

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

Mit den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation sollte die Eignung der PCR und DNA-Sondenhybridisierung zur Überprüfung der Wirksamkeit von Isometamidium und Diminazen gegen pathogene Trypanosomenspezies in natürlich infizierten Rindern in Burkina Faso beurteilt werden. Der Ergebnisvergleich zwischen molekularbiologischer und parasitologischer Diagnostik von Rinderblutproben vor und nach dem Trypanozideinsatz diente als Beurteilungsbasis.

Im Hinblick auf eine mögliche Vereinfachung und Kostenreduzierung der PCR wurden außerdem Versuche mit der Multiplex-PCR in die Dissertation aufgenommen.

#### 3.2 UNTERSUCHUNGSGEBIET

Die Provinz Kénédougou liegt im Südwesten von Burkina Faso (Abb. 3.1). Im Norden und Westen verläuft ihre Grenze gemeinsam mit der Landesgrenze zu Mali; im Osten grenzt sie an die Provinzen Kossi und Houet und im Süden an die Provinz Léraba. Sie umfasst ein Gebiet von 8265 km<sup>2</sup>, was ungefähr 3% des nationalen Territoriums entspricht (OUÉDRAOGO, 2001). Die Region Kénédougou als solche erstreckt sich über eine Fläche von ca. 60.000 km<sup>2</sup> (OUÉDRAOGO, 2001). 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 Westafrikas. Charakteristisch für diese Vegetationszone sind Feuchtsavannen mit reichem Busch- und Baumbestand, Galeriewälder entlang von Flüssen, permanent feuchte Täler oder Senken und schließlich wenige Flecken dichter Waldbestände. Die Jahresniederschläge zwischen 1.000 und 1.200 mm fallen nahezu ausschließlich in der Regenzeit von Mai bis Oktober mit einer Spitze der Regenfälle im August (JEUNE AFRIQUE, 1998). 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 Infestation mit Tsetsefliegen.

Die Provinz Kénédougou ist in vier Zonen (N'Dorola im Norden, Samorogouan im Zentrum, sowie Koloko und Orodara im Südwesten bzw. Südosten) und weiter in 13 Départements unterteilt. Dem Ergebnis der letzten Volkszählung zufolge leben 198.936 Menschen in der Provinz, wovon der größte Teil Landwirtschaft betreibt (OUÉDRAOGO, 2001). Laut einer Umfrage (OUÉDRAOGO, 2001) sind über 71% der landwirtschaftlich Erwerbstätigen Ackerbauern, während der übrige Teil von der Viehzucht lebt. Ein großer Anteil der kultivierten Flächen wird, insbesondere im Norden, für den Baumwollanbau genutzt. Daneben werden traditionelle Getreidearten wie Hirse, Sorghum und Mais großflächig angepflanzt. In

geringerem Umfang erfolgt der Anbau von Knollenfrüchten (besonders Yams und Süßkartoffeln), Reis, Niébé (eine Buschbohnenart), Erdnüssen u.a.. Die Vermarktung von Obst stellt darüber hinaus eine bedeutende Sekundäraktivität dar.

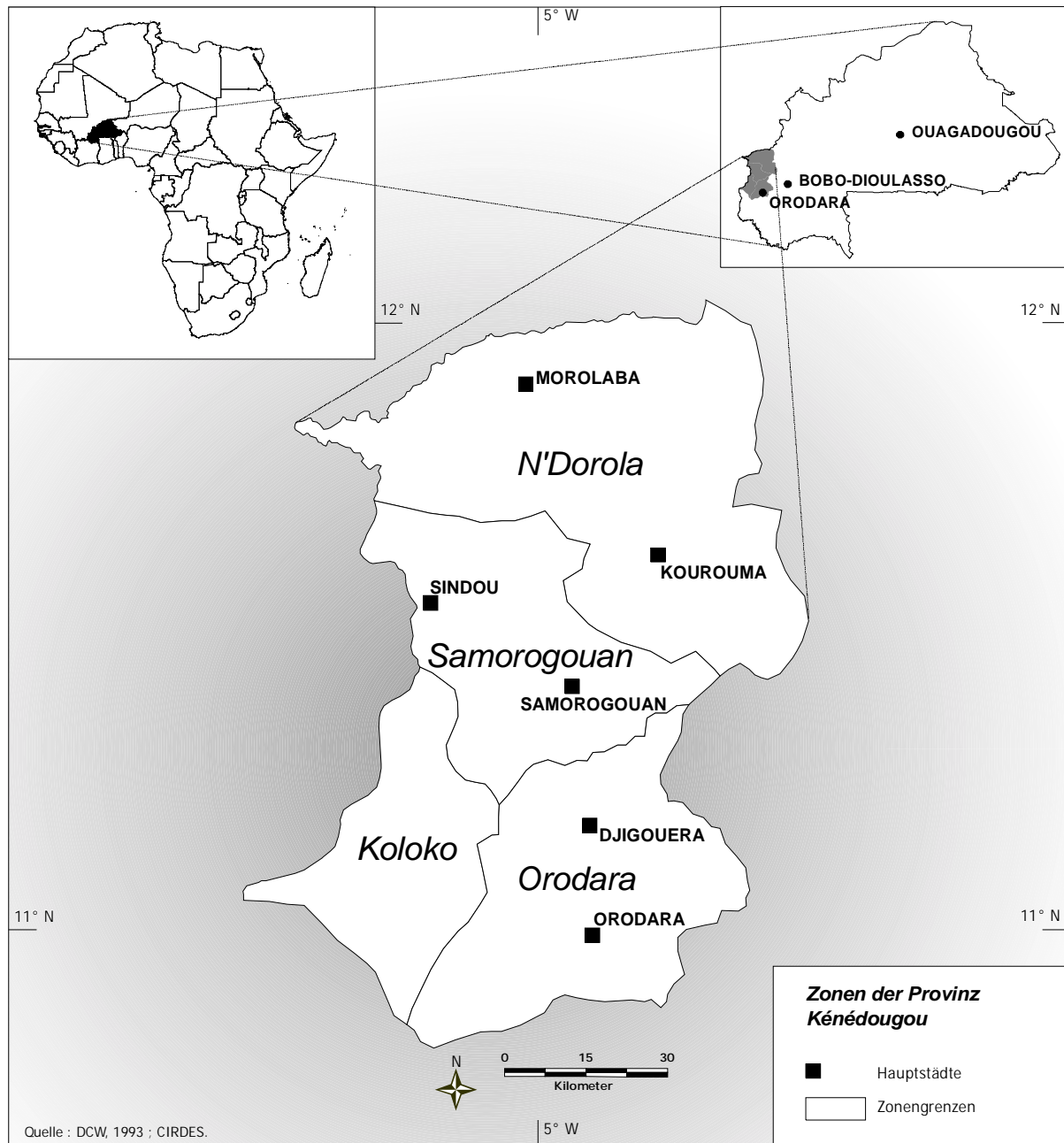


Abb. 3.1 : Die Provinz Kénédougou im Südwesten von Burkina Faso

Der Viehbestand in der Provinz Kénédougou wurde 1997 auf 60.945 Rinder, 48.109 Schafe und 33.735 Ziegen beziffert (OUÉDRAOGO, 2001). Die Größe der Rinderherden ist in allen vier Zonen der Provinz variabel. Die durchschnittliche Kopfzahl pro Herde beträgt in N'Dorola 74, in Samorogouan 110, in Koloko 67 und in Orodara 23 (OUÉDRAOGO, 2001). In der Regel sind die Herden im Norden größer als im Süden. Sie setzen sich zu unterschiedlichen

Anteilen aus reinrassigen Zebus und Baoulés, größtenteils jedoch aus Kreuzungen dieser beiden Rassen zusammen. Die trypanotoleranten Baoulés machen nur etwa 10% des gesamten Bestandes aus. Laut TANO (1998) bevorzugen viele Tierhalter das Zebu gegenüber dem Baoulé aufgrund seiner besseren Milchleistung, Fruchtbarkeit und Gewichtszunahmen, sowie seiner besseren Eignung als Zugtier. Im Norden und im Zentrum der Provinz ist der Herdenanteil der Zebus größer als im Süden. Dieses Phänomen hängt mit dem abnehmenden Trypanosomoserisiko im Norden zusammen.

Die Bedeutung der Rinder als Zugtiere für die Bodenkultivierung ist ebenso unschätzbar, wie für die Gewinnung von Nahrungsmitteln - d.h. insbesondere von Milch und Milchprodukten. Über 70% der Bauern der Provinz setzen Rinder als Zugtiere für die Bewirtschaftung ihrer kompletten Ackerfläche ein, während weitere 10% wenigstens die Hälfte ihrer Ackerfläche mit Hilfe von Rindern bestellen (OUÉDRAOGO, 2001).

