindlichen Stämmen unterschieden werden.

Bisher wurden nur Untersuchungen mit Referenzpopulationen bekannter Medikamentenempfindlichkeit durchgeführt. Untersuchungen mit Feldstämmen stehen noch aus. Sollten sich die vorläufigen Ergebnisse bestätigen, so wäre eine kostengünstige Alternative zu Tierversuchen in Säugetieren gefunden.

2.4. Überprüfung des Therapieerfolgs bei Trypanosomeninfektionen in Rindern mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die sensitive und spezifische Diagnostik von Trypanosomeninfektionen ist neben der Indikation für eine Behandlung eine Voraussetzung für die Beurteilung des Erfolgs von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen bei Mensch und Tier.

In Nativpräparaten und in gefärbten Blutaussstrichen gelingt der mikroskopische Nachweis nur bei hohen Erregerkonzentrationen von mindestens 10^4 Trypanosomen/ml Blut (WHO, 1986). Dadurch ist die Nachweismöglichkeit auf Wirtstiere mit hochgradiger Parasitämie beschränkt. Die in Endemiegebieten überwiegend vorkommenden chronischen Infektionen gehen jedoch mit allgemein niedrigen Parasitämien in den Wirtstieren einher. Mit der Entwicklung von Anreicherungsverfahren für Trypanosomen konnte der parasitologische Nachweis verbessert werden:

Die Hämatokrit-Zentrifugationstechnik (HCT) ist ein von Woo (1970) entwickeltes Anreicherungsverfahren, das später von Walker (1972) verbessert wurde. Das zu untersuchende Blut wird dabei in zu einem Drittel mit Walker-Lösung gefüllte Hämatokritkapillaren aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Dabei findet eine Anreicherung der Parasiten an der Grenze zwischen Plasma- und Blutzellsäule am oberen Rand der Leukozytenschicht („buffy-coat“) statt. In diesem Bereich werden die Kapillaren unter dem Mikroskop nach Trypanosomen durchmustert. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine im Vergleich zum Nativpräparat sensitivere Diagnose von Trypanosomen im Blut, wobei die Nachweisgrenze bei ca. 5×10^2 Trypanosomen/ml Blut liegt (Paris et al., 1982).

Bei der sogenannten „buffy-coat“ Technik nach Murray et al. (1977) werden die Trypanosomen wie bei der HCT durch Zentrifugation des Blutes in Hämatokritkapillaren am oberen Rand der Leukozytenschicht konzentriert. Im Gegensatz zur HCT werden die Kapillaren im

Anschluss an die Zentrifugation etwa 1 mm unterhalb der Leukozytenschicht im oberen Bereich der Erythrozytensäule mit einem Diamantschreiber angeritzt, aufgebrochen und der gesamte „buffy-coat“ inklusive Teile des Plasmas auf einen Objektträger gebracht. Nach dem Vermischen des „buffy-coat“ mit dem Plasma und dem Abdecken des Präparates mit einem Deckgläschen wird es im Dunkelfeld mikroskopisch untersucht. Murray et al. (1977) fanden mit dieser Methode, vergleichsweise zum dicken Blutfilm, 50% mehr positive Fälle. Aufgrund der guten mikroskopischen Beurteilungsmöglichkeit der Morphologie und Motilität der Trypanosomen kann die Speziesdiagnostik mit relativ hoher Genauigkeit durchgeführt werden.

Die Miniatur-Anionenaustauscher-Zentrifugations-Technik (m-AECT) wurde von Lanham und Godfrey (1970) entwickelt und später mehrfach modifiziert (Mehlitz, 1978; Lumsden et al., 1979). Das Prinzip der Technik basiert auf der Trennung der Trypanosomen von den korpuskulären Blutbestandteilen aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladungen mit Hilfe einer Anionenaustauschsäule. Aufgrund ihrer guten Eignung zur Diagnose von *T. brucei*-Infektionen wird die Methode insbesondere zum Nachweis der menschlichen Schlafkrankheit angewendet. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 Trypanosomen/ml Blut (WHO, 1986).

Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Techniken eröffnete seit den 80er Jahren neue Wege bei der Identifizierung und Charakterisierung von Trypanosomen. Mittels DNA-Sonden wurde eine exakte Speziesdiagnostik - bei *T. congolense* bis zur Ebene von Subtypen – möglich. Auf diese Weise konnte erstmalig auch eine exakte Speziesdifferenzierung der Trypanosomen bei Untersuchungsmaterial aus infizierten Tsetsefliegen stattfinden (Kukla et al., 1987; Gibson et al., 1988; McNamara et al., 1989). Vorteilhaft ist die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben gleichzeitig analysieren zu können.

Die Früherkennung von Trypanosomeninfektionen wurde durch die PCR aufgrund ihrer höheren analytischen Sensitivität weiter verbessert. Bei der PCR (Mullis and Faloona, 1987) werden bestimmte DNA-Fragmente von üblicherweise ca. 100 - 400 bp mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern und einer thermostabilen DNA- Polymerase (Saiki et al., 1988) *in-vitro* amplifiziert. Die Primer, welche aus einer definierten Sequenz von ca. 20 - 40 bp Länge bestehen, binden spezifisch an ihre komplementäre Sequenz an der Ziel-DNA. Sie bilden jeweils den Ausgangspunkt für die Verlängerung des DNA-Fragmentes durch die Polymerase. Die Fähigkeit zur exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten gesuchten DNA-Sequenz macht die PCR zu einer besonders sensitiven und spezifischen, diagnostischen Methode.

Bislang wurden spezifische Primerpaare für den Nachweis der Trypanosomen der *Trypanozoon*-Gruppe (Moser et al., 1989) sowie für *T. vivax* (Masake et al. 1997; Clausen et al., 1998), *T. simiae* (Majiwa et al., 1993), *T. congolense*-savannah (Moser et al., 1989), *T. congolense*-forest (Masiga et al., 1992), *T. congolense* Kilifi (Masiga et al., 1992), *T. congolense* Tsavo (Majiwa et al., 1993) und *T. godfreyi* (Masiga et al., 1996) entwickelt. Innerhalb der *Nannomonas*-Gruppe können drei anerkannte Spezies (*T. simiae*, *T. congolense* und *T. godfreyi*) mit unterschiedlichen spezifischen Primern differenziert werden. Bei *T. congolense* selbst ist die Unterscheidung von bislang vier Subtypen (savannah, forest, Kenya coast/Kilifi und Tsavo) möglich bzw. diagnostisch erforderlich.

2.4.1 Einsatz der PCR zum spezifischen und sensitiven Nachweis von Trypanosomen in Milchrinderherden im Umland von Kampala, Uganda

Mitteilung 10:

Clausen, P.-H., A. Wiemann, R. Patzelt, D. Kakaire, C. Poetzsch, A. Peregrine, and D. Mehlitz (1998): Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. Ann. N. Y. Acad. Sci. **849**, 21-31.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die analytische Sensitivität und Spezifität der PCR im Vergleich zu parasitologischen Untersuchungstechniken (HCT und m-AECT) für den Nachweis von Trypanosomen in Rindern zu bewerten. Zur Abschätzung der Trypanosomenprävalenz wurde im Juni 1994 im Untersuchungsgebiet von *Mukono County* (Uganda) eine Querschnittsuntersuchung durchgeführt (siehe **Mitteilung 5**). Aus der Gesamtzahl von 187 periurbanen Milchfarmen wurden 50 Farmen mittels einer proportional stratifizierten Zufallsauswahl ausgewählt. Insgesamt wurden Blutproben von 486 Rindern genommen und auf Trypanosomen in der HCT und m-AECT vor Ort untersucht. Von diesen Blutproben wurde eine Zufallsstichprobe von 181 Proben in der PCR mit spezifischen Primern auf *T.* (Trypanozoon) *brucei* (Moser et al., 1989; Artama et al., 1992), *T. congolense*-„savannah“ (Majiwa et al., 1994) und *T. vivax* (Clausen et al., 1998) untersucht. Zur Erhöhung der analytischen Sensitivität wurden die Amplifikationsprodukte von *T. vivax* auf Nylonmembranen übertragen und mit einer spezifischen DNA-Sonde hybridisiert (Clausen et al., 1998). Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem ECL[®] „Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System“ (Amersham, UK) auf der Basis der Chemolumineszenz.

