

1. EINLEITUNG

Trypanosoma equiperdum (Doflein, 1901) ist der Erreger der Beschälseuche. Die Beschälseuche ist eine gewöhnlich chronisch verlaufende, venerische Infektionskrankheit der Equiden, die sich anfänglich klinisch in einer örtlichen Entzündung der äußeren Geschlechtsteile, später in lokalen, subkutanen ödematösen Schwellungen sowie Lähmungserscheinungen äußert. Als einziger Vertreter der Gattung *Trypanosoma* wird *Trypanosoma equiperdum* ausschließlich durch den Deckakt übertragen. Die Beschälseuche ist in Deutschland eine nach tierseuchenrechtlichen Vorschriften anzeigepflichtige Infektionskrankheit.

Pferde spielen eine große sozio-ökonomische Rolle in der Mongolei. Sie dienen als Reit- und als Arbeitstiere in Verbindung mit der Schaf-, Ziegen- und Rinderhaltung. Im Weltmaßstab, nach den USA, Mexico, Brasilien, Argentinien und China, nimmt die Mongolei den siebenten Platz in der Pferdehaltung ein. Im Jahre 1998 lag der nationale Bestand bei 3,1 Millionen Tieren.

Bisher liegen keine Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung von *Trypanosoma equiperdum*-Infektionen bei Pferden in der Mongolei vor.

Die serologischen Untersuchungen dieser Arbeit sollen Basisdaten zur weiteren Aufklärung der Epidemiologie der *Trypanosoma equiperdum*-Infektion bei Pferden in der Mongolei liefern. Das Ziel der Untersuchungen war die Ermittlung der serologischen Prävalenz von *Trypanosoma equiperdum* in Pferdeherden im Zentral Aimak der Mongolei mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR) und des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Wirtschaftliche Bedeutung der Pferde in der Mongolei

Die mongolischen Pferde werden ganzjährig auf der Weide gehalten und zeigen aufgrund natürlicher Selektion eine hervorragende Anpassung an ihre Umwelt. Vor allem der Winter, der im Oktober beginnt und sich bis in den April hinzieht, macht in dieser Region Mensch und Tier zu schaffen. Es herrschen extreme Bedingungen, oft werden Temperaturen von -30°C bis zu -40°C gemessen. Die Pferde verlieren in dieser Zeit 20-25% ihres Körpergewichtes und können das verlorene Gewicht in kürzester Zeit im Sommer und Herbst kompensieren. Mongolische Pferderassen sind widerstandsfähig und gut an das kontinentale Klima akklimatisiert (CHULUUNBAATAR, 1997).

Mongolische Pferde haben ein Stockmaß von höchstens 140 Zentimetern bei einer Körperlänge von etwa 150 Zentimetern. Das Durchschnittsgewicht eines gut genährten männlichen Tieres liegt bei etwa 350 Kilogramm (SCHMID und ROBERT, 1965).

In der Mongolei, wegen einer unendlichen Weite, dienen die Pferde als Reit- und als Arbeitstiere in Verbindung mit der Schaf-, Ziegen- und Rinderhaltung. Die Nomaden in der Mongolei wandern ununterbrochen mit ihren Herden über weite Strecken.

Für Mongolen, besonders aber für Nomaden, ist vergorene Stutenmilch (= Airag) ein wichtiges, traditionelles Nahrungsmittel, welches durch die hohe Zahl von Pferden immer reichlich vorhanden ist. Die Herstellung von Stutenmilch erfolgt nur von Juni bis September (die Fohlen werden im Frühjahr - März/April - geboren). Die Stuten geben bei einmaligen Melken 500 ml Milch am Tag. In der Sommerzeit werden die Stuten pro Tag mit 1,5 - 2 Stunden Abstand 6 - 8 mal gemolken (CHULUUNBAATAR, 1997). Unbestritten ist, daß Airag den Stoffwechsel des Menschen anregt und die körperlichen Abwehrkräfte stärkt. Das Trinken des Airags ist gerade für die Steppennomaden, die außerhalb der Vegetationsperiode fast ausschließlich von Fleisch, Nudeln und Reis leben, von großer Bedeutung, um dem Körper Vitamine zuzuführen und zu entschlacken. Auch im Sommer nehmen die Nomaden so gut wie kein Obst oder Gemüse zu sich, so daß Airag ihre wichtigste Vitaminquelle darstellt. In geringen Mengen exportiert die Mongolei auch getrocknete

Stutenmilch, also Rohmilch, die entrahmt und danach industriell getrocknet wird (STELLING, 1999).

2.2 Beschälseuche (Dourine)

2.2.1 Allgemeines

Im Jahre 1894 konnte ROUGET erstmalig im Blut eines Pferdes Trypanosomen im Blut darstellen (BARROWMAN *et al.*, 1994). Im Jahre 1900, konnten SCHNEIDER und BUFFARD durch Überimpfen des Parasiten das klinische Bild der Beschälseuche bei einem Pferd auslösen (HOARE, 1972). Nachdem diese Ergebnisse durch NOCARD (1900) und andere Kollegen bestätigt werden konnten, wurde die Dourine als eine Art der Trypanosomen der Pferde allgemein anerkannt (HOARE, 1972). Der verursachende Erreger wurde von DOFLEIN im Jahre 1901 *Trypanosoma equiperdum* bezeichnet (HOARE, 1972; BARROWMAN *et al.*, 1994). Die Dourine oder Beschälseuche ist eine Krankheit der Pferde, Esel und Maultiere. Als ausgesprochene Geschlechtskrankheit zeigt die Beschälseuche die ersten klinischen Erscheinungen in einer ödematösen Schwellung der äußeren Geschlechtsorgane. Später treten auf der Haut Quaddeln und ringförmige Schwellungen auf.

2.2.2 Der Erreger (Taxonomie und Morphologie)

Der Erreger ist ein begeißelter Hämoflagellat der Familie Trypanosomatidae (Doflein, 1901) aus der Ordnung der Kinetoplastida. Vom Übertragungsmodus her werden die Trypanosomen nach HOARE (1972) in zwei Sektionen unterteilt:

- ⇒ die Stercoraria – die durch den Kot von Arthropoden übertragen werden und
- ⇒ die Salivaria – die beim Stich von Tsetsefliegen zyklisch-alimentär durch infizierten Speichel oder den unterbrochenen Stechakt mechanisch durch Tabaniden oder andere Stechfliegen in das Wirtstier gelangen oder, wie bei der Beschälseuche, beim Deckackt übertragen werden.