Außer der Trypanosomose zählen die Lungenseuche, die Tuberkulose, andere Parasitosen und durch Zecken übertragene Krankheiten zu den häufigsten sowie ökonomisch bedeutsamsten Erkrankungen der Rinder. Zur Behandlung kranker Tiere werden in der Regel staatliche oder private Veterinäre oder sog. „Vaccinateurs“ als kompetente Personen gerufen. Der Missbrauch der gebräuchlichen billigeren Pflanzenschutzmittel für den Baumwollanbau zur Behandlung von Rindern gegen Zecken ist dennoch keine Seltenheit. Berichte über Intoxikationen bei Rindern liegen gehäuft vor. Die Nähe der Grenze zu Mali erleichtert darüber hinaus einen beachtlichen unkontrollierten Tierarzneimittelstrom aus dieser Richtung, was zur verbreiteten Anwendung von Produkten minderer Qualität bzw. völlig unwirksamer Stoffe führt (OUÉDRAOGO, 2001).

### **3.3 BESCHREIBUNG DES BMZ PROJEKTES**

#### **3.3.1 Ziele des BMZ-Projektes**

Im Folgenden soll das BMZ special project (BMZ; PN 97.7860.6-001.00), in dessen Rahmen die Untersuchungen dieser Arbeit stattfanden, skizziert werden. Es lief unter dem Arbeitstitel: „FELDESTUDIEN ÜBER DIE VERBREITUNG UND BEDEUTUNG VON CHEMORESISTENTEN TRYPANOSOMENINFEKTIONEN BEI RINDERN UND DEREN EINFLUSS AUF MARKTORIENTIERTE PRODUKTIONSSYSTEME IN DER SÜDLICHEN GUINEAZONE WESTAFRIKAS“.

Projektdesign und -umsetzung gründeten auf der Zusammenarbeit mehrerer Institutionen - namentlich des Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumid (CIRDES) in Bobo Dioulasso, Burkina Faso, des International Livestock Research Institute (ILRI) in Nairobi, Kenia, und des Instituts für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der Freien Universität Berlin (FU-Berlin). Daneben kooperierten einige nationale Institutionen, wie das Programme National de Gestion des Terres (PNGT), eine Abteilung des Ministère de l'Agriculture et des Ressources Animales, und der Service Provincial de

l'Élevage et des Ressources Animales (SPRA) bei der Durchführung der Feldstudien in der Provinz Kéné Dougou vor Ort.

Die wichtigste Zielsetzung des Projektes war es, das Vorkommen und die Verbreitung chemoresistenter Trypanosomeninfektionen bei Rindern in der Provinz Kéné Dougou festzustellen und deren Einfluss auf die Tierproduktion anhand messbarer Parameter (Hämatokrit und Gewichtsentwicklung) zu beurteilen. Weiterhin sollten die Faktoren, welche zur Entstehung und Permanenz chemoresistenter Trypanosomeninfektionen führen, ermittelt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten im Anschluss dazu dienen, die Bekämpfungsstrategien für chemoresistente Infektionen bei Rindern zu optimieren.

Für die Feldstudien in Burkina Faso wurde aus mehreren Gründen die Provinz Kéné Dougou ausgewählt: 1) Die landwirtschaftliche Entwicklung dieser endemischen Region ist aufgrund ihres hohen Agrarpotentials für das Land von besonderem Interesse. 2) Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass chemoresistente Trypanosomen in der Provinz Kéné Dougou vorkommen (PINDER & AUTHIE, 1984; CLAUSEN *et al.*, 1992). 3) Es wurden beträchtliche lokale Unterschiede in der Ausprägung der Chemoresistenz festgestellt (PINDER & AUTHIE, 1984). Die Provinz erschien deshalb ein besonders attraktives Untersuchungsgebiet für die Aufklärung lokaler Empfindlichkeitsunterschiede von Trypanosomenpopulationen gegenüber den eingesetzten Medikamenten zu sein.

### 3.3.2 Untersuchungsplan des BMZ-Projektes

Eine anfängliche **Querschnittsstudie (Cross-sectional study, CSS)**, Juni - August 1998, sollte der schnellen Übersicht über die epidemiologische Situation in der gesamten Provinz dienen. In die CSS waren 2000 zufällig ausgewählte Rinder aus Herden von 45 Dörfern aller vier Zonen integriert (Abb. 3.2).

Nach den Angaben des Boden- und Wasseramtes gab es zum Planungszeitpunkt 166 Dörfer in der Provinz, wovon jedes dritte Dorf (ausgenommen die Dörfer ohne bzw. mit unbedeutender Rinderhaltung) in die Studie aufgenommen wurde. Die Auswahl der Rinder erfolgte wiederum nach einem bestimmten Stichprobenschlüssel (MCDERMOTT, 2000).

Von jedem Rind wurden Alter, Rasse, Geschlecht und Allgemeinzustand protokolliert, der Hämatokritwert gemessen, und eine parasitologische Untersuchung auf Trypanosomen mit der Buffy-coat Technik (BCT) (Kap. 2.4.1.3) durchgeführt. Darüber hinaus fanden in der gesamten Provinz entomologische und sozioökonomische Erhebungen statt.

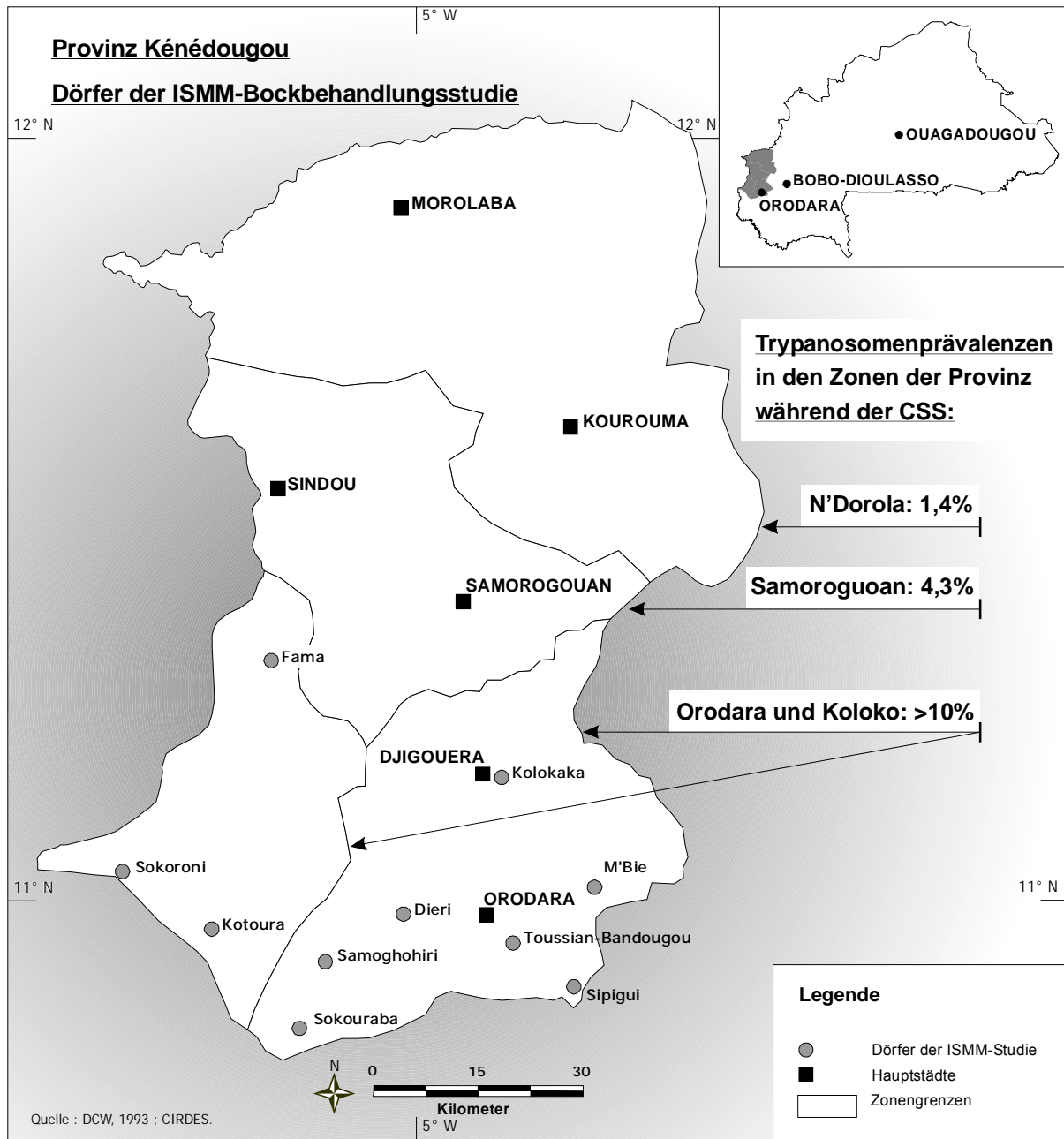
Der CSS folgte die in den beiden südlichen Zonen durchgeführte **Isometamidium-Blockbehandlungsstudie (ISMM-Studie)**, November 1998 - Februar 1999, welche eine Beurteilung der Häufigkeit von Behandlungsversagen nach einer ISMM-Prophylaxe von Rindern ermöglichen sollte. Basierend auf den Ergebnissen der CSS wurden die Zonen Orodara und Koloko aufgrund der dortigen hohen Trypanosomenprävalenzen als

