

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Das Ziel der Arbeit war die Ermittlung der serologischen Prävalenz von *T. equiperdum*-Infektionen in Pferdeherden im Zentral Aimak der Mongolei mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR) und des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die gewonnenen Daten sollen einen Beitrag zur Abschätzung des Ausmaßes der Infektionsintensität und -extensität der Beschälseuche bei Pferden im Zentral Aimak liefern.

5.1 Herdenuntersuchung

Von Anfang Mai bis Ende Juli 2000 wurden in 26 Kreisen des Zentral Aimak 119 Pferdeherden untersucht. Die Herdenbesitzer/-halter wurden über Herdengröße, Nutzungsart, Weiden und Erkrankungen befragt. Der Ernährungszustand der Herden wurde beurteilt.

Eine durchschnittliche Pferdeherde in meiner Studie hatte eine Größe von 33 Tieren (2 Hengste, 13 Stuten, 4 Fohlen und 14 Jungtiere und Wallache). Vergleichende Angaben über durchschnittliche Herdengrößen bei Pferden in der Mongolei liegen in der Literatur nicht vor.

Der Ernährungszustand wurde bei 17,6% der Herden als schlecht, bei 51,3% als mittelmäßig und bei 31,1% als gut klassifiziert. Besonders auffällig waren die Herde Nr. 32 im Nordosten und die Herde Nr. 57 im Südwesten des Zentral Aimaks. Alle Pferde dieser Herden waren hochgradig kachektisch, bzw. abgemagert. Laut Angaben der Besitzer traten bei Stuten dieser Herden vermehrt Aborte auf.

Insgesamt berichteten Besitzer von 54 Herden über ein gehäuftes Vorkommen von Aborten. Zwei Herdenbesitzer berichteten über Todgeburten. Des Weiteren wurde vermehrt über Nasenausfluß, Husten und Zeckenbefall berichtet. Die Tierbesitzer/-halter machten für die hohen Tierverluste, für die schlechte Ernährung ihrer Herden und für das gehäufte Vorkommen von Aborten den strengen Winter von 1999/2000 mit Minusgraden von bis zu 50°C verantwortlich. CHULUUNBAATAR (1997)

berichtete, daß im Winter durch extreme Kältebedingungen (bis zu Minus 40°C) die Pferde in der Mongolei allgemein 20-25% ihres Körpergewichtes verlieren. Mongolische Pferde seien jedoch in der Lage, im Sommer und Herbst dieses verlorene Gewicht wieder zu kompensieren. Der Winter 1999/2000 war allerdings besonders kalt und lang, so daß die von den Tierbesitzern berichteten Verluste an Pferden, der sehr schlechte Ernährungszustand in einigen Herden und das gehäufte Vorkommen von Aborten im wesentlichen auf die extremen klimatischen Bedingungen zurückzuführen sind. Hinsichtlich Aborte werden neben Ursachen infektiöser Natur in der Fachliteratur auch extreme klimatische Bedingungen und damit oft einhergehender Futtermangel für Aborthäufigkeiten verantwortlich gemacht (WINTZER, 1997). Außer extremen Winter berichteten die Tierhalter über eine Überweidung der Weideflächen. Berichte von der GTZ (1999) sowie vom Bezirksveterinäramt im Zentral Aimak bestätigen diese Information. In den letzten Jahren sind aufgrund von Zuwanderungen neuer Tierhalter aus anderen Bezirken (in Folge der Privatisierung der Landwirtschaft) die Weideflächen im Zentral Aimak knapp geworden.

Weiterhin auffällig war, daß Herden, die zu Beginn der Untersuchungen aufgesucht wurden (also im Mai 2000, zu Beginn der Vegetationsperiode) in einem wesentlich schlechteren Ernährungszustand waren, als die Pferdeherden, die zum Ende der Untersuchungen (im Juli, gute Weiden) besucht wurden. Hier scheint sich zu bestätigen, daß die Pferde, die den strengen Winter überlebt haben, sich recht schnell wieder erholen. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, daß neben saisonalen Einflüssen, auch Unterschiede in der Vegetation an den unterschiedlichen Untersuchungsstandorten hierfür mit verantwortlich zu machen sind.

In zwei Kreisen, westlich von Ulaanbaatar gelegen, wurden bei einigen Pferden punktförmige, noduläre Hautverdickungen auf der gesamten Körperoberfläche beobachtet, die vermutlich auf Bremsenstiche (Tabaniden) zurückzuführen sind.