Die Gruppe der Salivaria umfaßt 4 Untergattungen, von denen der Subgenus Trypanozoon sowohl tier- als auch humanpathogene Vertreter beinhalten (HOARE,

1972): die Spezies *T.(T.) brucei* setzt sich aus *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dem Erreger der ostafrikanischen Schlafkrankheit des Menschen, *Trypanosoma brucei gambiense*, verantwortlich für die westafrikanische Form der Schlafkrankheit und schließlich *Trypanosoma brucei brucei* und *Trypanosoma brucei evansi* als rein tierpathogene Unterarten zusammen. Diese können aufgrund morphologischer Kriterien nicht voneinander abgegrenzt werden, weshalb man für deren spezies-spezifische Charakterisierung und Identifizierung auf alternative Methoden angewiesen ist. Aufgrund seiner phylogenetischen, morphologischen und antigenen Eigenschaften wird *T. equiperdum* ebenso wie *T. evansi*, von dem er mikroskopisch nicht zu unterscheiden ist, und *T. brucei* dem Subgenus Trypanozoon zugeordnet. Nach STEPHEN (1986) wird folgende Einteilung der Sektion Salivaria vorgenommen:

Subgenus PYCNOMONAS, Ochmann (1905):

Spezies:

T. (Pycnomonas) suis, Ochmann (1905)

Subgenus DUTTONELLA, Ziemann (1918):

Spezies:

T. (Duttonella) vivax, Ziemann (1905)

T. (Duttonella) uniforme, Bruce et al. (1911)

Subgenus NANNOMONAS, Broden (1904):

Spezies:

T. (Nannomonas) congolense, Broden (1904)

T. (Nannomonas) simiae, Bruce et al. (1912)

T. (Nannomonas) vanhoofi, Stephen (1986)

Subgenus TRYPANOZOON, Lühe (1906):

Spezies:

T. (Trypanozoon) evansi, Steel (1885)

T. (Trypanozoon) equiperdum, Doflein (1901)

T. (Trypanozoon) brucei, Plimmer und Bradford (1899)

Subspezies von *T. (Trypanozoon) brucei*:

T. (Trypanozoon) b. brucei, Plimmer und Bradford (1899)

T. (Trypanozoon) b. rhodesiense, Stephens und Fantham (1910)

T. (Trypanozoon) b. gambiense, Dutton (1902)

T. equiperdum ist ein monomorpher Trypanosom, der von schlanker, langgestreckter Gestalt ist (MAREK und MANNINGER, 1952). Der Erreger hat eine Länge von 16 – 35 µm, mit einer entlang der Körperlängsachse verlaufenden, undulierenden Membran, die subterminal in unmittelbarer Nähe des Kinetoplasten entspringt und in einer beweglichen Geißel ausläuft. Begrenzt wird *T. equiperdum* durch eine einfache Zellmembran (HIEPE und JUNGSMANN, 1983). Die Blutstadien besitzen eine 10 - 15 nm dicke Glykoproteinschicht ("surface coat"). Diese Schicht bietet Schutz vor der Abwehrreaktion des Wirtes, da sie im Verlaufe aufeinanderfolgender Längsteilungen sich umbildet und dadurch ihren antigenen Charakter verändert (ROLLINGHOFF und ROMMEL, 1994).

Die Lebensweise von *T. equiperdum* ist extrazellulär, intrazelluläre Stadien wurden bisher nicht beschrieben. Ihre Vermehrungsform erfolgt primär ungeschlechtlich durch Längsteilung. JENNI *et al.* (1986) konnten bei *Trypanosoma brucei* experimentell eine geschlechtliche Vermehrung nachweisen. Da eine geschlechtliche Vermehrung bisher nur in der Tsetsefliege dargestellt werden konnte wird bei *T. evansi* und *T. equiperdum* primär von einer ungeschlechtlichen Vermehrung ausgegangen (GIBSON, 2000).

Trypanosoma equiperdum verursacht zunächst Läsionen der Genitalschleimhäute (Präputium, Vagina), tritt dann im Blut und Lymphe auf und dringt schließlich in das Zentralnervensystem ein (HIEPE und JUNGSMANN, 1983). Im Gegensatz zu allen anderen Trypanosomen der Salivaria-Gruppe kommt *T. equiperdum* überwiegend im Gewebe vor, dringt nur vorübergehend in die Blutbahn ein und wird ohne Vektor direkt beim Deckakt von Wirt zu Wirt übertragen (HOARE, 1972).

2.2.3 Epidemiologie und geographische Verbreitung der Beschälseuche

Die Beschälseuche kommt beim Pferd, Maultier und Esel vor. Maultiere und Esel sind widerstandsfähiger gegen diese Infektion als Pferde. Einheimische Pferdeherden sind meistens subklinisch oder nur wenig betroffen und gelten häufig

als symptomlose Träger (CURRASON, 1943; HOARE, 1972). Der Erreger tritt im Blut meistens nur sehr spärlich auf (WINTZER, 1977).

Die natürliche Übertragung des Erregers erfolgt während des Geschlechtskontaktes zwischen den Tieren und die Infektion wird übertragen vom Hengst zur Stute oder umgekehrt (BARROWMAN, 1994). Die Krankheit ist nicht begrenzt durch Umwelteinflüsse, wie dies üblicherweise bei der durch die Tsetse-Fliege übertragenen Trypanosomosis ist. Daher hat die Verbreitung von Dourine nichts mit den klimatischen Verhältnissen zu tun (STEPHEN, 1986). Die Infektion beim Fohlen kann durch eine Kontamination der Konjunktival oder Nasen - Schleimhaut und durch den Vaginal Ausfluß einer infizierten Stute erfolgen (ROBINSON, 1948; HOARE, 1972). Durch eine Verletzung des Euters der Stute ist auch eine Infektion auf das Fohlen möglich (HORNBY, 1948; HOARE, 1972). Tierärzte können die Infektion durch kontaminierte Instrumente, die bei der künstlichen Befruchtung benutzt wurden, übertragen (HOARE, 1972).

Das Vorkommen von Dourine in verschiedenen Ländern und zu verschiedenen Zeiten ist stark schwankend. Es ist zu meist von menschlichen Aktivitäten, z.B. Import von Pferden aus befallenen Gebieten und den Grad an effektiven Kontrollmaßnahmen bestimmt (HOARE, 1972). Durch Kontrollmaßnahmen, basierend auf klinische und serologische Untersuchungen und Keulung bzw. Kastration der Reagenten, konnte in vielen Ländern der Welt die Krankheit getilgt werden (WATSON, 1920; BARROWMAN, 1994). Zur Zeit beschränkt sich das Verbreitungsgebiet auf Süd- und Osteuropa, Nord- und Südafrika, Südamerika sowie den Asiatischen Raum (BARROWMAN, 1976a; WILLIAMSON und HERR, 1986; HAGEBOCK, 1992).

Dem OIE - Büro in Paris (OIE, 2000) wurden im Jahre 2000 folgende Ausbrüche gemeldet:

Botswana: 11 Ausbrüche, 13 Fälle.

Kyrgyzistan: 4 Ausbrüche, 94 Fälle, 94 Pferde geschlachtet.

Lithuania: Aus 1131 Pferden wurde 2 positive Reagenten festgestellt. Es wurden aber keine klinische Krankheitssymptome beobachtet.

Namibia: 4 Ausbrüche, 10 Fälle.

Russland: 50 Ausbrüche, 910 Fälle, 8 Todesfälle, 902 Pferde geschlachtet.

Süd Africa: 18 Ausbrüche, 46 Fälle, 4 Pferde geschlachtet.