Untersuchungsgebiete bestimmt. Alle Dörfer mit einer Prävalenz von >10% gemäß den Ergebnissen der CSS wurden in die ISMM-Studie aufgenommen. Außer diesen neun südlich in den beiden Zonen gelegenen Dörfern wurde ein im Norden der Zone Koloko gelegenes Dorf mit niedriger Prävalenz ausgewählt (Abb. 3.3). Letzteres interessierte wegen seiner in früheren Untersuchungen des CIRDES festgestellten Resistenzsituation. Dem dortigen Nachweis chemoresistenter Trypanosomen war eine lokale Tsetse-Bekämpfungsaktion durch das CIRDES gefolgt (BAUER *et al.*, 1995).



Abb. 3.2: Die für die Querschnittsstudie ausgewählten 45 Dörfer der Provinz Kénédougou

In die ISMM-Studie wurden insgesamt 738 Rinder aufgenommen. Sie stammten aus Herden, deren Umfang zwischen 25 und 130 Tieren variierte, wobei die meisten Herden aus rund 80 Tieren bestanden. Darunter befanden sich die Rinder, welche schon in der CSS untersucht worden waren (WOITAG, 1999). Darüber hinaus wurden die Untersuchungsherden möglichst mit Jungtieren und männlichen Rindern aufgefüllt, um eine gleichmäßigere Alters- und Geschlechtsverteilung als in der CSS zu erreichen, wo größtenteils adulte, weibliche Rinder untersucht worden waren.



**Abb. 3.3 :** Lage der für die ISMM-Blockbehandlungsstudie ausgewählten 10 Dörfer in den Zonen Orodara und Koloko und während der CSS ermittelte Trypanosomenprävalenzen in allen Zonen der Provinz (WOITAG, 1999)

In jedem Dorf wurden alle Rinder nach einer ersten Blutentnahme für die parasitologische Untersuchung mit Isometamidium in der empfohlenen prophylaktischen Dosierung (1mg/kg KGW) behandelt. Im Anschluss wurden die Rinder vierzehntägig über einen Zeitraum von drei Monaten mit der BCT auf Trypanosomen untersucht. Blut von den parasitologisch positiven Tieren wurde für weitere Untersuchungen jeweils in zwei Balb C Mäuse (0,5 ml/Maus i.p.) inokuliert (DIARRA, 2001).

Unter der Voraussetzung der vollen prophylaktischen Wirksamkeit sollte der Infektionsschutz durch die ISMM-Behandlung über den gesamten Untersuchungszeitraum der Studie (10 - 12 Wochen) andauern. Die während der Folgeuntersuchungen dennoch parasitologisch positiven Rinder und Rinder mit einem Hämatokritwert <25%, wurden zusätzlich mit Diminazen (3,5 mg/kg KGW) therapiert.

Die abschließende **Longitudinalstudie (LS)**, Juni 1999 - November 1999, sollte eine Beurteilung der ökonomischen Auswirkungen von chemoresistenten Trypanosomeninfektionen bei Rindern ermöglichen. Basierend auf den Ergebnissen der ISMM-Studie wurden je zwei Dörfer mit hoher und niedriger Prävalenz für Behandlungsversagen der ISMM-Prophylaxe ausgewählt. Während eines sechsmonatigen Untersuchungszeitraumes wurden 80 Rinder aus jedem Dorf monatlich mit der BCT auf Trypanosomen untersucht. Daneben wurden unterschiedliche Produktionsparameter (Gewichtsentwicklung der Kälber, Fruchtbarkeitsdaten, Milchmenge) erfasst.

### 3.3.3 Ergebnisse aus dem BMZ-Projekt

#### Ergebnisse aus der Querschnittsstudie:

Das Ergebnis der CSS zeigte einen deutlichen Nord-Süd-Anstieg der Trypanosomenprävalenz in den Rinderherden (MCDERMOTT *et al.*, 2000). In den beiden südlichen Zonen, Orodara und Koloko, lag die Prävalenz mit durchschnittlich >10% deutlich höher, als in der zentral gelegenen Zone Samorogouan (4,3%) und der im Norden gelegenen Zone N'Dorola (1,4%) (Abb. 3.3). Infektionen mit *T. congolense* und *T. vivax* dominierten bei der mikroskopischen Untersuchung; Infektionen mit *T. brucei* wurden nur selten diagnostiziert.

Die unterschiedlichen Prävalenzen der Zonen korrelierten gut mit den Ergebnissen aus der entomologischen Erhebung, wonach im Süden der Provinz eine höhere Tsetsefliegendichte festgestellt wurde als im Norden (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Während im relativ trockenen Norden des Kéné Dougou die Verbreitungsgrenze der Tsetsefliege liegt, bietet ihr der humidere Süden ideale Lebensbedingungen.

Die Befragung der Tierhalter (OUÉDRAOGO, 2001) ergab, dass bei den Rindern zur Bekämpfung der Nagana überwiegend Isometamidium und Diminazen eingesetzt wurden.

Ergebnisse aus der ISMM-Blockbehandlungsstudie:

Vor der ISMM-Blockbehandlung betrug die Trypanosomenprävalenz in den zehn ausgewählten Dörfern zusammen 12,4%\* (McDERMOTT *et al.*, 2000). Sie schwankte weiträumig zwischen den Dörfern und erreichte Werte von 3,3% bis 26,3%. In einem Dorf, Fama, wurden überhaupt keine Infektionen diagnostiziert (Tab. 3.1). Von den mit parasitenhaltigem Blut inokulierten Mäusen entwickelte etwa die Hälfte eine Parasitämie (DIARRA, 2001).

Vierzehn Tage nach der Verabreichung des ISMM wurden Prävalenzen zwischen 1,3% und 29,9% festgestellt. Außer dem Dorf Fama, wo schon zu Beginn keine Infektionen diagnostiziert worden waren, wurden nur in dem Dorf Sipigui keine Infektionen mehr festgestellt (Tab. 3.1). Etwa ein Drittel der mit parasitenhaltigem Blut inokulierten Mäuse bildete eine Parastiämie aus (DIARRA, 2001).

Tab. 3.1 : Mit der BCT ermittelte Trypanosomoseprävalenzen in den 10 Dörfern der ISMM-Studie vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Blockbehandlung der Rinder (WOITAG, 1999)

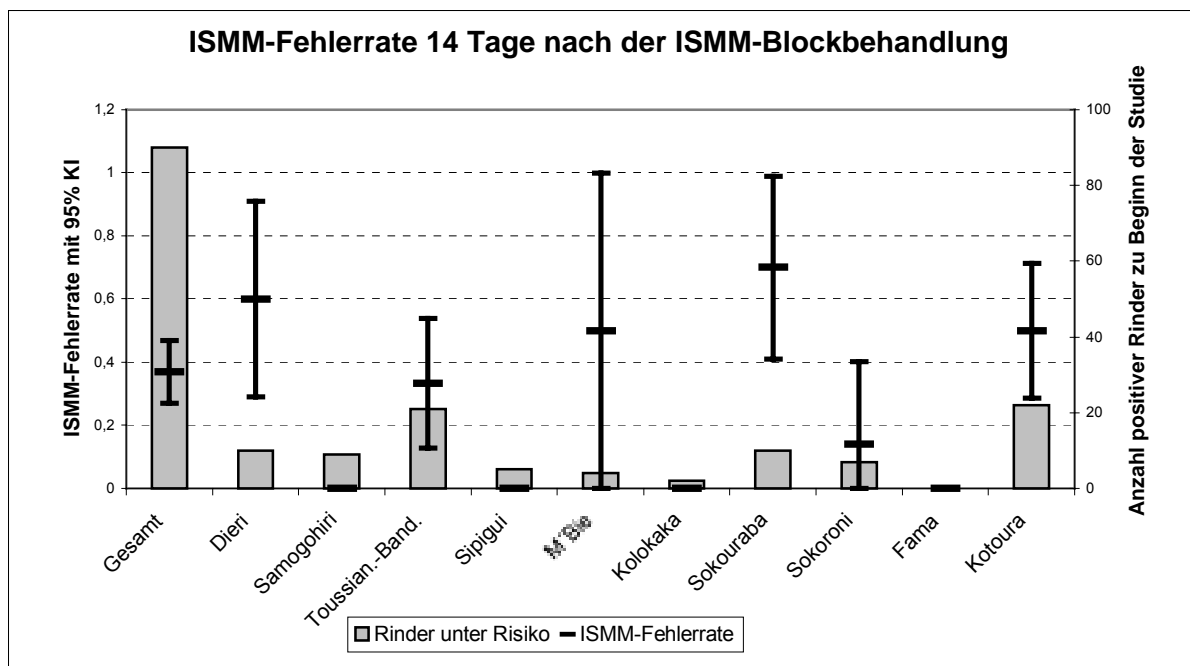
<b>Dorf</b>	<b>% Prävalenz vor ISMM</b>	<b>% Prävalenz 14 Tage nach ISMM</b>
Dieri	12,5	10
Samogohiri	11,4	1,3
Toussian-Bandougou	26,3	15
Sipigui	12,5	0
M'Bie	16	16
Kolokaka	3,3	1,7
Sokouraba	12,5	22,4
Sokoroni	5,4	1,5
Fama	0	0
Kotoura	26,3	29,9
<b>Gesamt</b>	<b>12,4</b>	<b>9,4</b>