5.2 Einzeltieruntersuchung

Für die Untersuchung wurden 10 Pferde pro Herde, proportional zur Verteilung der Tierklassen (Fohlen bis 1 Jahr, junge Stuten bis zu einem Fohlen, ältere Stuten mit mehr als einem Fohlen und deckfähige Hengste) in der Herde, ausgewählt.

Der Ernährungszustand wurde nur von jungen und älteren Stuten sowie von den Hengsten beurteilt, da Fohlen gerade geboren oder nur erst ein paar Monate alt waren. Hierbei wurde der Ernährungszustand zu 14,2% als schlecht, zu 74,2% als mittel und zu 11,2% als gut klassifiziert. Die Angaben der Besitzer über den Reproduktionszustand aller untersuchten Stuten zeigten, daß 18,2% Aborte hatten, 22,6% waren zum Untersuchungstermin nicht tragend, 7,7% tragend und 51,5% hatten ein Fohlen. Ähnliche hohe Abortraten wurden in einem Bericht der GTZ (1999) in Stuten- und Ziegenherden im Zentral Aimak berichtet. In 10 bzw. 11 von 24 Betrieben wurden bei Stuten und Ziegen Abortraten von 20-40% registriert.

Von den insgesamt von mir untersuchten Stuten wurden bei einem Tier der Herde Nr. 44 kleine winzige Bläschen auf der Schleimhaut der Vulva und bei zwei Stuten aus den Herden Nr. 43 und Nr. 32 Ausfluß aus der Vagina entdeckt. Bei einem Hengst aus der Herde Nr. 32 wurde an der rechten Flanke eine ca. faustgroße, subkutane ödematöse Verdickung beobachtet. Das Skrotum des Tieres war gleichmäßig geschwollen.

Von den 1190 Einzeltieruntersuchungen wurden von mir nur bei 4 Pferden eine auffällige klinische Symptomatik beobachtet, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Beschälseuche (subkutane, ödematöse Schwellungen; Schwellung der externen Genitalien; Scheiden- und Präputialausfluß) beschrieben wird.

WATSON (1920) berichtet, daß ein "Talerfleck" bei der Beschälseuche ein seltenes Symptom ist, und nur in verhältnismäßig wenigen Fällen beobachtet wird. HOARE (1972) und BARROWMAN (1976) ermittelten, daß die Erkrankung fast immer chronisch verläuft und in milden Fällen 1-2 Jahre dauert, eine Selbstheilung kann sich daran anschließen. Nach CURRASON (1943) und HOARE (1972) sind einheimische Pferdeherden meistens subklinisch oder nur wenig betroffen und gelten

als symptomlose Träger. Inkoordination der Bewegung der Hinterbeine sowie "Talerflecke" wurden in dieser Studie nicht beobachtet.

5.3 Blutausstriche

Das Blut der Pferde, die in der KBR und/oder ELISA auf Beschälseuche serologisch positiv reagierten und von denen ein Blutausstrich vorlag (=20 Pferde) wurde von mir mikroskopisch auf Trypanosomen untersucht. Es konnten in keinem Fall Trypanosomen dargestellt werden. MAREK und MANNINGER (1952) berichten, daß im Blut *T. equiperdum* nur während der Fieberanfälle und häufig auch dann nur in so spärlicher Zahl vorhanden sind, daß sie selbst bei der Untersuchung im Dicken Tropfen unentdeckt bleiben. Nach HIEPE (1983) gelingt der Nachweis im gefärbten Blutausstrich oder im Dicken Tropfen nur in starken parasitärischen Phasen, die periodisch, verbunden mit Fieber, auftreten.

5.4 Serologische Untersuchungen

Die 1122 gewonnenen Seren wurden mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) und mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht.

Die serologische Untersuchung mittels der KBR erbrachte einen positiven Nachweis von *T. equiperdum*-Antikörpern bei 7,3% (85 Seren) der untersuchten Pferde. Der Großteil der in der Untersuchung eingeschlossenen Tiere war weiblich; Antikörper konnten bei 8,3% der untersuchten jungen und älteren Stuten, bei 6,4% der Hengste und bei 4,9% der Fohlen nachgewiesen werden. HIEPE und JUNGSMANN (1983) und STAAK *et al.* (1996) betonten, daß die Diagnose auf *T. equiperdum* wesentlich auf immundiagnostischer Basis mittels der Komplementbindungsreaktion geführt wird. Sie gilt als gattungsspezifisch und erlaubt demnach allerdings keinen Aufschluß über die Trypanosomenart.