Von den 181 untersuchten Proben waren 18 (9,9%) in der HCT, 34 (19%) in der m-AECT und 63 (34,8%) in der PCR Test-positiv. Damit erhöhte sich die Detektionsrate unter Einsatz der PCR im Verhältnis zur HCT um den Faktor >3 und im Vergleich zur m-AECT um ca. 1,8.

Eine Verdreifachung der Detektionsrate durch die PCR, im Verhältnis zur parasitologischen Standardmethode im Feld (HCT), kommt dem Infektionsstatus der Tiere sicher wesentlich näher. Lange strittig war, ob ein positives PCR-Signal auf lebende Trypanosomen oder nur auf „tote“ (nackte/freie), in der Blutzirkulation befindliche Parasiten-DNA zurückzuführen ist. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass 3-4 Tage nach einer erfolgreichen Behandlung experimentell mit *T. brucei* infizierter Rinder (Clausen et al., 1999) bzw. 1-2 Tage nach einer Behandlung von *T. congolense*- und *T. vivax*- Infektionen in Schafen (Bengaly et al., 2001) keine Parasiten-DNA mehr zu amplifizieren war. Es wird vermutet, dass es infolge der Medikamentenwirkung zu einer Lysis des Parasiten kommt und damit zu einer Freisetzung der Parasiten-DNA, die durch enzymatischen Abbau in kurzer Zeit soweit degradiert, dass eine Amplifikation derselben nicht mehr möglich ist. Es ist daher anzunehmen, dass bei einem positiven PCR-Ergebnis eine aktive Infektion vorliegt bzw. noch vor wenigen Tagen vorgelegen hat (Desquesnes und Dávila, 2002).

Vorausgesetzt, dass eine Kontamination mit Parasiten-DNA während des Untersuchungsprozesses nicht stattgefunden hat (es wurde eine ausreichende Zahl von Negativkontrollen in jedem Untersuchungsschritt eingebaut), ist in der Stichprobe aus den Milchviehherden von *Mukono* von einer Verdopplung bzw. Verdreifachung der Infektionsrate auszugehen. Auch hier handelt es sich um einen Schätzwert; der wirkliche Infektionsstatus der Tiere kann aufgrund sehr niedriger Parasitämien und einer möglichen Besiedlung extravaskulärer Räume durch den Parasiten, wie für *T. brucei* (Jennings et al., 1979) und *T. vivax* (Whitelaw et al., 1985) beschrieben, im Verborgenen bleiben. Die PCR ermöglicht jedoch im Vergleich zu den direkten parasitologischen Nachweismethoden eine verbesserte Annäherung an den Infektionsstatus (siehe auch **Mitteilung 11**).

In Bezug auf die analytische Spezifität ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Test-positiven Proben in der PCR und der HCT, sowohl in Hinsicht auf den Nachweis von

T. brucei- als auch von *T. vivax*- Infektionen. Mit der m-AECT konnten nur wenige *T. vivax*- Infektionen dargestellt werden; sie sollte daher, wie bereits beschrieben, primär zum Nachweis von *T. brucei*-Infektionen Anwendung finden.

T. congolense-Infektionen konnten weder mit den direkten parasitologischen Techniken noch mit der PCR im Untersuchungsgebiet nachgewiesen werden und scheinen daher in den Milchviehherden von *Mukono County* nicht vorzukommen.