\* Die angeführten Werte für die Prävalenzen und alle nachfolgenden Werte zur ISMM-Studie beziehen sich hier auf 726 Rinder. Bei der Endauswertung der Daten waren 12 Tiere aus der Untersuchungsherde mit 738 Rindern wegen häufiger Abwesenheit während der Nachuntersuchungen aus der Wertung genommen worden



Die ISMM-Fehlerrate, definiert als Anzahl der parasitologisch positiven Fälle vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung im Verhältnis zu den parasitologisch positiven Fällen vor der ISMM-Behandlung, variierte stark zwischen den Dörfern mit einem Mittelwert von 37,7% (Abb. 3.4). In drei Dörfern waren die Rinder demzufolge nach der ISMM-Behandlung geheilt. Die Inzidenz neuer Trypanosomeninfektionen lag bei 5,1%.

Beim Vorhandensein trypanozidsensibler Trypanosomenpopulationen hätte die ISMM-Prophylaxe bestehende Infektionen heilen und 10 - 12 Wochen lang vor neuen Infektionen schützen müssen. Beides war entsprechend den parasitologischen Ergebnissen nicht der Fall.



**Abb. 3. 4:** ISMM-Fehlerrate mit 95%igem Konfidenzintervall 14 Tage nach der ISMM-Blockbehandlung und Anzahl der positiven Rinder zu Beginn der ISMM-Studie in allen Dörfern und bei der gesamten Untersuchungsherde (WOITAG, 1999)

### 3.4 HERKUNFT DER BLUTPROBEN FÜR DIE PCR

Alle Blutproben, welche in dieser Arbeit mittels PCR und DNA-Sondenhybridisierung analysiert wurden, stammten von Rindern aus der ISMM-Studie (Abb. 3.3).

In der ISMM-Studie wurden Rinder unterschiedlicher Rassen sowie unterschiedlichen Alters und Geschlechts untersucht. Unter den 738 Tieren befanden sich zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung 461 weibliche und 277 männliche Tiere, welche wiederum in 468 adulte Tiere und 270 Jungtiere und Kälber aufgeteilt wurden. Zu den Adulten zählten alle Tiere über drei Jahre, während die Ein- bis Dreijährigen zu den Jungtieren und alle jüngeren Tiere zu den Kälbern gerechnet wurden. Wegen der geringen Anzahl der Kälber (6) in der Untersuchungsherde wurden sie zu den Jungtieren gerechnet (Tab. 3.2).

Bei den Rassen wurde das Gros der Tiere von Kreuzungsprodukten aus Zebus und Baoulés repräsentiert. An zweiter Stelle rangierten die reinrassigen Zebus vor den reinrassigen Baoulés im Untersuchungspool (Tab. 3.2).

Bei jedem der insgesamt sieben Besuche im Verlauf der ISMM-Studie wurde von allen vorgestellten Tieren EDTA-Blut durch Punktion der *Vena jugularis* mit einem Vakuum-Blutentnahmesystem (Venoject ) gewonnen. Vor Ort erfolgte die Messung des Hämatokritwertes und die parasitologische Untersuchung mit der Buffy-coat Technik (BCT) (Kap. 2.4.1.3). Die Speziesbestimmung wurde dabei basierend auf der Morphologie und dem Bewegungsmuster der Trypanosomen durchgeführt (Kap. 2.2.2; Tab. 2.1). Für die PCR wurde jeweils 1 ml von jeder Blutprobe in gekennzeichnete Kryoröhrchen (Nalgene ) abgefüllt. Bis zur Rückkehr zum CIRDES wurden die Blutproben in Kühlbehältern auf Eis und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung in einer Gefriertruhe bei -20°C gelagert (WOITAG, persönl. Auskunft).

### 3.5 AUSWAHL DER PROBEN FÜR DIE PCR

#### 3.5.1 Simplex-PCR und DNA-Sondenhybridisierung

Die Untersuchung des gesamten Blutprobenbestandes der ISMM-Studie mit der PCR war aufgrund der begrenzten zeitlichen und finanziellen Rahmenbedingungen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine Auswahl von Blutproben nach den folgenden Kriterien getroffen:

- 1) Proben von parasitologisch positiven und negativen Rindern, die vor der ISMM-Behandlung entnommen wurden, für den Methodenvergleich von BCT und PCR sowie als Referenz für die nachfolgende Untersuchung von trypanozidbehandelten Tieren
- 2) Proben derselben Rinder, die 14 Tage nach der ISMM-Applikation entnommen wurden, zur Überprüfung des Prophylaxeerfolges mit ISMM
- 3) Proben von einigen derselben Rinder, die 14 Tage nach einer zusätzlichen DIM-Applikation (bzw. 28 Tage nach der ISMM-Applikation) entnommen wurden, zur Überprüfung des Therapieerfolges mit DIM

Vor der ISMM-Behandlung waren 90 der 738 Rinder (12,2%) parasitämisch. Die PCR-Stichprobe beinhaltete die Blutproben dieser 90 BCT-positiven Rinder sowie dieselbe Anzahl Blutproben von BCT-negativen Rindern, welche zufällig aus den verbleibenden 648 negativen Blutproben ausgelost wurden.

Die Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung der ausgewählten Rinder sowie die untersuchte Tierzahl pro Dorf ist den beiden folgenden Tabellen 3.2 und 3.3 zu entnehmen.

Tab. 3.2: Anzahl der in der ISMM-Studie und in der PCR-Stichprobe untersuchten Rinder aufgeteilt nach Rasse, Alter und Geschlecht (Prozentwerte in Klammern)

<b>Herdenparameter</b>	<b>ISMM-Studie</b>	<b>PCR-Stichprobe</b>
Weibliche Rinder	461 (62,5%)	100 (55,6%)
Männliche Rinder	277 (37,5%)	80 (44,4%)
Adulte Rinder	468 (63,4%)	107 (59,4%)
Jungtiere & Kälber	270 (36,6%)	73 (40,6%)
Kreuzung	421 (57,0%)	109 (60,6%)
Zebu	195 (26,4%)	47 (26,1%)
Baoulé	122 (16,5%)	24 (13,3%)

Tab. 3.3: Anzahl der pro Dorf mit der PCR untersuchten parasitologisch positiven und negativen Rinder und insgesamt pro Dorf untersuchte Tierzahl in der PCR-Stichprobe und bei der ISMM-Studie

10 Dörfer in Orodara & Koloko	BCT-positive Rinder	BCT-negative Rinder	PCR-Stichprobe insgesamt	ISMM-Studie Tierzahl
Dieri	10	13	23	80
Samogohiri	9	12	21	79
Toussian-Band.	21	6	27	80
Sipigui	5	6	11	40
M'Bie	4	5	9	25
Kolokaka	2	9	11	60
Sokouraba	10	7	17	80
Sokoroni	7	14	21	130
Fama	0	11	11	84
Kotoura	22	7	29	80
gesamt	90	90	180	738

Die 180 Blutproben wurden nach der DNA-Extraktion in je drei Simplex-PCR-Läufen mit den spezifischen Primerpaaren zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* auf das Vorhandensein von Trypanosomen-DNA analysiert. Bei einem negativen Ergebnis erfolgte eine zusätzliche Analyse mit dem Primerpaar für *T. congolense forest*.

Die eingesetzten Primerpaare beschränkten sich auf den Nachweis der in Burkina Faso beschriebenen rinderpathogenen Trypanosomenspezies (LEFRANCOIS *et al.*, 1999; REIFENBERG *et al.*, 1997; SOLANO *et al.*, 1996, 1999).