Auch WILLIAMSON *et al.* (1988) berichten, daß die KBR eine zuverlässige Nachweismethode für die Dourine ist, besonders in Ländern, wo andere Mitglieder des Subgenus Trypanozoon nicht vorkommen.

KBR-Titer werden ca. 3 Wochen post infectionem, gelegentlich auch später, positiv und bleiben über Monate, bzw. Jahre bestehen. Fohlen infizierter Stuten können durch passiv übertragene, kolostral gebundene Antikörper, bis zu 18 Monate post partum in der KBR positiv reagieren (HIEPE und JUNGMANN, 1983; STAAK *et al.*, 1996).

Da die Pferde in den von mir untersuchten Herden natürlich infiziert waren und mit wenigen Ausnahmen keine besonderen klinischen Symptome zeigten, konnte in dieser Studie zwischen einem akuten und einem chronischen Krankheitsverlauf nicht unterschieden werden. WATSON (1920) konnte auch bei geheilten Pferden noch monatelang die komplementbindende Wirkung im Blut nachweisen.

Auffallend war, daß in den Herden, in denen Stuten serologisch positiv reagierten, auch serologisch positive Hengste vorhanden waren. Ähnliche Beobachtungen wurde auch von CAPORALE *et al.* (1980) gemacht.

Zur Abklärung, ob der ELISA als alternative Methode zur KBR für die Bestimmung der Beschälseuche eingesetzt werden kann, wurde ein Methodenvergleich durchgeführt. Für die Durchführung des ELISA spricht u.a., daß nur eine geringe Antigenmenge benötigt wird. Nach WILLIAMSON *et al.* (1988) ist der ELISA ein nützliches diagnostisches Verfahren, um die KBR zu ergänzen. Der ELISA erlaubt nach STAAK (1996) eine automatische Auswertung und einen hohen Probendurchsatz.

Der Vergleich der Ergebnisse der beiden serologischen Methoden zeigte bei den untersuchten Tieren eine gute (96%) diagnostische Übereinstimmung. 1017 negative und 55 positive KBR-Reagenten wurden im ELISA bestätigt. 30 positive KBR-Reagenten und 20 negative KBR-Reagenten fanden im ELISA keine Bestätigung. Diese partielle Nicht-Übereinstimmung könnte auf den Einsatz unterschiedlicher Antigenpräparationen, bzw. auf den Nachweis von unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen in den beiden Testverfahren begründet sein. In der KBR wurde eine Trypanosomensuspension eingesetzt, die aus löslichem und korpuskulärem Antigen bestand. Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurde dagegen nur lösliches (=somatisches) Extraktantigen von *Trypanosoma equiperdum* verwendet. Im ELISA

wurde ein IgG spezifisches Konjugat eingesetzt. In der KBR werden neben IgG- auch IgM-Antikörper nachgewiesen (STAAK *et al.*, 1996).

Bei der Interpretation der serologischen Daten ist zu berücksichtigen, daß bei der KBR und ELISA Grenzwerte anhand von nicht-infektionsexponierten Tieren aus Deutschland („nicht-endemische Kontrollen“) zu Grunde gelegt wurden.

5.5 PCR-Untersuchungen

Im Anschluss an die serologischen Untersuchungen wurden die Vollblutproben der Pferde aus der Mongolei mittels der Polymerasekettenreaktion auf trypanosomale DNA untersucht. Zur Amplifikation von *T. equiperdum*-DNA in den Vollblutproben wurden die von MOSER *et al.* (1989) beschriebenen Primer (TBR 1/2) verwendet. Diese Primer erlauben einen Nachweis von Trypanosomenarten der Untergattung *Trypanozoon* (d.h. ein subgenus-spezifischer, aber nicht subspezies-spezifischer Nachweis ist möglich).

Für die PCR-Untersuchungen wurden Herden nach den Ergebnissen der KBR und des ELISA ausgewählt. Es wurden die Herden untersucht, in denen wenigstens 3 Tiere (3/10) serologisch (KBR+ und/oder ELISA+) positiv reagierten. 13 Herden (d.h. 130 Tiere) wurden derart in der PCR untersucht. Von den 130 Vollblutproben dieser Herden reagierten 8 Proben in der PCR positiv. Fünf von den 8 Tieren waren dabei vorab sowohl in der KBR als auch im ELISA positiv gewesen.

Ähnliche Ergebnisse werden auch aus Äthiopien von CLAUSEN *et al.* (1999) berichtet: Alle dort untersuchten und PCR-positiven Pferden waren auch serologisch (KBR und/oder ELISA) positiv.