2.4.2 PCR und DNA-Sondenhybridisierung zur Überprüfung des Therapieerfolgs nach Verabreichung von Diminazenaceturat bei experimentell mit *T. brucei* infizierten Rindern

Mitteilung 11:

Clausen, P.-H., C. Waiswa, E. Katunguka-Rwakishaya, G. Schares, S. Steuber, D. Mehlitz (1999): Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitol. Res.* **85**, 206-211.

Chronische Infektionen mit *Trypanosoma* spp. der Untergattung Trypanozoon verhalten sich oft refraktär auf ein Medikament in einer Dosierung, die im akuten Stadium der Erkrankung zur Therapie führen würde (Whitelaw et al., 1985). Es wurde berichtet, dass die Parasiten sich in chronischen Infektionen in sogenannte privilegierte (geschützte) Räume zurückziehen, z.B. in den *Liquor cerebrospinalis* von Mäusen (Jennings et al., 1977, 1979), Ziegen (Whitelaw, 1985), Rindern (Masake et al., 1984), Kamelen (Clausen et al., 1992b) und Pferden (Schönefeld, 1979), in denen nach einer trypanoziden Behandlung aufgrund der Blut-Hirnschranke kein ausreichend hoher Wirkspiegel erreicht wird. Nach Abfall des Wirkspiegels im Blutplasma kommt es dann zu einer erneuten Parasitämie. Die hohe

Nachweisempfindlichkeit der PCR sollte frühzeitige Aussagen über die Prognose des therapeutischen Erfolgs von Behandlungsmaßnahmen bei Infektionen mit *Trypanosoma* spp. der Untergattung Trypanozoon ermöglichen.

Vier von acht Ankole Langhornrindern, experimentell mit einem Trypanozid-empfindlichen *T. brucei*-Stamm aus Uganda infiziert, wurden mit Diminazenaceturat in einer Dosierung von 7 mg/kg KGW am 71. Tag der Infektion behandelt (Waiswa, 1996). Die Untersuchungen wurden in einem fliegensicheren Stall an der Makerere Universität von Uganda durchgeführt, so dass Neuinfektionen durch infizierte Tsetsefliegen den Versuchsablauf nicht gefährden konnten. In den Blutproben der infizierten Rinder konnte bereits am ersten Tag nach der Infektion mit den für Trypanozoon spezifischen Primern (Moser et al., 1989) PCR-Produkte nachgewiesen werden. Ein direkter parasitologischer Nachweis mit der HCT und der m-AECT konnte erst am 5. Tag der Infektion geführt werden. Mit Ausnahme eines Untersuchungstages war die PCR bis zum Behandlungstag durchgängig positiv, obwohl aufgrund der Untersuchungen mit der HCT und m-AECT aparasitämische Phasen beobachtet wurden. Am 3. bzw. am 4. Tag nach der Behandlung konnten in zwei Tieren (T2 und T3), die fortan eine klinische Erholung zeigten, mit Ausnahme eines Untersuchungstages (Tag 105) keine PCR-Amplifikate mehr nachgewiesen werden. In zwei Rindern, deren Allgemeinzustand sich trotz der Behandlung nicht verbesserte, die beide zum Ende des Versuchs eine ausgeprägte ZNS Symptomatik zeigten und verendeten, konnten in einem Tier (T4) fast durchgängig, in dem anderen Rind (T1) sporadisch, spezifische PCR-Produkte nachgewiesen werden. Eine weitere Verstärkung der PCR-Signale ermöglichte eine anschließende DNA-Sondenhybridisierung.

Die PCR, insbesondere in Verbindung mit einer Sondenhybridisierung, könnte einen erheblichen Fortschritt in der prognostischen Bewertung von Behandlungsversuchen bieten, insbesondere bei chronischen Infektionen mit Trypanozoon, wo mit extravaskulären

(kryptischen) Infektionen gerechnet werden muss. Insbesondere bei der Versorgung von Schlafkrankheitspatienten könnte die PCR wertvolle prognostische Hinweise liefern und so häufige Lumbalpunktionen ersetzen.