2.2.4 Parasitologischer und klinischer Infektionsverlauf

Die Inkubationszeit hängt von der Virulenz des betreffenden Stammes ab und liegt zwischen einem Monat und 3-4 Monaten (HOARE, 1972). Die Krankheit soll auch durch das Klima beeinflusst werden. In der kalten Jahreszeit bleibt die Krankheit unsichtbar. Sie tritt vermehrt während der warmen Jahreszeit auf (HOARE, 1972; STEPHEN, 1986). Der Krankheitsverlauf ist nur ausnahmsweise akut, fast immer verläuft die Erkrankung chronisch und dauert in milden Fällen 1-2 Jahre. Eine Selbstheilung - vor allem beim Hengst - kann sich daran anschließen (HOARE, 1972; BARROWMAN, 1976). In ernsteren, chronischen Fällen beträgt die Krankheitsdauer gelegentlich 4-5 Jahre mit einer Mortalität von etwa 50% (WATSON, 1920; HOARE, 1972).

Die Beschälseuche der Pferde und Esel verläuft klinisch in 3 charakteristischen Stadien, die sich an verschiedenen Organsystemen manifestieren: Genitalapparat, Haut und Zentralnervensystem (HIEPE und JUNGSMANN, 1983). Im Primärstadium - (Dauer 4-6 Wochen) dringen die Erreger in feinste Läsionen der Genitalschleimhaut ein, vermehren sich durch Zweiteilung und lösen entzündliche Veränderungen in Form von ödematösen Schwellungen und Geschwüren, vor allem im Bereich von Vulva und Präputium aus. Im Sekundärstadium gelangen die Trypanosomen schubweise in die Blutbahn, ihre Toxine führen zu Lymphknotenschwellungen und Gefäßalterationen namentlich in der Haut. Über eine gefäßbedingte, hämorrhagische Diathese entstehen Quaddeln, die sogenannten Talerflecke (DIETZ und WISNER, 1982).

Die Krankheitserscheinungen sind schon 1 Woche oder mehrere Monate nach der Ansteckung sichtbar. Beim Hengst treten schmerzlose, ödematöse Anschwellungen an Penis und Präputium auf, die später auf Unterbauch und Unterbrust übergreifen. Aus dem mitunter entzündlich geschwollenen *Orificium urethrae* kommt es zur Absonderung eines gelblichgrauen Sekretes. Es bestehen Harndrang und erhöhter Geschlechtstrieb. Bei der Stute sind Labien und Vulva gerötet und sulziggelb – ödematös infiltriert; es sondert sich ein gelblich – graues Sekret ab. Auf der Vaginalschleimhaut bilden sich linsen- bis erbsengroße, gelbrote, später geschwürig zerfallende Papeln (HIEPE und JUNGSMANN, 1983). Sowohl beim Hengst als auch bei der Stute verläuft dieses Stadium ohne gestörtes Allgemeinbefinden. Es kann geringgradiges Fieber auftreten.

Typische Erscheinungen sind Ulzerationen auf den äußeren Bereichen und den Schleimhäuten der Genitalien, die pigmentlose Stellen (Krötenflecke) hinterlassen können (MULLIGAN, 1970). Nach einigen Wochen erscheint dann Urtikaria auf der Haut, die sich deutlich von der Umgebung abhebt (Talerflecken, dollar-spots). Im Endstadium der Krankheit treten ausgeprägte Bewegungsstörungen auf; schließlich kommt es zu Paresen mit Festliegen (MULLIGAN, 1970; BARROWMAN, 1976; SOLTYS u. WOO, 1977). Durch die Blut-Hirnschranke dringen die Parasiten in das Nervensystem ein; der Beginn der nervösen Form der Krankheit, welche verbunden ist mit dem Vorhandensein des Parasiten in der Zerebrospinalflüssigkeit (BAROWMANN, 1976a). Das Tertiärstadium ist gekennzeichnet durch peripher-nervöse, sensible und motorische Störungen. Betroffen sind vor allem der *Nervus facialis* sowie *N. ischiadicus*, *N. peroneus*, *N. tibialis* und *N. infraorbitalis* (DIETZ und WISNER, 1982).

Pathologisch-anatomisch fallen eine chronische Lymphadenitis (BARROWMAN, 1976), ödematöse Infiltration im Bereich der Genitalien, Hydrothorax, Hydroperikard, seröse Durchfeuchtung der großen Nervenstämme und Muskelveränderungen im Bereich der Kruppe und der Hinterhand auf (RESSANG, 1970; BARROWMAN, 1976). Dabei soll die Schnittfläche der Muskulatur Blässe und "gekochtes" Aussehen zeigen, häufig mit schwarzroten oder gelbroten Herden durchsetzt und das Bindegewebe serös infiltriert sein (RESSANG, 1970). Pathologisch-histologisch werden Polyneuritis und zelluläre Infiltration, degenerative Veränderungen der Rückenmarksnerven und -ganglien, die sich auch auf die größeren peripheren Nerven ausdehnen, beobachtet (BARROWMAN, 1976; SOLTYS u. WOO, 1977). RESSANG (1970) beschreibt eine "albuminoide bis fettige" Degeneration mit lokaler Nekrobiose und rundzelliger Infiltration des intermuskulären Bindegewebes im Bereich der makroskopisch veränderten Muskulatur.

2.2.5 Diagnose der Dourine

Eine Diagnose ist durch komplexe Untersuchungen zu sichern, da je nach Erkrankungsstadium der direkte Nachweis des Erregers nicht immer möglich ist. Oft bieten Anamnese, wie Talerfleck- oder Krötenflecke einen wichtigen Anhaltspunkt für die Diagnose.

2.2.5.1 Parasitologische Nachweismethoden

In infizierten Tieren sind Trypanosomen in der Lymphe, in ödematösen Schwellungen der äußeren Genitalien, in Harnröhre- und Scheidensekret, in ödematösen Auflagerungen und in der Zerebrospinalflüssigkeit nur in geringer Anzahl vorhanden (HOARE, 1972; BARROWMAN, 1976; DONNELLY, 1996).

Nachweis von *T. equiperdum* im Sekret der Harnröhre und der Scheide:

Verhältnismäßig leicht gelingt der Trypanosomen-Nachweis im ungefärbten Präparat, im Sekret der Harnröhre und der Scheide, nur muß man auch hier mit dem Umstand rechnen, daß sie aus dem Sekret periodisch verschwinden können. Scheidensekret erhält man durch Abstreifen der Schleimhaut mit einem Spatel oder einem Objektträger. Bei Hengsten zieht man die Rute hervor, führt einen mit einem langen Stiel versehenen, etwa bonengroßen, ovalen Löffel mit stumpfen Rändern in die Harnröhre und streift damit die Schleimhaut ab (MAREK und MANNINGER, 1952).

Der direkte Trypanosomen-Nachweis ist in Ausstrichen vom Genitalsekret und frischen Hautveränderungen im Primärstadium möglich HIEPE (1983).

MEHLHORN (1986) berichtet, daß der Nachweis von *T. equiperdum* im Sediment des Urins, in Ausstrichen des Harnröhre- bzw. Scheidenausflusses sicher ist und im Blutaussstrich sehr selten möglich ist.