Blutproben derselben Rinder, welche vierzehn Tage nach der Behandlung mit ISMM entnommen worden waren, wurden im Anschluss auf die gleiche Weise mit der PCR untersucht. Drei der 180 Rinder waren bei dieser Folgeuntersuchung nicht vorgestellt worden. Aus diesem Grund konnten nur 177 Blutproben analysiert werden.

Von den 35 Rindern, die 14 Tage nach der ISMM-Behandlung BCT-positiv gewesen waren und demzufolge zusätzlich mit DIM behandelt worden waren, kamen 34 wiederum 14 Tage später zur Nachuntersuchung. Die Blutproben dieser 34 Rinder wurden ebenfalls nach dem oben genannten Muster untersucht.

Die PCR-Produkte dienten als Ausgangsmaterial für die anschließende DNA-Sondenhybridisierung. Von den vor der ISMM-Behandlung entnommenen Proben wurden jeweils alle PCR-Produkte aus den PCR-Läufen zum Nachweis von *T. vivax* und *T. congolense savannah* auf Nylonmembranen geblottet und mit den entsprechenden spezifischen DNA-Sonden analysiert. Von den PCR-Läufen zum Nachweis von *T. brucei* wurden nur 96 PCR-Produkte aus vier Dörfern, wo *T. brucei*-Infektionen mit der PCR diagnostiziert worden waren, mit den spezifischen DNA-Sonden analysiert.

Von den nach der ISMM- bzw. nach der DIM-Behandlung entnommenen Proben wurden alle PCR-Produkte aus den PCR-Läufen zum Nachweis von *T. vivax* und *T. congolense savannah* mit den entsprechenden spezifischen DNA-Sonden untersucht.

### 3.5.2 Multiplex-PCR und DNA-Sondenhybridisierung

Bei der Multiplex-PCR wurden die in der Simplex-PCR verwendeten Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* kombiniert eingesetzt. Zum Vergleich mit der Simplex-PCR wurde eine Auswahl von Proben mit Einfach- und Mischinfektionen gemäß den Simplex-PCR-Ergebnissen erneut mit der Multiplex-PCR getestet.

Unter den 53 ausgewählten Proben mit Einfachinfektionen befanden sich die beiden einzigen mit der Simplex-PCR diagnostizierten Einfachinfektionen mit *T. brucei*, sowie 18 Einfachinfektionen mit *T. vivax* und 33 Einfachinfektionen mit *T. congolense savannah* (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Ausgewählte Proben mit Einfachinfektionen für die Multiplex-PCR: Die Simplex-PCR-Ergebnisse sind in den Spalten und die BCT-Ergebnisse in den Zeilen aufgeführt

<i>T. spp.</i>	Simplex-PCR			gesamt
	<i>T. brucei</i>	<i>T. vivax</i>	<i>T. congolense sav.</i>	
BCT-Positiv	2	9	5	16
BCT-Negativ	0	9	28	37
Gesamt	2	18	33	53

Mit dem Vergleich der Einfachinfektionen sollten Sensitivitätsunterschiede zwischen Simplex- und Multiplex-PCR beurteilt werden. Die Frage nach einem Sensitivitätsverlust der Multiplex-PCR gegenüber der Simplex-PCR stand dabei im Mittelpunkt. Deshalb wurden Proben mit einer möglichst geringen Trypanosomen-DNA-Konzentration ausgewählt. Von den Proben mit *T. congolense savannah* wurden überwiegend parasitologisch negative Proben untersucht, weil diese aufgrund der insgesamt geringeren Parasitenkonzentration

auch eine geringere Trypanosomen-DNA-Konzentration enthalten, als parasitologisch positive Proben.

Bei den Einfachinfektionen mit *T. brucei* und *T. vivax* war eine solche gezielte Probenauswahl bedingt durch den kleinen vorhandenen Probenumfang nicht möglich.

Von den 32 mit der Simplex-PCR identifizierten Mischinfektionen (d.h. Proben, welche bei mehr als einer Simplex-PCR positiv reagiert hatten), wurden alle erneut mit der Multiplex-PCR getestet. Hierbei sollte die Sensitivität der Multiplex-PCR bei der Diagnose von Mischinfektionen im Vergleich zur Simplex-PCR beurteilt werden.

Alle PCR-Produkte aus den Multiplex-PCR-Läufen wurden auf Nylonmembranen geblottet. Dieselben Membranen wurden jeweils nacheinander mit den spezifischen DNA-Sonden für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* analysiert.

### **3.6 BLUTPROBEN AUS EINEM NICHT-ENDEMIEGEBIET**

Die Blutproben, welche bei der DNA-Extraktion und bei der PCR als Negativkontrollen dienten, stammten von 30 weiblichen Rindern unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Rasse (Schwarzbunte, Holstein-Friesen, Rotbunte) aus Berlin und Brandenburg. Die Tiere waren im Frühjahr 1999 in der Rinderklinik des Fachbereiches Veterinärmedizin, FU-Berlin, aufgestellt. Das Blut wurde durch Punktion der *Vena coccygica mediana* mit Hilfe eines Vakuum-Blutentnahmesystems (Venoject ) in EDTA-beschichteten 10 ml Röhrchen gewonnen und bis zur Verwendung in 1 ml Plastikgefäßen portioniert eingefroren.

### 3.7 TRYPANOSOMENREFERENZSTÄMME

Für die Herstellung der DNA-Sonden und der PCR-Positivkontrollen wurde DNA von bereits charakterisierten Trypanosomenstämmen jeder untersuchten Trypanosomenart bzw. - subspezies benötigt. Die in der folgenden Tabelle (3.6) aufgelisteten Trypanosomenstämme dienten bei dieser Arbeit als Referenzstämme.

Tab. 3.6 : Trypanosomenreferenzstämme, die zur Gewinnung der PCR-Positivkontrollen und DNA-Sonden eingesetzt wurden

Spezies und Subspezies	Name	Referenz
<i>T. brucei</i>	<b>EATRO 795 (ILTat 1.4)*</b>	MILLER & TURNER, 1981
<i>T. congolense savannah</i>	<b>MBOI/BK/82/SA0053</b>	PINDER & AUTHIE, 1984; SIDIBE, 1996
<i>T. congolense forest</i>	<b>DINDERESSO/80/CRTA/3</b>	DUVALLET <i>et al.</i> , 1993; SIDIBE, 1996
<i>T. vivax</i>	<b>Zaria Y 486 (IL1392 ; MBOI/NI/73)*</b>	LEEFLANG <i>et al.</i> , 1976

\* weitere Bezeichnung für denselben Trypanosomenstamm, bzw. Abkömmlinge aus demselben Stamm

Der *T. brucei*-Stamm **ILTat 1.4** ist eine Antigenvariante eines monomorphen Klons aus dem Mutter-Stamm EATRO 795. Er wurde ursprünglich 1964 aus einem Stier in Uhembo, Kenia, isoliert (MILLER & TURNER, 1981).

Der *T. congolense*-Stamm **MBOI/BK/82/SA0053** geht auf die Blutprobe eines Rindes aus Samorogouan, Burkina Faso, aus dem Jahr 1982 zurück (PINDER & AUTHIE, 1984). Er wurde von SIDIBÉ (1996) aufgrund seines Isoenzymusters, seiner Hybridisierung mit spezifischen Gensonden und seiner RAPD-Analyse als Subtyp „savannah“ charakterisiert.

Die beiden Trypanosomenstämme ILTat 1.4 und MBOI/BK/82/SA0053 wurden im Zellkulturlabor des Institutes für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit, FU-Berlin, für die Gewinnung von DNA in prozyklischer Kultur vermehrt.

Vom CIRDES wurde vor Ort ein fertiges DNA-Extrakt des *T. congolense*-Stammes **DINDERESSO/80/CRTA/3** zur Verfügung gestellt. Dieser wurde 1980 von einem natürlich infizierten Hund in Dinderesso, Burkina Faso, gewonnen (DUVALLET *et al.*, 1993) und später

aufgrund seines Isoenzymmusters, seiner Hybridisierung mit spezifischen Gensonden und seiner RAPD-Analyse als Subtyp „forest“ charakterisiert (SIDIBÉ, 1996).

Der mäuseadaptierte *T.vivax*-Stamm **Zaria Y 486** (=IL1392 oder **MBOI/NI/73**), welcher ursprünglich von einem natürlich infizierten Zebu aus Yakawada, Nigeria, stammt (LEEFLANG *et al.*, 1976), wurde für die DNA-Gewinnung zunächst in Balb C Mäusen vermehrt (3.8.1.3).

### **3.8 UNTERSUCHUNGSMETHODEN**

Die nachfolgend beschriebene Gewinnung der Positivkontrollen für die PCR (Kap. 3.8.1, 3.8.2) aus den oben aufgeführten Trypanosomenreferenzstämmen sowie die DNA-Extraktion der Trypanosomenkonzentrate (Kap. 3.8.3.1) wurden am Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit in Berlin durchgeführt. Alle weiteren Untersuchungen fanden am CIRDES in Bobo Dioulasso, Burkina Faso, statt.