2.4.3 PCR und DNA-Sondenhybridisierung zur Überprüfung der Wirksamkeit einer therapeutischen und prophylaktischen Isometamidiumbehandlung bei Trypanosomeninfektionen in Milchrinderherden im Umland von Kampala, Uganda

Mitteilung 12:

Clausen, P.-H., G. Schares, R.J. Patzelt, C.J. Poetsch, A. Scheer, D. Kakaire, D. Olila, A.S. Peregrine, J. McDermott and D. Mehlitz (2001): PCR and DNA-probe hybridization to assess the efficacy of therapeutic and prophylactic isometamidium treatment in *Trypanosoma* spp.- infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. Proceedings of the 25th International Council for Trypanosomosis Research and Control (ISCTRC) Meeting. Mombasa, Kenya, 27th September – 1st October 1999. OAU/STRC, Publication No. **120**, 429-434.

Der mögliche diagnostische Einsatz der PCR zur Überprüfung eines therapeutischen bzw. prophylaktischen Behandlungserfolges bei Trypanosomeninfektionen sollte anhand der in *Mukono County* (Uganda) in den Milchrinderherden durchgeführten Studie (siehe **Mitteilung 5**) untersucht werden.

Alle 486 Rinder der Stichprobe wurden mit Isometamidiumchlorid in der prophylaktischen Dosierung von 1 mg/kg KGW behandelt und in den ersten 3 Monaten nach der Behandlung in monatlichen Abständen untersucht. Wie beschrieben, sank nach der Behandlung mit Isometamidium die Anfangsprävalenz von 18,9% auf 0,4, 0,7 und 3,2% zum Ende des ersten bzw. zweiten und dritten Folgemonats. Von den Parasitämien zu Beginn der Studie entfielen

78,2% auf *T. brucei* und 10,9% auf *T. vivax*. Bei 10,9% der Infektionen handelte es sich um Mischinfektionen (*T. brucei* und *T. vivax*). Infektionen mit *T. congolense* konnten parasitologisch nicht dargestellt werden.

In der PCR wurden alle parasitologisch positiven Proben (n = 4) und eine Stichprobe (n = 134) aus dem Probenpool der aparasitämischen Rinder am Ende des ersten und des zweiten Monats nach der Behandlung untersucht. In der PCR wurden spezifische Primer für *T. (Trypanozoon) brucei* (Moser et al., 1989; Artama et al., 1992), *T. congolense*-savannah (Majiwa et al., 1994) und *T. vivax* (Clausen et al., 1998) eingesetzt. Zur Erhöhung der analytischen Sensitivität wurden die PCR-Proben nach der Amplifikation auf Nylonmembranen übertragen und mit spezifischen DNA-Sonden für *T. vivax* und *T. brucei* hybridisiert. Während die Proben der parasitologisch positiven Rinder ein deutliches Hybridisierungssignal zeigten, konnte in den aparasitämischen Proben kein Nachweis auf Trypanosomen-spezifische DNA geführt werden. Deutliche Hybridisierungssignale waren erst in den Proben zu erkennen, die am Ende des dritten Monats nach der prophylaktischen Isometamidiumbehandlung genommen worden waren. Somit konnte die Beobachtung von Pötzsch (1999), dass die Trypanosomen in den Milchrinderherden von *Mukono* zum Untersuchungszeitpunkt empfindlich auf Isometamidiumchlorid reagierten, sowohl durch die umfassenden parasitologischen Folgeuntersuchungen (**Mitteilung 5** und **8**) als auch mittels der PCR belegt werden.

2.4.4 Die PCR zur Erkennung von Therapieversagen bei Trypanosomeninfektionen in Rinderherden

Mitteilung 13:

Gall, Y., T. Woitag, B. Bauer, I. Sidibe, J. McDermott, D. Mehltz, P.-H. Clausen (2004): Trypanocidal failure suggested by PCR results in cattle field samples. *Acta Trop.* **92**, 7-16.