Urethrale oder vaginale Abstriche werden wie Blutaussstriche üblicherweise mit der Färbung nach Giemsa untersucht (HOARE, 1972; STEPHEN, 1986; DONNELLY, 1996).

Nachweis von *T. equiperdum* im ödematösen Auflagerungen (Plaques):

Für die Sammlung von Flüssigkeitsinhalten von den ödematösen Auflagerungen (Plaques) sollte die Haut erst gespült, rasiert und getrocknet werden. Die Flüssigkeit sollte mit einer Spitze abgesaugt werden. Die Flüssigkeit kann im Nativpräparat nach freibeweglichen Trypanosomen oder im gefärbten Ausstrich mikroskopisch untersucht werden. In der Regel sind die Trypanosomen nur für einige Tage anwesend, daher sollten die Läsionen mehrfach untersucht werden (HOARE, 1972; DONNELLY, 1996).

Der erfolgreiche Erregernachweis im Blut hängt von der Konzentration der Parasiten im Blut ab. Der mikroskopische Nachweis der Parasiten im Nativpräparat,

Blutausstrich oder Dicken Tropfen wird bei Tieren mit einer hochgradigen Parasitämie durchgeführt. Diese direkten Nachweismethoden sind dann von Bedeutung, wenn akute Krankheitssymptome auftreten und somit gezielt und schnell eine Verdachtsdiagnose bestätigt werden soll. In Fällen, in denen die Infektion in chronischer Verlaufsform mit niedriger Parasitämie auftritt und ein direkter Erregernachweis nur selten möglich ist, sind Methoden vorzuziehen, die auf einer Konzentration bzw. Vermehrung des Parasiten beruhen. Dazu kann heute die Anreicherung der Parasiten mit Blutinokulation auf empfindliche Nagetiere, in Kapillarröhrchen gemäß der von WOO (1969) entwickelten Hämatokrit-Zentrifugentechnik (HCT) und die Mini-Anionen-Austausch-Zentrifugations-Technik (m-AECT) (LANHAM und GODFREY, 1970; LUMSDEN *et al.*, 1979) gerechnet werden. Für epidemiologische Untersuchungen kommt jedoch in erster Linie der indirekte Erregernachweis mit Hilfe serologischer Untersuchungsmethoden in Betracht.

2.2.5.1.1 Blutausstrich

Die mikroskopische Blutuntersuchung am lebenden Tier dient dem direkten Erregernachweis mit hochgradiger Parasitämie. Zur Herstellung eines Blutausstriches wird ein Tropfen Kapillarblut auf einen entfetteten Objektträger (möglichst staubfrei) gegeben, ein Deckgläschen an diesem herangeführt, bis sich an der Unterkante das Blut verteilt hat und anschließend zügig über den Objektträger geschoben. Danach werden die frischen, luftgetrockneten Blutausstriche 3-5 Minuten mit Methylalkohol fixiert, nach Giemsa gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Im Blut sind die Erreger nur während der Fieberanfälle und häufig auch dann nur in so spärlicher Zahl vorhanden, daß sie selbst bei der Untersuchung im Dicken Tropfen unentdeckt bleiben (MAREK und MANNINGER, 1952).

2.2.5.1.2 Tierversuch

Die Anwendung des Tierversuchs beruht auf der Vermehrung des Parasiten in empfänglichen Labornagern. Die Tiere werden intraperitoneal mit einer heparinisierten Blutprobe inokuliert (Ratten 1-2 ml, Mäuse 0,25-0,50 ml Blut). Die Präpatenzzeit bei Ratten (3-9 Tage) und bei Mäusen (5-9 Tage) wird von der Virulenz des Trypanosomen Stammes, der Konzentration des Erregers im Inokulum

und der Empfänglichkeit des Labortieres beeinflusst. Die Infektion von Labornagern zu diagnostischen Zwecken ist schwierig (HOARE, 1972), jedoch stellt die intratestikuläre Injektion beim Kaninchen eine zuverlässige Methode dar (RESSANG, 1970; SOLTYS und WOO, 1977).

Eine Resistenz verschiedener Nagerstämme gegenüber einer Infektion mit *T. equiperdum* wurde von PACHANIAN (1963) und HORVATH et al. (1987) beschrieben. Pachanian (1963) prüfte 21 verschiedene Nagerstämme: bei 8 von ihnen konnte eine Resistenz nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit von der Inokulationsdosis wird durch die Ergebnisse von KEMENSES und HORVATH (1986) gezeigt. Für den Tierversuch werden häufig Hasen, Ratten, Mäuse und Meerschweinchen benutzt (HOARE, 1972). Blut, Zerebrospinalflüssigkeit, Flüssigkeiten von Vaginal-/ Präputialspülungen oder von ödematösen Auflagerungen können als Infektionsmaterial verwendet werden. Das Infektionsmaterial kann intraperitoneal, intratesticular oder direkt in die Scheide oder in die Harnröhre inokuliert werden (HOARE, 1972; STEPHEN, 1986).

2.2.5.1.3 Hämatokrit - Zentrifugationstechnik (HCT)

Die von WOO (1969) entwickelte Hämatokrit-Zentrifugations-Technik, ermöglicht die Feststellung niedriger Parasitämien. Bei dieser Nachweismethode wird Nativblut in heparinisierte Hämatokritkapillaren (70 µl) gegeben, und anschließend ca. 8 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die Kapillaren werden anschließend bei 400-facher Vergrößerung (Spitzobjektiv 40/0,85 Öl, Okular 10x) an der Übergangszone zwischen Blutzellsediment und Plasmasäule untersucht. Bei der HCT reichern sich die Trypanosomen in diesem Gebiet an.

2.2.5.1.4 Mini - Anionenaustausch - Zentrifugationstechnik (m-AECT)

Die m-AECT fordert, im Vergleich zur HCT, einen wesentlich komplizierteren Vorbereitungsprozeß. Mit dieser Nachweismethode kann eine größere Menge Blut untersucht werden. Die Besonderheit der m-AECT besteht darin, daß die Trypanosomen von den korpuskulären Bestandteilen des Nativblutes getrennt werden (LANHAM und GODFREY, 1970). Die korpuskulären Blutbestandteile werden in einer mit Phosphatpuffer-Glukoselösung-Puffer equilibrierten Diethyl-

aminoethyl-Zellulose-Säule (DEAE-52) gebunden. Die Trypanosomen werden durch die Säule gespült und in einer am distalen Ende verschweißten Pasteur-Pipette aufgefangen, zentrifugiert und mikroskopisch nachgewiesen. Das Trennungsprinzip beruht darauf, daß korpuskuläre Blutbestandteile und Trypanosomen eine unterschiedliche Oberflächenladung besitzen.

2.2.5.2 Serologische Nachweismethoden

Die Anwendungsmöglichkeiten der KBR und ELISA für die Diagnose der Trypanosomosis sind begrenzt, als Hilfsmittel bei epidemiologischen Untersuchungen sind sie jedoch ein unentbehrliches Hilfsmittel (STAAK *et al.*, 1996).