#### **3.8.1 Gewinnung der *T.vivax*-Positivkontrolle**

##### **3.8.1.1 Versuchstiere**

Zur Anzucht und Vermehrung des *T. vivax*-Referenzstammes aus Trypanosomenisolaten wurden drei bis vier Wochen alte Balb C Mäuse aus der Zucht des BgVV, Berlin eingesetzt. Sie wurden in Makrolonkäfigen auf Labortiereinstreu gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und pelletiertem Standardfutter. Die Räume zur Haltung der Versuchstiere waren auf 20°C - 22°C temperiert und enthielten eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 60%.

##### **3.8.1.2 Parasitologische Untersuchung**

Das Blut für die parasitologische Untersuchung wurde durch Abschneiden der äußersten Schwanzspitze der Mäuse gewonnen: Das Blut für die HCT wurde durch Anhalten einer Kapillare an die Schwanzspitze vermittelt durch Kapillarkräfte aufgesaugt; für das Nativpräparat wurde ein Blutstropfen auf einen Objektträger getupft.

##### Nativpräparat

Nach der Auflage eines Deckgläschens auf den Blutstropfen auf dem Objektträger wurde das Nativpräparat unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10 x, Objektiv F 40/0,65) meanderförmig durchmustert. Je nach Höhe der Parasitämie wurden 20 bis 50 Gesichtsfelder betrachtet.



### Hämatokrit-Zentrifugations-Technik (HCT)

Die HCT (WOO, 1970) wurde in der von WALKER (1972) und MEHLITZ (1978) modifizierten Weise durchgeführt: In etwa zu einem Drittel mit Walker-Lösung (Kap. 8.1.4.6) gefüllte heparinisierte Hämatokritkapillaren wurden je 4 - 5 Tropfen Schwanzblut aufgenommen. Nach dem einseitigen Verschluss der Kapillaren mit Versiegelungskit folgte eine achtminütige Zentrifugation der Kapillaren bei 10.000g. Die Kapillaren wurden jeweils in der Querrinne einer Neubauerzählkammer fixiert und an der Grenzschicht zwischen Buffy coat und Plasma bei 400-facher Vergrößerung (Spitzobjektiv 40/0,85) unter Ölimmersion mikroskopisch nach Trypanosomen durchmustert.

#### **3.8.1.3 Vermehrung von *T. vivax* in Mäusen**

Der *T. vivax*-Referenzstamm wurde aus einem in Flüssigstickstoff konservierten Stabilat in drei Mäusen angezüchtet und durch zwei nachfolgende Mauspassagen weiter vermehrt: Das Stabilat wurde nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37°C mit etwas Medium verdünnt und in Spritzen aufgezogen. Jede Maus erhielt 0,3 ml dieser Infektionslösung i.p. injiziert. Die Kontrolle der Parasitämie wurde täglich mittels HCT und Nativpräparat durchgeführt. Nach sechs Tagen wurde die erste infizierte Maus mit dem Erreichen der ansteigenden Phase der ersten Parasitämiewelle mit Chloroform narkotisiert und durch Herzpunktion entblutet. Der Spritze zur Blutaufnahme waren zur Vermeidung von Koagulation ca. 5 - 10 IE Natrium-Heparin zugesetzt worden. Das gewonnene Blut wurde zur Infektion von vier weiteren Mäusen verwendet. Nach dem Erreichen einer hohen Parasitämie wurde die erste davon drei Tage später entblutet. Das Blut dieser Maus diente wiederum zur Infektion der verbleibenden 25 Tiere. Diese wurden mit dem Erreichen von hohen Parasitämien mit mindestens 50 - 100 Trypanosomen pro Gesichtsfeld im Nativpräparat in den nachfolgenden Tagen ebenfalls mit Chloroform betäubt und durch Herzpunktion entblutet. Das Blut dieser sowie der aus den ersten Passagen verbliebenen Mäuse wurde umgehend nach seiner Gewinnung zur Trypanosomenisolierung verwendet.

#### **3.8.1.4 Isolierung der Trypanosomen aus Mäuseblut**

Die Isolierung der Trypanosomen aus dem Mäuseblut wurde nach der Methode von LANHAM & GODFREY (1970) durchgeführt: Basierend auf der unterschiedlich negativen Oberflächenladung von Erythrozyten und Trypanosomen erfolgte ihre Auftrennung mit Hilfe von Anionenaustauschsäulen (m-AECD). Dabei wurden die stärker negativ geladenen Erythrozyten von der DEAE-Zellulose (Kap. 8.1.4.6) in der Säule absorbiert, während die schwächer negativ geladenen Trypanosomen eluiert wurden.

Für die Herstellung der Anionenaustauschsäulen wurden 10 ml-Plastikspritzen folgendermaßen präpariert: Nach dem Einlegen von exakt zugeschnittenen Whatman-Filterpapieren

und von Pur-in Zellstofflagen in die jeweils unteren Enden der Hohlzylinder der Spritzen erfolgte ihre senkrechte Fixation. Unter die nachfolgend aufgesteckten Nadeln der Spritzen wurde zunächst Bechergläser zum Auffangen der Spülflüssigkeit und später 50 ml Zentrifugenröhrchen zum Auffangen des trypanosomenhaltigen Eluates gestellt. Die Einlagen der Spritzen wurden mit PSG-Puffer (Kap. 8.1.4.6) befeuchtet. Im Anschluss folgte das Befüllen der Spritzen mit equilibrierter Zellosuspension bis zu etwa drei Viertel der Zylinder. Nach dem Absetzen der Zellulose wurden die Säulen zwei- bis dreimal mit PSG-Puffer gespült, bevor schließlich das Blut (ca. 1:2 mit PSG-Puffer verdünnt) langsam aufgetropft wurde. Erst nach dem vollständigen Eindringen des Blutes in die Säulen, wurden diese erneut mit PSG-Puffer gespült. Um den Zeitpunkt zu bestimmen, ab welchem Trypanosomen im Eluat erscheinen, wurden fortwährend Tropfen der Eluate mikroskopisch auf Trypanosomen durchsucht. Der Eluatgewinnung folgte die Bestimmung der Trypanosomenkonzentration in jedem Zentrifugenröhrchen durch Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer. Im Anschluss wurden die Eluate 20 Minuten lang bei 1.000g zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Sedimente in 50 ml PBS-Puffer (Kap. 8.1.4.6) resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 1.000g zentrifugiert. Nach der Wiederholung des Waschvorganges wurden die Sedimente in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert. Bei niedriger Trypanosomenkonzentration wurde der Inhalt mehrerer Zentrifugenröhrchen in einem Gefäß resuspendiert.

### **3.8.2 Gewinnung der *T. brucei*- und *T. congolense* savannah-Positivkontrollen**

Die Referenzstämme für *T. brucei* und *T. congolense* savannah wurden zur Gewinnung der Positivkontrollen für die PCR in prozyklischen Kulturen vermehrt. Nach dem Erreichen einer Konzentration von ca.  $10^7$  -  $10^8$  Trypanosomen/ml Kulturmedium wurden die Trypanosomen geerntet. Die Bestimmung der Trypanosomenkonzentration erfolgte durch Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer. Die trypanosomenhaltigen Kulturmedien (30 - 50 ml) wurden jeweils 20 Minuten lang bei 1.000g zentrifugiert. Nach dem Absaugen der Überstände wurden die trypanosomenhaltigen Sedimente jeweils in 50 ml PBS-Puffer resuspendiert und 10 Minuten lang bei 1.000g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend erfolgte die Resuspension der Sedimente in jeweils 2,5 ml PBS-Puffer. Die Flüssigkeit wurde in jeweils fünf Gefäße zu je 500 µl portioniert und bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert.

### 3.8.3 DNA-Extraktion

#### 3.8.3.1 DNA-Extraktion der Trypanosomen-Referenzstämme

Die DNA der Trypanosomen-Referenzstämme musste für die Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer (Kap. 3.8.5.2) einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Die genaue Bestimmung der DNA-Konzentration war für die spätere Verwendung der DNA zur Überprüfung der analytischen Sensitivität und Spezifität der PCR notwendig. Deshalb wurde die Reinigung der Trypanosomen-DNA mit einem Extraktionskit der Firma Qiagen (QIAmp DNA Blood Mini Kit) durchgeführt. Damit gewonnene DNA-Proben weisen im Vergleich zum Higuchi-Protokoll, mit dem alle Blutproben extrahiert wurden, weniger Proteinverunreinigungen bei der DNA-Messung auf. Diese wirken sich negativ auf die Messgenauigkeit des Photometers aus, weil sich die Proteinabsorption, deren Maximum bei 280 nm liegt, teilweise auch zur DNA-Absorption, deren Maximum bei 260 nm liegt, addiert.