In dieser Arbeit sollte die Eignung der PCR zur Überprüfung des therapeutischen und prophylaktischen Behandlungserfolges von Trypanosomeninfektionen in Rinderherden im Süden der Provinz von *Kéné Dougou*, Burkina Faso, untersucht werden.

In 10 Dörfern wurden Blutproben von 738 Rindern vor und 14 und 28 Tage nach kontrollierter Isometamidium- bzw. Diminazenbehandlung parasitologisch in der BCT auf Trypanosomen untersucht (siehe **Mitteilung 4**). Vergleichend zur BCT wurden in der PCR alle BCT-positiven Proben (n = 90) und eine entsprechend große Stichprobe (90) aus dem Pool der BCT-negativen Proben analysiert. Hierbei erwies sich die PCR als der empfindlichere Test, sowohl im Nachweis von Trypanosomeninfektionen vor der Behandlung, als auch von persistierenden Infektionen bei Rindern dieser Stichprobe nach der Isometamidium- bzw. Diminazenbehandlung.

Jede PCR-Probe wurde mit den Primerpaaren zum spezifischen Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense-savannah* analysiert. Dabei wurden 92,2% (83/90) der BCT-positiven Rinder mit der PCR bestätigt. Bei der zusätzlichen Analyse der nicht identifizierten Proben mit dem Primerpaar für *T. congolense-forest* reagierten zwei positiv. Die Identifikationsrate der BCT-positiven Rinder mit der PCR stieg dadurch auf 94,4%. Die BCT-negativen Rinder waren zu 37,8% (34/90) mit der PCR positiv. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen früherer epidemiologischer Studien in der Hinsicht, dass stets wenige der parasitologisch positiven Rinder mit der PCR nicht identifiziert werden konnten, während für

einen erheblichen Teil der parasitologisch negativen Rinder mit der PCR ein positives Ergebnis erzielt werden konnte (Solano et al., 1999; Clausen et al., 1998). Als am häufigsten vorkommende Trypanosomenspezies wurde mit beiden Methoden *T. congolense* vor *T. vivax* und *T. brucei* diagnostiziert. Mit der PCR wurden bedeutend mehr Misch- und *T. brucei*-Infektionen aufgedeckt als mit der BCT. Die BCT-Prävalenz der gesamten Untersuchungsherde lag bei 12,2%, während für die PCR-Prävalenz ein Schätzwert von 44,4% ermittelt wurde.

Für das Vorkommen vereinzelter PCR-Versager bei der Untersuchung parasitologisch positiver Tiere wurden bisher eine Reihe verschiedener Gründe diskutiert. Bei der vorliegenden Arbeit war das Versagen der PCR bei zwei der sieben nicht identifizierbaren BCT-positiven Blutproben nachweislich auf die Wahl der Primer zurückzuführen. Als Fehlerquellen im Laborbereich kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage, wie falsche Mischverhältnisse von Reagenzien durch Pipettierfehler, Inhibitoren im Reaktionsgemisch, DNA-Verluste bei der DNA-Extraktion des Probenausgangsmaterials und verschiedene technische Mängel, welche die PCR blockieren können (Kenneth, 1995; Masake et al., 1997; Reifenberg et al., 1997; Solano et al., 1999). Um Fehler bei der PCR gänzlich ausschließen zu können, wurde für die Diagnose von *Coxiella burnetii* eine Multiplex-PCR mit innerer Funktionskontrolle entwickelt (Edingloh et al., 1999). Als innere Funktionskontrolle wurde dabei die Ko-Amplifikation eines Targets aus dem Wirtstiergenom (bovines CD 18-Gen) genutzt. Mit diesem Test lässt sich nicht nur eine Hemmung des einzelnen PCR-Ansatzes ausschließen, sondern zugleich die gelungene DNA-Extraktion der Proben nachweisen (Edingloh et al., 1999).