2.2.5.2.1 Immunologische Reaktionsmechanismen

Gelangen Antigene in den Körper, so werden sie mit dem spezifischen und unspezifischen Abwehrreaktionen konfrontiert.

Die Aufgaben des Immunsystems sind: Ausführung zellvermittelter Immunreaktionen (killer cells), Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (memory cells), Kooperation mit B-Lymphozyten bei der Antikörperbildung gegen bestimmte Antigene (helper cells), Regulierung der Immunantwort anderer Zellen (suppressor cells), Bildung und Freisetzung von Mediatoren der zellulären Immunität (Lymphokine) (BUNDSCHUH und SCHNEEWEISS, 1988).

Die bedeutendste Zellpopulation stellen die Lymphozyten dar, die sich aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzellen zu den B-Lymphozyten und zu den T-Lymphozyten differenzieren. B-Lymphozyten oder B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper freisetzen; T-Lymphozyten oder T-Zellen bilden zwei Klassen, von denen eine vor allem aus den cytotoxischen T-Zellen besteht, während die zweite Zellen umfaßt, die wiederum andere Zellen, wie B-Zellen oder Makrophagen, aktivieren (JANEWAY und TRAVERS, 1997). Sie fungieren als Träger der spezifischen Immunreaktion.

B-Lymphozyten können mit in der Plasmamembran verankerten Antigenrezeptoren das Antigen binden. Die im Knochenmark geprägten B-Lymphozyten erfahren nach einer Reizung durch ein Antigen eine Umwandlung zu IgM-Antikörperbildungbefähigten Plasmazellen. Mit Hilfe der T-Helferzellen kann die

Produktion von diesen kurzlebigen IgM-Antikörpern auf die langlebigen IgG-Antikörper umgeschaltet werden. Hierbei kooperieren die T-Helferzellen mit den Antikörperproduzierenden Plasmazellen. Einige B-Lymphozyten, die durch Antigenkontakt stimuliert werden, dienen als Gedächtniszellen (Memory-Zelle) um bei Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnelle und effektive immunologische Reaktion zu ermöglichen.

Sowohl die B-Lymphozyten als auch die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, aber nur die B-Lymphozyten reifen dort auch. Die T-Lymphozyten wandern zum Thymus und reifen dort. Damit stellt der Thymus die Quelle der T-Lymphozyten dar, die für die zellvermittelte Immunität aber auch für die Regulation der gesamten Immunreaktion verantwortlich sind. Auf einen Antigenkontakt reagieren T-Zellen mit einer Proliferationsantwort und anschließender Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen. Die Effektorzellen sind für die zellulären Immunantworten, wie allergische Spätreaktion, Zytotoxizität und Abstoßung von Transplantaten zuständig.

Eine weitere für die Immunantwort wichtige Gruppe von Zellen sind die Makrophagen, die insbesondere im aktiviertem Zustand, zahlreiche wichtige Unterstützungsfunktionen in der Fremdkörperabwehr ausüben. Diese Aktivierung erfahren sie durch von sensibilisierten T-Zellen produzierte, lösliche Faktoren, den sogenannten Lymphokinen (WING und REMINGTON, 1980). Lymphokine stellen als Mediatoren der zellulären Immunität einen wichtigen Bestandteil des Abwehrsystems dar. Sie sind vorwiegend Produkte von spezifisch sensibilisierten T-Zellen und funktionsbeeinflussend auf andere Zellen gerichtet. Im Vordergrund der Makrophagenfunktionen steht das Einfangen und Aufarbeiten von thymusabhängigem Antigen mit anschließender Antigenpräsentation, wodurch eine verbesserte Immunantwort erzielt wird. Zusätzlich sind Makrophagen auch an der Stimulation von Lymphozyten in einer gemischten Lymphozytenstruktur (MLC) oder durch Mitogene und der Bildung zytotoxischer T-Zellen (CTL) beteiligt (WEISS und FITCH, 1978).

Neben den B- und T-Lymphozyten, die sich durch charakteristische Oberflächenmarker identifizieren lassen, stellen die Nullzellen eine weitere Population der Lymphozyten dar. Es handelt sich dabei um Zellen, die Rezeptoren für Immunkomplexe tragen und ohne Präsensibilisierung eine antikörperabhängige Zytotoxizität verursachen (PARILLO und FAUCI, 1978).

Immunglobuline: Eine wichtige Begleiterscheinung der Trypanosomose ist die Hypergammaglobulinämie, die durch den Anstieg der Konzentration sowohl der IgM- als auch der IgG- Antikörper hervorgerufen wird, wobei der Anstieg der Konzentration der IgM- Antikörper deutlicher ausgeprägt ist. Studien über den Serum-immunglobulingehalt im Verlauf einer Trypanosomenerkrankung wurden sowohl beim Menschen und bei mehreren Tierarten durchgeführt. Erstmals beim Menschen beschreiben MATTERN *et al.* (1976) eine Erhöhung des β_2 -Makroglobulingehaltes (IgM) bei einer natürlichen *T. b. gambiense*-Infektion mit chronischem Krankheitsbild. CORNILLE und HORNING (1968) konnten diese Ergebnisse für *T. b. rhodesiense* und GREENWOOD und WHITTLE (1976) für *T. b. gambiense* bestätigen. Von mehreren Autoren wird die Immunglobulinkonzentration bei Haustieren nach einer experimentellen *T. evansi*-Infektion beschrieben. LUCKINS *et al.* (1979) fanden bei Kamelen eine 2-fache Erhöhung der normalen Ig-M Konzentration, die mit fortschreitendem Infektionsverlauf jedoch auf eine diagnostisch nicht mehr verwertbare Konzentration sank. BOID *et al.* (1980) ermittelten am 34. Tag ein Maximum, das dem 5-fachen des präinfektionellen IgM-Wertes entsprach. LUCKINS und MEHLITZ (1976) untersuchten den Immunglobulingehalt des Serums von natürlich und experimentell mit verschiedenen Trypanosomenarten infizierten Zeburindern. Sie fanden eine 2 bis 9-fache IgM- und eine 1 bis 10-fache IgG-Zunahme. Auch bei Labornagern werden vergleichbare Ergebnisse beschrieben. Beim Kaninchen bewirkt eine *T. equiperdum*-Infektion einen 10-fachen IgM-Anstieg (FROMMEL *et al.*, 1970), eine *T. evansi*-Infektion einen bis zwanzigfachen IgM- sowie einen zweifachen IgG-Anstieg (LUCKINS *et al.*, 1978). Eine Korrelation zwischen Überlebensdauer und IgM-Anstieg erkannte CLARKSON (1976) bei *T. brucei*-infizierten Mäusen. Die Tiere, die einen starken IgM-Anstieg zeigten, überlebten länger als die Tiere mit vergleichsweise geringem IgM-Anstieg.