Ein PCR-positives Ergebnis ist nach WUYTS *et al.* (1999), CLAUSEN *et al.* (1999) und BENGALY *et al.* (2001) auf eine aktive Infektion oder auf eine nur wenige Tage zurückliegende Infektion (im Falle einer Behandlung) mit Trypanosomen zurückzuführen. Die Autoren berichteten, daß wenige Stunden, bzw. 3-4 Tage nach erfolgreicher Therapie experimenteller Trypanosomen-Infektionen, im Vollblut von Rindern bzw. Schafen, mit der PCR keine DNA mehr zu amplifizieren war.

5.6 Vergleichende Betrachtung der positiven Reagenten mit der klinischen Symptomatik

Bei der klinischen Untersuchung der Pferde wurde nur bei einem Hengst eine subkutane, ödematöse Hautverdickung und ein gleichmäßig geschwollenes Skrotum beobachtet. Die Untersuchungsprobe von diesem Hengst reagierte in der KBR negativ, aber im ELISA und in der PCR positiv.

Drei Stuten mit Ausfluß aus der Vulva reagierten serologisch positiv, aber in der PCR negativ. Zur Auslösung einer serologisch nachweisbaren humoralen Immunantwort sind nur wenige Trypanosomen notwendig. CLAUSEN (1993) inokulierte nicht teilungsfähige aber lebende Trypanosomen intravenös in ausgewachsene Rinder. Schon nach Gabe von 10^6 Trypanosomen pro Rind konnten in 7 von 8 Rindern am 4. bis 6. Tag nach der Inokulation lytische Antikörper im Komplement-vermittelten Lysistest nachgewiesen werden.

Die geringe Anzahl an PCR-Reagenten in den serologisch auffälligen Herden spricht für das Vorkommen von Trypanosomen-Infektionen mit niedrigen Parasitämien, wie sie für einen chronischen Infektionsverlauf beschrieben werden. Für den positiven Nachweis in der PCR wird pro Untersuchungsansatz wenigstens ein Parasit benötigt. Aufgrund der beschriebenen Antigenvarianz und der Ansiedlung von *T. equiperdum* in extravaskulären Räumen, kommt es jedoch zu langen aparasitämischen Phasen.

Vier Pferde mit punktförmigen Hautverdickungen, die vermutlich auf Bremsenstiche zurückzuführen waren, reagierten in allen Nachweismethoden positiv. Wie in der Literatur beschrieben (HOARE, 1972) sind Tabaniden hauptverantwortlich für die mechanische Übertragung von *T. evansi* bei Rindern, Büffeln, Pferden und Kamelen in Asien (BARROWMAN, 1976).

Auffällig ist, dass serologische- und/oder PCR- Reagenten entweder in einem schlechtem Ernährungszustand waren oder einen Abort hatten. Kräfteverlust, Abmagerung und Reproduktionsstörungen, einschließlich Aborte, werden für

Infektionen mit *T. equiperdum* (MAREK und MANNINGER, 1952; HOARE, 1972), aber auch für Infektionen mit *T. evansi* bei Pferden (STEPHEN, 1986) beschrieben.

5.7 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

Die serologischen KBR- und ELISA-Ergebnisse (Antikörperprävalenz von ca. 7%) und der Nachweis trypanosomaler DNA in den Vollblutproben einiger Pferde bestätigen das Vorkommen von vereinzelt Trypanosomen-Infektionen in den Pferdeherden des Zentral Aimak der Mongolei. Da diese beiden serologischen Verfahren und auch die PCR (CLAUSEN *et al.*, 1999) zur Zeit keine Unterscheidung zwischen den Subspezies *T. equiperdum* (Erreger der Beschälseuche, mechanische Übertragung durch den Deckakt) und *T. evansi* (Erreger der Surra, mechanische Übertragung durch Stechfliegen, z.B. Tabaniden) erlauben, kann keine eindeutige, abschließende Diagnose geführt werden. Aufgrund der klinischen Befunde, der negativen parasitologischen Ergebnisse und der Konzentrierung auffälliger Seroprävalenzen auf vereinzelte Herden, besteht begründeter Verdacht, daß es sich hierbei um Infektionen mit dem Erreger der Beschälseuche handelte. Zur Abklärung dieser Frage sollten weiterführende Untersuchungen in den Herden mit einer erhöhten Zahl an serologischen, bzw. PCR-Reagenten geführt werden (Folgeuntersuchungen, Erregerisolierung und molekularbiologische Charakterisierung des Erregers).