Der Erfolg einer prophylaktischen Behandlung der Rinder mit Isometamidium (1 mg/kg KGW) wurde 14 Tage nach der Applikation des Wirkstoffes analysiert. Dabei wurden mit beiden Methoden Trypanosomeninfektionen diagnostiziert. Die PCR bestätigte 97,1% (34/35)

der BCT-positiven Rinder und reagierte ferner bei 28,8% (41/142) der BCT-negativen Rinder positiv. Die Überprüfung des Therapieerfolges mit Diminazen (3,5 mg/kg KGW) erfolgte bei Rindern, die 14 Tage nach der Isometamidiumprophylaxe aufgrund ihres parasitologisch positiven Befundes zusätzlich therapeutisch mit Diminazen behandelt worden waren. Hierbei wurden alle BCT-positiven Rinder mit der PCR bestätigt. Außerdem reagierten 55,2% der BCT-negativen Rinder in der PCR.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Bedeutung der PCR als empfindliche Methode zur Überprüfung des Behandlungserfolges von Trypanosomeninfektionen. Zum zuverlässigen Nachweis Trypanozid-resistenter Infektionen müssen jedoch Anwendungsfehler durch eine kontrollierte Trypanozidbehandlung der Rinder ausgeschlossen werden. Ferner müssen die entsprechend richtigen Primerpaare zum Nachweis der regional vorkommenden Trypanosomenspezies gewählt werden. Desweiteren sollten die PCR-Ergebnisse durch Hybridisierung der PCR-Produkte mit spezifischen DNA-Sonden, wie in diesen Untersuchungen erfolgt, verifiziert werden (siehe auch **Mitteilung 14**).

2.4.5 Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der PCR im Vergleich zu parasitologischen Nachweistechniken zur Erkennung von Therapieversagen bei Trypanosomeninfektionen in Rindern

Mitteilung 14:

Gall, Y., T. Woitag, B. Bauer, I. Sidibe, J. McDermott, M. Eisler, D. Mehlitz and P.-H. Clausen (2003): Detection of trypanocide failure in cattle: diagnostic potential of PCR compared to parasitological methods. Proceedings of the joint DFID Animal Health Programme/ICPTV Workshop on Recent Advances in the Control of Human and Animal Trypanosomiasis: Diagnosis, Epidemiology, Modelling and Decision Support, held 1-3 April 2003 at the Fairview Hotel, Nairobi, Kenya. Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors **8**, 36-38.

Die jüngsten Untersuchungen haben gezeigt, dass die PCR einen empfindlichen und spezifischen Nachweis von Trypanosomeninfektionen bei Rindern erlaubt. Die PCR ermöglicht frühzeitige Aussagen über den Therapieerfolg. Sie stellt somit ein geeignetes diagnostisches Hilfsmittel in epidemiologischen Untersuchungen dar, z. B. zur Risikoabschätzung in Endemiegebieten oder bei Erfolgsuntersuchungen in regionalen Bekämpfungsprogrammen.

In ihrer analytischen Sensitivität und Spezifität ist die PCR allen parasitologischen Techniken (HCT, BCT, m-AECT) zum Nachweis von Trypanosomen überlegen (Desquesnes und Dávila, 2002), insbesondere bei chronischen und persistierenden Infektionen nach erfolgter Chemotherapie. Diesen diagnostischen Vorteil erfüllt die PCR jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen:

1. Die Wahl der Primerpaare muss auf die regional vorkommenden Trypanosomenspezies abgestimmt sein. Die parasitologische Untersuchung kann hierfür als Entscheidungsbasis

dienen. Mit der Bestätigung der parasitologisch positiven Tiere durch die PCR kann gleichzeitig die richtige Wahl der Primerpaare überprüft werden.