Polyklonale B-Zellaktivierung: Der Anteil trypanosomenspezifischer Antikörper sowohl der IgM-, als auch der IgG-Klasse, ist jedoch sehr gering. So stellten nur 5% bis 10% der gesamten Immunglobuline den Anteil spezifischer Antikörper dar (HOUBA *et al.* 1969; CORSINI *et al.* 1977). Ein teilweise erhöhter IgG-Wert bei *T. brucei*-infizierten Affen erwies sich über 95% als nicht parasitenspezifisch (FREEMAN *et al.*, 1970). Diese Hypergammaglobulinämie sehen zahlreiche Autoren als Folge einer polyklonalen B-Zellaktivierung an (URQUHART *et al.*, 1973;

HUDSON *et al.*, 1976; ASSOKU *et al.*, 1977; KOBAYAKAWA *et al.*, 1979). Diese polyklonale Aktivierung der B-Lymphozyten ist bei einzelnen Mäusestämmen unterschiedlich stark ausgeprägt. MORRISON *et al.* (1978) verbinden die bessere Kontrolle einer Trypanosomeninfektion bei einigen Mäusestämmen mit ihrer Fähigkeit eine polyklonale Aktivierung der B-Zellen einzuschränken. Sie beobachteten, daß die weniger empfänglichen AKR/A- und C57Bl/6J-Mäuse im Verlauf der *T. congolense*-Infektion mit einer schwachen polyklonalen Antwort ihrer B-Lymphozyten reagierten. Die B-Zellen empfänglicher Tiere des BALB/c-Stammes antworteten dagegen mit einer stark ausgeprägten, unspezifischen Reaktion. Dieses bedeutet, daß trypanotolerante Mäuse ihre B-Lymphozyten effektiver, in einer spezifischen Weise, gegen die Erreger einsetzen können. OYEJIDE *et al.* (1982) infizierten gleichzeitig Mäuse mit *T. equiperdum* und einem Influenzavirus und verglichen Schwere und Krankheitsbild der Viruspneumonie mit einer nur mit dem Virus infizierten Kontrollgruppe. *T. equiperdum*-infizierte Mäuse zeigten histologisch eine ausgeprägte, virusbedingte Pneumonie mit einer gegenüber der Kontrollgruppe vermehrten Infiltration von Plasmazellen in das Pulmonalparenchym, die nach Meinung der Autoren Resultat einer polyklonalen B-Zellaktivierung sein soll. SEED (1972) vermutet jedoch, daß der ansteigende Ig-M-Spiegel nicht unspezifisch, sondern Folge einer kontinuierlichen Synthese neuer spezifischer Oberflächenantigene zum Zeitpunkt jeder neuen Parasitämiewelle ist. Er stellt somit den Ausdruck einer spezifischen Immunabwehr dar. Da sich die variantenspezifischen Oberflächenantigene (VSA) einer jeden Parasitämiewelle in variablen Aminosäuresequenzen auszeichnen (CROSS, 1975; BRIDGEN *et al.*, 1976), könnten die B-Zellstimulation letztendlich Folge einer immer wieder neu angeregten Antikörperproduktion sein.

Immunsuppression: Neben der polyklonalen B-Zellstimulierung beobachtet man im Verlauf einer Trypanosomeninfektion eine progressive Immunsuppression. Die Immunsuppression äußert sich dergestalt, daß während einer Infektion die Fähigkeit des Immunsystems, auf Fremdartigene (z.B. Schaferythrozyten) zu reagieren, vermindert ist. Das Ausmaß der Immunsuppression wird durch die Höhe der Parasitämie bestimmt, d.h., es ist an die Zahl der vorhandenen lebenden Trypanosomen gebunden (RÖLLINGHOFF und ROMMEL, 1994). Als Ursache einer Immunsuppression sehen MITCHELL *et al.* (1986) die Makrophagen an, die einen für

die T-Zellproliferation notwendigen Stimulus, das IL-1 in nur geringer Menge bzw. gar nicht mehr produzieren, noch bevor Parasiten im peripheren Blutstrom überhaupt feststellbar sind. Auch CORSINI *et al.* (1977) vermuteten eine Beteiligung von Makrophagen, aber auch von T-Suppressorzellen an der Immunsuppression. SEED (1972) und MUSOKE *et al.* (1981), sahen in der dauernden B-Zellstimulation, bedingt durch die immer wieder neu angeregte Antikörperproduktion, eine klonale Erschöpfung des B-Zellpotentials.

Antigenvarianz: Trypanosomenpopulationen, die sich in ihren antigenen Eigenschaften unterscheiden und in aufeinanderfolgenden Parasitämiewellen erscheinen, charakterisieren das Phänomen der Antigenvarianz. Zu den wichtigsten Eigenschaften der Trypanosomen zählt ihre Fähigkeit trotz einer parasitenspezifischen Immunantwort im Blut des Wirtes mit Hilfe der Antigenvarianz zu überleben. Das bedeutet, dass sie in der Lage sind ihre Oberflächenantigene (VSA) zu verändern. Ein Wiederanstieg der Parasitenzahl im Blut ist auf die Bildung neuer Trypanosomenpopulationen mit geänderten Oberflächenantigenen zurückzuführen. Die Eliminierung durch spezifische Antikörper wird durch ein Absinken der Erregerdichte charakterisiert. Dadurch entstehen periodisch auftretende Parasitämiewellen. Das Repertoire der Verschiedenen VSGs kann groß sein. So vermutet bereits CAPBERN *et al.* (1977), daß *T. equiperdum* in der Lage ist über hundert Varianten zu produzieren. Die im Gewebe niedrigeren Antikörperkonzentrationen (GOODWIN und GUY, 1973) lassen CROSS (1978) vermuten, daß Gewebeformen der Trypanosomen in der Lage sein könnten, hier ihre Antigene zu ändern und danach wieder in der Blutbahn zurückzukehren. Da IgM schlecht ins Gewebe eindringt, halten auch HUDSON und TERRY (1978) die dort vorhandene niedrige IgM-Konzentration für die Ursache der Antigenvariation.

Antikörper der VSA-spezifischen Immunantwort sind nur gegen die exponierten, variantenspezifischen Epitope des Oberflächenglykoproteins der Trypanosomen gerichtet und führen zur Lysis. Bei der Zerstörung der Trypanosomen oder aber Schädigung des VSGs wird sogenanntes somatisches Antigen frei (CLAUSEN, 1986). Somatische Antigene zeichnen sich dadurch aus, daß sie sowohl bei einer Spezies, ihren verschiedenen Stämmen und daraus entstandenen Varianten, als auch bei verschiedenen Spezies gemeinsam vorkommen (SEED, 1963; DESOWTZ, 1970; DE RAADT, 1974). Bei den somatischen Antigenen soll es um verschiedene

Enzyme, Nukleoproteine (BROWN und WILLIAMSON, 1962; DE RAADT, 1974; SEED, 1974) und strukturelle Proteine handeln, die erst nach dem Absterben der Erreger durch Trypanolyse freigesetzt werden (LUMSDEN, 1967; SEED, 1974). Somatische Antigene werden in erster Linie in der Serodiagnostik eingesetzt, verursachen aber wegen ihrer geringen Artspezifität häufig unerwünschte Kreuzreaktionen, teilweise auch mit apathogenen Trypanosomen der Stercoraria-Gruppe (GRAY, 1960; SADUN *et al.*, 1963; WOO, 1977).