Die Bearbeitung der Proben richtete sich nach der Beschreibung des Qiagen Spin-Protokoll für QIAmp Spinsäulen:

Zu 200 µl der DNA-haltigen Suspension wurden 200 µl AL2-Puffer, welcher direkt zuvor aus den Pufferlösungen AL1 und AL hergestellt worden war, sowie 25 µl der gebrauchsfertigen Proteinase K-Lösung hinzupipettiert. Die Proben wurden mit dem Vortexer gut durchmischt und im Anschluss 10 Minuten lang im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 210 µl Ethanol zu den Proben und erneutes Durchmischen. Die gesamte Flüssigkeit der Proben wurde darauf in auf Sammelröhrchen gesteckte Spin-Röhrchen überführt. Die Spin-Röhrchen enthalten eine spezielle Matrix, welche DNA adhäsiv bindet. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000g wurden die Sammelröhrchen samt enthaltener Flüssigkeit verworfen; die Spin-Röhrchen wurden auf neue Sammelröhrchen gesteckt. Es folgten zwei Waschvorgänge der Spin-Röhrchen mit 500 µl AW-Puffer: Nach der ersten Zugabe des AW-Puffers zu den Spin-Röhrchen wurden diese eine Minute lang bei 13.000g zentrifugiert. Die Sammelröhrchen wurden wiederum verworfen und durch neue ersetzt. Nach der zweiten Pufferzugabe wurde drei Minuten lang bei 13.000g zentrifugiert. Die Sammelröhrchen wurden erneut verworfen und durch Auffangröhrchen ersetzt. In die Spin-Röhrchen wurden nun jeweils 200 µl 70°C-warmes DNase- und RNase-freies *Aqua dest.* pipettiert, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation im Wasserbad bei 70°C. Zur Gewinnung des DNA-reichen Eluates wurde abschließend eine Minute lang bei 13.000g zentrifugiert.

### 3.8.3.2 DNA-Extraktion der Blutproben

Die DNA-Extraktion der zu untersuchenden Blutproben erfolgte durch Zellabbau mittels Lysispuffer nach Higuchi (HIGUCHI, 1989) und enzymatisch mittels Proteinase K:

Jeweils 250 µl Higuchi-Lysis-Puffer (Kap. 8.1.4.1) und 250 µl der zuvor aufgetauten und gemixten Blutproben wurden in gekennzeichnete Reaktionsgefäße pipettiert. Dem Durchmischen der Proben mit einem Vortexer folgte eine einminütige Zentrifugation bei 13.000g. Nach der Abnahme der Zentrifugatüberstände (450 µl/Probe) wurden die Sedimente am Boden der Reaktionsgefäße mit je 500 µl Higuchi-Lysis-Puffer wieder möglichst vollständig aufgelöst. Dabei erfolgte zuerst eine grobe Auflösung mit Hilfe einer Pipette und anschließend die vollständige Auflösung durch Vortexen. Diesem Vorgang folgte wiederum eine einminütige Zentrifugation bei 13.000g. Der Waschvorgang der Sedimente mit dem Higuchi-Lysis-Puffer wurde auf diese Weise insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Überstände vollständig entfernt: Die grobe Abnahme der Überstände erfolgte mit 1000 µl Pipettenspitzen, danach wurden die Flüssigkeitsreste mit 100 µl Pipettenspitzen entfernt. Die Sedimente wurden in je 250 µl 1x PCR-Puffer (Kap. 8.1.4.2) aufgelöst. Die resuspendierten Proben wurden nach Hinzufügen von jeweils 20 µl (=200 µg) Proteinase K drei Stunden lang im vorgeheizten Wasserbad bei 56°C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte ein mehrmaliges Durchmischen der Proben durch kurzes Vortexen. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde schließlich eine weitere zehnminütige Inkubation im Wasserbad bei 94°C durchgeführt. Bis zur PCR-Analyse wurden die Proben im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

Bei jedem Extraktionsdurchgang mit 20 Feldproben war die Probe eines negativen Rindes (Kap. 3.6) als Kontaminationskontrolle enthalten. Sie wurde später zusammen mit den entsprechenden Feldproben in der PCR analysiert.

### 3.8.4 PCR

#### 3.8.4.1 Simplex-PCR / Herstellung des PCR-Ansatzes

Jede mit der Simplex-PCR zu untersuchende Probe wurde nacheinander in drei PCR-Läufen mit den Primerpaaren zum Nachweis von *T. brucei* (TBR1.45/TBR2.47), *T. vivax* (TV80.24/TV322.24) und *T. congolense savannah* (TCN1/TCN2.38) analysiert. Einige Proben, die in allen PCR-Läufen negativ reagierten, obwohl sie von parasitologisch positiven Rindern stammten, wurden zusätzlich mit dem Primerpaar zum Nachweis von *T. congolense forest* (TCF1/TCF2) analysiert. Die nähere Beschreibung der Primerpaare erfolgt im Anhang (Kap. 8.1.1).

Für jeden PCR-Lauf, welcher dem Fassungsvermögen des Thermocyclers entsprechend maximal zwanzig Proben fasste, wurde das Reaktionsgemisch frisch angesetzt. Nachdem

gewisse Pipettierverluste unvermeidbar sind, wurde jeweils die der Probenanzahl zuzüglich drei Proben entsprechende Menge des Reaktionsgemisches angesetzt. Alle dafür benötigten Bestandteile lagerten in aliquotierter Form im Gefrierschrank des PCR-Labors bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Die Zubereitung der Reaktionsgemische erfolgte auf Eis. Jeder PCR-Ansatz beinhaltete  $10\ \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ -Lösung (3 mM Endkonzentration im PCR-Ansatz),  $5\ \mu\text{l}$  Template und  $10\ \mu\text{l}$  Reaktionsgemisch bestehend aus  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 x PCR-Puffer, Primer, dNTPs und Taq Gold Polymerase (Tab. 3.7).

Die  $\text{MgCl}_2$ -Endkonzentration von 3 mM/PCR-Ansatz war nach Vorversuchen mit  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen zwischen 2 und 4 mM/PCR-Ansatz als optimal für die gewählten Reaktionsbedingungen ermittelt worden.

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden die berechneten Volumina der 10 x PCR-Puffer-Stammlösung (Kap. 8.1.4.2), der Primer und der dNTPs nacheinander zum DNase- und RNase freien Wasser in ein separates Reaktionsgefäß pipettiert. Die Taq Gold Polymerase wurde diesem Reaktionsgemisch nach kurzer Zentrifugation hinzugefügt. Bevor je  $10\ \mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches in die gekennzeichneten 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert wurden, erfolgte die Zugabe von je  $10\ \mu\text{l}$  der  $\text{MgCl}_2$ -Lösung und  $5\ \mu\text{l}$  Template. Die fertigen PCR-Ansätze wurden kurz zentrifugiert, um die gesamte Probenflüssigkeit an den Boden der Reaktionsgefäße zu bringen, und anschließend in den auf  $95^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Thermocycler (sogenannte „Hot-Start-PCR“) verbracht. Das PCR-Profil ist in Tabelle 3.8 aufgeführt. Die Ausstattung der neueren PCR-Geräte mit einem beheizbaren Deckel macht die Überschichtung der Proben mit Mineralöl zur Vermeidung von Evaporation überflüssig. Nach Beendigung des Programmes und Entnahme aus dem Gerät, wurden die PCR-Produkte bis zu ihrer Weiterbearbeitung im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.8.4.2 Multiplex-PCR**

Die Herstellung der PCR-Ansätze für die Multiplex-PCR erfolgte so, wie für die Simplex-PCR (Kap. 3.8.4.1) beschrieben. Im Unterschied zur Simplex-PCR wurden dem Reaktionsgemisch anstelle eines Primerpaares drei Primerpaare (je  $1\ \mu\text{M}/25\ \mu\text{l}$  Reaktionsvolumen) und ein entsprechend geringeres Volumen DNase- und RNase freies Wasser zugesetzt. Die Temperaturprofile von Simplex- und Multiplex-PCR waren identisch (Tab. 3.7 und Tab. 3.8).