2. Die korrekte Trypanozidbehandlung der Tiere muss sichergestellt sein, um ein Behandlungsversagen aufgrund von Anwendungsfehlern sicher ausschließen zu können. Im Idealfall wäre die PCR nach einem Einsatz mit Isometamidium mit dem Isometamidium-ELISA (Eisler et al., 1993) zu kombinieren. Der Isometamidium-ELISA erlaubt eine spezifische und sensitive, bis in den Subnanogrammbereich empfindliche Bestimmung der Isometamidiumserumkonzentrationen. Auf die Existenz resistenter Trypanosomen wird bei einer Diagnose von Trypanosomeninfektionen bei einer Isometamidiumkonzentration von wenigstens 0,4 ng/ml geschlossen. Durch eine Kombination der PCR mit dem Isometamidium-ELISA könnten Isometamidium-resistente Trypanosomeninfektionen ohne die Garantie einer vorausgehenden korrekten Trypanozidbehandlung von einem Anwendungsfehler-bedingten Behandlungsversagen abgegrenzt werden. Diese Möglichkeit würde sich auch im Falle einer Behandlung mit Diminazen für den kombinierten Einsatz mit einem Diminazen-ELISA (Karanja et al., 2002) anbieten.

3. Im Falle von Infektionen mit Trypanosomenspezies der Untergattung Trypanozoon bedarf es auf Grund möglicher extravaskulärer Ansiedlungen des Erregers einer näheren Abklärung über die diagnostischen Möglichkeiten und Grenzen der PCR. *T. brucei* hat die Tendenz, in das ZNS auszuwandern und kann auf diese Weise der Trypanozidwirkung entgehen (siehe auch **Mitteilung 11**). Der Einsatz der PCR zur Überprüfung Trypanozid-resistenter *T. brucei*-Infektionen ist daher möglicherweise eingeschränkt. Hierzu bedarf es weiterer Untersuchungen.

4. Die Bestätigung der PCR-Ergebnisse sollte durch eine DNA-Sondenhybridisierung der Amplifikationsprodukte erfolgen. Diese Möglichkeit bietet den Vorteil, dass die Sensitivität der PCR noch gesteigert werden kann (Moser et al., 1989). Die Entwicklung einer PCR mit

einer internen Funktionskontrolle zu diesem Zweck würde hingegen einen zeitlichen und ökonomischen Vorteil mit sich bringen (Edingloh et al., 1999).

5. Nur wenn sich die Kosten für die PCR (ca. €3,- pro Ansatz) in Zukunft erheblich senken lassen, wird diese Technik auch in den Untersuchungslabors der Devisen-schwachen Länder ihren Einzug finden. Um eine Kostenreduzierung der PCR zu erreichen, sollte daher versucht werden, die benötigten Primerpaare in einem Untersuchungsansatz zu kombinieren (sogenannte „Multiplex-PCR“), wie von Masiga et al. (1992), Majiwa et al. (1994) und Gall (2002) in Ansätzen entwickelt, aber noch nicht zur Praxisreife geführt. Eine kostensparende Alternative wäre eine PCR, bei der sich alle pathogenen *Trypanosoma* spp. mit einem Primerpaar in einem Ansatz unter Bildung speziesspezifischer Produkte amplifizieren lassen („Pan-PCR“). Erste Erfolge erzielten Desquesnes et al. (2001). Sie amplifizierten den ersten „internen transkribierten Spacer (ITS 1)“ der ribosomalen DNA (rDNA) von Trypanosomen in der PCR und konnten *T. vivax*, *T. theileri*, *T. simiae*, Trypanozoon, *T. congolense-savannah*, *T. congolense-forest* und *T. congolense-Kilifi* eindeutig anhand der Größe der Amplifikationsprodukte im Agarosegel differenzieren. Aufgrund der mangelnden analytischen Sensitivität hat diese PCR jedoch noch keinen Einzug in die Praxis gefunden.

6. Eine Standardisierung der PCR-Protokolle (für ausgewählte Primerpaare) sollte angestrebt werden, um eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Regionen und zwischen unterschiedlichen Laboren zu ermöglichen. Diese Maßnahme müsste die Standardisierung eines geeigneten Protokolls für die DNA-Extraktion mit einbeziehen.