Das Antigenmolekül enthält in der Regel eine Vielzahl von determinierenden Gruppen, die die Spezifität des Antigens bestimmen. So kann ein scheinbar einheitliches Antigen die Bildung von multispezifischen Antikörpern hervorrufen. Antigen wirksame Substanzen werden je nachdem, ob es korpuskuläre oder aber gelöste Antigene sind, vom Empfängerorganismus verschieden behandelt. Während korpuskuläres Antigen zunächst von den Retikuloendothelien oder Makrophagen aufgenommen und in gelöstes, zu einer immunologischen Wirkung befähigtes Antigen umgewandelt werden muß, bedarf gelöstes Antigen dieser Vorbereitung durch die Makrophagen nicht (ROLLE und MAYR, 1978).

2.2.5.2.2 Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) ist ein indirektes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern in Serumproben von Mensch und Tier. Die Spezifität der Reaktion ist von der Reinheit des verwendeten Antigens abhängig. Bei der KBR wird die Tatsache ausgenutzt, daß das aus Einzelfaktoren (C1-C9) bestehende Komplementsystem (C) durch Komplexe aus Antigenen und Antikörpern (bestimmter Klassen) in einem komplizierten, kaskadenartigen Reaktionsprozeß aktiviert wird (MÜLLER *et al.*, 1982). Im Verlauf zahlreicher parasitärer Infektionen kommt es zu einem beträchtlichen Verbrauch von Komplement. Dieses Phänomen ist bei Infektionen mit salivarischen Trypanosomen besonders ausgeprägt, wobei es zu einer Aktivierung des Komplementsystems sowohl auf dem klassischen als auch auf dem alternativen Reaktionsweg kommt (NIELSEN und SHEPPARD, 1977; TABEL, 1982). Die Komplementbindungsreaktion ist eine serologische Technik, bei der zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindungen ein zweites Antigen-Antikörper-System, das sog. hämolytische System, verwendet wird. Es handelt sich um ein indirektes

Verfahren, welches letztlich aus zwei isoliert voneinander ablaufenden Reaktionen besteht. Das Prinzip beruht darauf, daß das Komplement entweder durch spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe gekoppelt und neutralisiert oder durch ein Indikatorsystem bestehend aus Antikörper-beladenen Erythrozyten gekoppelt und aktiviert, was zur Erythrozytenlyse führt und somit eine sichtbare Reaktion hervorruft. Das heißt, während der ersten Phase kommt es zur Bildung von Immunkomplexen, an die sich eine gemessene Menge von Komplement bindet.

In der zweiten Phase wird das Indikatorsystem zugegeben, so daß eine Haemolyse nur eintritt, wenn das Komplement gar nicht (keine spezifischen Antikörper) oder nur teilweise durch entstehende Antigen-Antikörper-Komplexe neutralisiert wird (SELL, 1977)

Die Komplementbindungsreaktion gilt zur Zeit als anerkannter Test im internationalen Handel (OIE prescribed test) für die serologische Untersuchung auf Beschälseuche (OIE, 1996). Die KBR ist weitgehend standardisiert und wird international als Referenzmethode eingesetzt.

Der Test ist bei sehr geringem Materialverbrauch von hoher Sensitivität. Seine Spezifität ist durch die Qualität der Antiseren begrenzt, da eine Absorption durch Bildung Komplementverbrauchender Immunkomplexe nicht möglich ist.

WATSON, (1920) berichtet, daß das Blut die komplementbindende Wirkung von *T. equiperdum* auch bei geheilten Pferden noch monatelang bewahren kann.

PAUTRIZEL *et al.*, (1959) wies die komplementbindenden Antikörper im Serum von Hasen am 3. Tag nach der Infektion mit *T. equiperdum* nach.

CAPORALE *et al.*, (1980) untersuchten in der Region Abruzzi, Italien, Serum von 2841 Pferden und 1958 Esel in der Komplementbindungsreaktion auf Antikörper gegen *Trypanosoma equiperdum*. Für die Untersuchungen wurde von jedem Tier 3 Blutproben in einem zeitlichen Abstand von 20 Tagen gewonnen. Das Mittel positiver Tiere der Gesamtpopulation lag bei 7,4%. Antikörper konnten bei 18,1% der untersuchten Hengste, 6,8% der Stuten, 6,6% der Wallache, 4,5% der Junghengste, 5,4% der Jungstuten und 1,3% der Eselinnen nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikant höheres Risiko an Dourine zu erkranken wurde in Stutenherden nachgewiesen, in denen der Deckhengst auch serologisch positiv war. CAPORALE *et al.* schlossen aus diesen Beobachtungen, daß der Hauptübertragungsweg der

Deckakt ist. Die positiven serologischen Ergebnisse in Wallache und bei nicht geschlechtsreifen Pferden wurde auf eine nicht sexuelle, mechanische Übertragung zurückgeführt (siehe 1.2.3).

2.2.5.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem ELISA entwickelten ENGVALL und PERLMANN (1972), bedingt durch seine hohe Sensitivität, ein empfindliches und einfach durchzuführendes Verfahren. Den Nutzen von enzymmarkierten Antiglobulinen beim Nachweis von Serumantikörpern erkannten auch RUITENBERG und VAN KNAPEN (1977).

Verschiedene Kunststoffe haben die Eigenschaft Proteine fest zu binden. Antigen wird an der Innenwand eines Kunststoffreaktionsgefäßes immobilisiert. Dazu können Polyvinyl- oder Polystyrolröhrchen (Makro-Methode) oder Mikrotiterplatten (Mikro-Methode) verwendet werden (BULLOCK u. WALLS, 1977)

Bei der Durchführung des ELISA wird ein Enzym - eine Peroxidase oder Phosphatase - an das Antiserum gekoppelt. Nach der Inkubation des enzymgekoppelten Antiserums wird ein Substrat-Indikatorsystem, bestehend aus einem Chromogen und einem Katalysator, zugesetzt. Bei positivem Testserum wird das Chromogen zum Farbstoff umgesetzt, dessen Intensität der Antikörperkonzentration proportional ist und visuell oder photometrisch beurteilt werden kann.

WILLIAMSON *et. al.*, (1988) untersuchten 43 Pferde auf Antikörper gegen *T.equiperdum* in verschiedenen serologischen Diagnosemethoden (CATT, ELISA, KBR, IFAT). Nach ihrer Meinung bleibt die KBR eine zuverlässige Nachweismethode für die Dourine, besonders in Ländern, wo andere Mitglieder des Subgenus Trypanozoon nicht vorkommen. Der IFAT kann als zusätzlicher Test herangezogen werden. Die Auswertung ist allerdings subjektiv und die Anzahl der zu untersuchenden Seren ist begrenzt. Der ELISA ist eine nützliche Nachweismethode, geeignet für große Anzahlen von Proben und kann benutzt werden, um die KBR in routinemäßigen diagnostischen Verfahren zu ergänzen.

WASSAL *et. al.*, (1991) haben 689 Pferdeseren auf *T. equiperdum* mit der KBR, IFAT und ELISA vergleichend untersucht. 615 Seren wurden in allen Nachweismethoden als negativ bestätigt. Von den verbleibenden 74 Seren zeigten 15 Seren in jedem Test übereinstimmende positive Antikörper-Titer.

Nach STAAK *et al.*, (1996) ist der ELISA im Vergleich zu KBR und IFAT, der sensitivere Test. Zudem erlaubt er einen hohen Probendurchsatz und eine automatische Auswertung.

Bisher ist es mit keinem serologischen Test möglich, zwischen einer bestehenden und einer erfolgreich therapierten Infektion zu unterscheiden, da die Antikörpertiter noch Monate lang nach der Infektion bestehen bleiben können (NANTULYA, 1990).

2.2.5.3 DNA – Nachweismethoden

Der Nachweis von Trypanosomen im Blut über ihre DNA erfolgt mit Hilfe entsprechender Nukleinsäuresonden entweder durch Hybridisierungsanalyse oder mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (MOSER *et al.*, 1989)

Molekularbiologische Nachweisverfahren, die DNA als Zielmolekül verwenden, beruhen auf einer einzigartigen Eigenschaft dieser Substanz: DNA ist doppelsträngig, und sie wird bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt und dadurch vermehrt. Der entscheidende Faktor hierbei ist die spezifische Bindungsfähigkeit zwischen den heterozyklischen Nukleotiden der DNA-Kette. Diese Basenpaarung folgt auf Grund chemischer Wechselwirkungen einer ganz strengen Gesetzmäßigkeit: Adenin (A) paart mit Thymin (T) und Guanin (G) paart mit Cytosin (C). An Hand der Sequenz der verschiedenen Bausteine und ihrer Affinität zueinander können spezifische DNA-Abschnitte nachgewiesen werden. Dazu werden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß sich die jeweiligen Partnerstränge bei genügend hoher Temperatur entweder trennen oder bei niedriger Temperatur wieder zueinander finden. Die Grundlage eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens ist somit die Affinität der DNA-Einzelstränge zu dem jeweiligen komplementären Partner (HIRSCH-KAUFFMAN und SCHWEIGER, 1992).

Am Anfang der molekularbiologischen Nachweismethoden wurden DNA-Sonden verwendet. Bei den DNA-Sonden handelte es sich um relativ große DNA-Abschnitte,

mit deren Hilfe an Hand von Hybridisierungsreaktionen charakteristische Zielsequenzen in Nukleinsäure-Extrakten von Proben nachgewiesen werden können. Heutzutage nun konzentrieren sich die Arbeiten zum schnellen Nachweis von Trypanosomen auf den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2.2.5.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt und hat, wie die DNA-Sequenzierung, die Molekulargenetik revolutioniert. Die PCR ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen (Primer) eingerahmt werden, vervielfältigen kann (WATSON *et al.*, 1993). Das Prinzip der PCR beruht auf der Doppelsträngigkeit des DNA-Moleküls und den Gesetzmäßigkeiten der komplementären Basenpaarung. Dadurch wird es möglich, daß DNA-Abschnitte in einer enzymatischen Reaktion beliebig häufig vermehrt werden können. Die PCR verläuft in drei Teilschritten: zuerst muß der DNA-Doppelstrang durch Hitzedenaturierung denaturiert werden (Denaturation), danach lagern sich Primer (Oligonukleotide) an bestimmten, zu ihrer eigenen Basensequenz komplementären Stellen an (Annealing) und durch eine Polymerase wird an den vorhandenen DNA-Einzelstrang ein komplementärer DNA-Strang in Richtung des 3'-Endes synthetisiert (Extension). Es wird eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) verwendet, um die Zerstörung der Polymerase bei der Hitzedenaturierung zu vermeiden. Jeder dieser Schritte besitzt ein Temperaturoptimum. Der gesamte Zyklus - Erhitzen zur Trennung der Stränge, binden der Primer und Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase - wiederholt sich 30-35 mal. Als Ergebnis dieser drei Teilschritte aus "Denaturierung", "Annealing" und "Extension" verdoppelt sich die Zahl der Zielabschnitte pro Zyklus (WATSON *et al.*, 1993). Nach der Amplifizierung kann der vervielfältigte DNA-Abschnitt (=DNA-Produkt) durch Elektrophorese von den übrigen Reaktionspartnern getrennt und so sichtbar gemacht werden.

Für eine PCR benötigt man nur eine sehr geringe Menge an z.B. parasitärer DNA um ein positives Ergebnis zu erhalten. MOSER *et al.*, (1989) gelang bei *T. b. brucei* wie auch bei *T. congolense* mit jeweils spezie-spezifischen Primern der Nachweis eines einzelnen Trypanosomen im Untersuchungsansatz. KANMOGNE *et al.*, (1996)

konnten in *T. b. gambiense* infizierten Patienten noch 25 Parasiten pro ml Blut nachweisen.

WUYTS *et al.*, (1994) untersuchten die Sensitivität der PCR auf *T. evansi* nach verschiedenen Extraktionsmethoden. Sie benutzten gereinigte, trypanosomale DNA (*T. evansi*) und konnten eine deutliche Bande bei einem Gehalt von 0,5 pg (Piko- Gramm) pro Reaktionsansatz zeigen. Experimentell beimpften sie Proben mit lebenden Trypanosomen und konnten auch einen Parasiten pro Reaktionsansatz (= 10 µl) nachweisen. In einem experimentell mit *T. evansi* infizierten Rind konnten sie am 2.Tag nach der Infektion in der PCR trypanosomale DNA darstellen, während Trypanosomen erst am 4. Tag p.i. mikroskopisch im Blut nachzuweisen waren.

CLAUSEN *et al.*, (1999) führten Untersuchungen über das Vorkommen der Beschälseuche in der Provinz Bale, Ethiopien durch. Insgesamt wurden 121 Pferde mit Verdacht auf Beschälseuche klinisch, parasitologisch und serologisch untersucht. Klinische Symptome waren am häufigsten Ataxien der Hinterhand (76%), Schwellungen der externen Genitalien (48,8%) und verstärkte Abmagerung (39,7%). Mit der HCT konnten weder im Blut noch in Präputial- / Vaginalspülproben, noch in subkutaner Gewebeflüssigkeit Trypanosomen dargestellt werden. In serologischen Untersuchungen auf Antikörper gegen Trypanosomen zeigten 34 Seren (28,3%) in der KBR und 51 Seren (42,5%) im ELISA positive Ergebnisse.

Von den 121 Pferden wurden 104 Tiere mittels der PCR auf trypanosomale DNA untersucht. In der PCR waren 23 von den 104 untersuchten Proben positiv. In einer anschließenden Hybridisierungsanalyse wurden 29 Proben positiv bewertet. Die PCR Ergebnisse stimmten mit den serologischen (KBR und/oder ELISA) Ergebnisse insoweit überein, als daß alle PCR positive Tiere auch serologisch positive Ergebnisse zeigten. Des weiteren korrelierten PCR positive Ergebnisse mit dem klinischen Befund "Schwellung der externen Genitalien". Die Autoren schließen, daß die PCR eine empfindliche Diagnosemöglichkeit für den Nachweis aktiver Trypanosomen-Infektionen bietet.