Tab. 3.7: Zusammensetzung des 25 µl-PCR-Ansatzes für die Simplex- und Multiplex-PCR

Inhaltsstoff / Ausgangskonz.	Volumen	Endkonzentration
DNase- und RNase freies Aqua dest.	primerabhängig / variabel	–
MgCl <sub>2</sub> / 7,5 mM	10 µl	3 mM
10 x PCR-Puffer*	2,5 µl	1 x
dNTPs / 100 mM	0,25 µl	1 mM (250 µM pro Nukleotid)
Primer**	primerabhängig / variabel	1 µM (jeder Primer)
Taq Gold Polymerase (5000 Units / ml)	0,2 µl	1 Unit / 25 µl
DNA-Extrakt / Template	5 µl	probenabhängig / variabel

\*10 x PCR Puffer siehe unter Kap, 8.1.4.2; \*\* Primer siehe unter Kap. 8.1.1

Tab. 3.8: Temperaturprofil für die Simplex- und Multiplex-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
Denaturierung*	95° C	10 min	1
Denaturierung	94° C	60 sec	
Annealing	60° C	30 sec	
Extension	72° C	30 sec	
Extension	72° C	10 min	1
Abkühlung	4° C	Bis zur Entnahme der Proben	

\*Zur Aktivierung der Taq Gold Polymerase notwendiger Schritt

### 3.8.4.3 Kontrollen bei der Durchführung der PCR

Bei der Simplex-PCR waren bei jedem PCR-Lauf neben 17 Testproben drei Kontrollproben enthalten: Zwei negative Kontrollproben, welche 5 µl Wasser bzw. 5 µl DNA-Extrakt eines negativen Rindes als Template enthielten, sowie eine positive Probe, welche 5 µl DNA-Extrakt des entsprechenden Trypanosomenreferenzstammes (Konzentration: 100 pg DNA/PCR-Ansatz) als Template enthielt.

Bei der Multiplex-PCR waren neben 15 Testproben fünf Kontrollproben enthalten: Eine negative Kontrollprobe mit 5 µl Wasser, eine negative Kontrollprobe mit 5 µl Rinder-DNA-Extrakt und drei positive Proben, welche jeweils 5 µl DNA-Extrakt jeder untersuchten Trypanosomenspezies (je 100 pg DNA/PCR-Ansatz) enthielten.

Der Nachweis der positiven Kontrollprobe(n) garantierte die Funktionstüchtigkeit der PCR. Versagte dieser Nachweis, wurde der entsprechende PCR-Lauf wiederholt.

### 3.8.4.4 Überprüfung der analytischen Spezifität der PCR

Jedes der im Anhang (Kap. 8.1.1) näher beschriebenen sechs Primerpaare wurde mit der Simplex-PCR auf seine Spezifität getestet. Dabei wurden die DNA-Extrakte der Trypanosomenreferenzstämme in einer Konzentration von 100 pg DNA/PCR-Ansatz als Template eingesetzt, sowie ein gemischter Ansatz, welcher 100 pg DNA von jeder Trypanosomenspezies enthielt. Als negative Kontrollproben dienten bei jedem PCR-Lauf jeweils ein DNA-Extrakt aus dem Vollblut eines Rindes aus einem Nicht-Endemiegebiet und eine Probe mit DNase- und RNase-freiem Wasser. Um nachzuprüfen, ob unspezifische Produkte in Gegenwart eines Überschusses Nicht-Ziel-DNA entstehen (z.B. Wirtstier-DNA; DNA anderer Blutparasiten), wurde jedes Primerpaar außerdem mit 30 Proben, welche DNA-Extrakte von Rinderblutproben aus einem Nicht-Endemiegebiet (Berliner Umland) als Template enthielten, getestet.

Mit der Multiplex-PCR wurden ferner drei Primerpaare (TBR1/TBR2, TV80.24/TV322.24 und TCN1/TCN2.38) in einem gemeinsamen Ansatz, der 100 pg DNA von jeder Trypanosomenspezies enthielt, untersucht.

### 3.8.4.5 Überprüfung der analytischen Sensitivität der PCR

Anhand dekadischer DNA-Verdünnungsreihen der Trypanosomen-Referenzstämme wurde die Sensitivität jedes der im Anhang (Kap. 8.1.1) beschriebenen Primerpaare mit der Simplex-PCR bestimmt. Beginnend mit einer 100 pg DNA enthaltenden Probe, reichten die Verdünnungsreihen jeweils bis zur Verdünnungsstufe von 1 fg DNA/PCR-Ansatz (100 fg DNA entspricht nach BORST *et al.* (1982) etwa der DNA-Menge in einem Trypanosom).

Mit der Multiplex-PCR wurden zusätzlich drei Primerpaare (TBR1/TBR2, TV80.24/TV322.24 und TCN1/TCN2.38) in Kombination getestet. Die Verdünnungsreihe enthielt dabei DNA von jeder Trypanosomenspezies in derselben Konzentration. Die Verdünnungsreihen wurden vor jedem PCR-Durchlauf aus einer hochkonzentrierten Stammprobe (Quiagen-DNA-Extrakt) neu angesetzt. (Positive Kontrollproben mit einer niedrigen DNA-Konzentration, insbesondere im Femtogramm-Bereich, waren nach mehrwöchiger Aufbewahrung bzw. nach mehrfachen Einfrier- und Auftauzyklen nur noch schwach bzw. überhaupt nicht mehr mit der PCR nachweisbar).

#### **3.8.4.6 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen**

- Die Blutentnahme bei den Rindern im Feld erfolgte mit einem Vakuum-Blutentnahmesystem (Venoject ); für jedes Tier wurde ein neues Besteck verwendet
- Alle Arbeitsschritte (Extraktion, PCR-Ansätze, Elektrophorese und DNA-Sondenhybridisierung, Filmbelichtung und -entwicklung) wurden in getrennten Laborräumen durchgeführt
- Nach der Durchführung von Arbeiten, die mit Kontaminationsgefahr verbunden sind (z.B. Elektrophorese, DNA-Sondenhybridisierung), wurde das PCR-Labor am selben Tag nicht mehr betreten
- Die Arbeiten im PCR-Labor wurden unter einer Sicherheitskabine bei ausgeschalteter Lüftung durchgeführt
- Vor Beginn und nach Beendigung der Arbeitsvorgänge wurde der Arbeitsplatz mindestens eine halbe Stunde mit UV-Licht bestrahlt; außerdem wurden alle Arbeitsflächen und -gegenstände vor und nach ihrer Benutzung mit Schwefelsäure (0,2%) oder Natriumhypochlorid (4%) abgewischt
- Bei allen Arbeiten im Labor wurden Schutzkleidung und Einmalhandschuhe getragen
- Alle Reagentien für die PCR wurden in aliquotierter Form aufbewahrt
- Die positiven Kontrollproben wurden auf 100 pg DNA/PCR-Ansatz verdünnt und extra verpackt aufbewahrt
- Für die Pipettierarbeiten wurden grundsätzlich Pipettenspitzen mit Aerosolsperre benutzt
- Bei der DNA-Extraktion der Blutproben wurden Reaktionsgefäße mit Gummiringdichtung verwendet

#### **3.8.4.7 Nachweis der PCR-Produkte**

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte aus der Simplex- und Multiplex-PCR wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

Die Herstellung des 2%-igen Agarosegels erfolgte durch Erhitzung von 1 g Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer (Kap. 8.1.4.3) auf einer Heizplatte bis zur vollständigen Lösung der Agarose.



Nach dem Zusatz von 5 µl Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration im Gel: 0,01%) zur heißen flüssigen Agaroselösung und deren Abkühlung bis auf ca. 60°C wurde sie zügig und blasenfrei in einen Gelträger ausgegossen. Das noch flüssige Gel wurde umgehend nach dem Gießen mit zwei zwölfzähligen Gel-Kämmen bestückt. Im Anschluss an eine etwa halbstündige Erstarrungszeit im Kühlschrank (bei 6 - 7°C) war das Gel zum Einsetzen in die Elektrophoresekammer bereit. Zuvor wurden die Kämmen und die Seitenteile des Gelträgers entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde bis etwa zwei Millimeter über die Oberfläche des Gels mit 1 x TBE-Puffer gefüllt.

Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet: An die Wand der Reaktionsgefäße wurden unter Vermeidung des Eintauchens in die Amplifikate je 5 µl blauer Probenpuffer (Kap. 8.1.4.3) hinzupipettiert. Mit einer Tischzentrifuge wurden die Proben nachfolgend kurz zentrifugiert und mit Hilfe einer Pipette bis zur Homogenität der Blaufärbung gut durchmischt. Jeweils 10 µl der Probenlösung wurden in die Geltaschen pipettiert. Die jeweils äußerste linke Geltasche beider Reihen im Gel wurde mit je 10 µl 100 bp-DNA-Marker beschickt.

Im Anschluss an die 30 bis 45-minütige Laufzeit der Elektrophorese bei ca. 120 Volt erfolgte eine ca. zweiminütige Abkühlung des Gels im Kühlschrank, um das Beschlagen der Kameralinse zu vermeiden. Zur Ergebnisdokumentation wurde das Gel dann über dem UV-Licht des Transilluminators mit dem Gelcam Polaroid Fotosystem mit aufgesetzter Dunkelkammer fotografiert (Belichtungszeit: 1/4sec.; Blende: f/16 ; oranger Filteraufsatz).

#### **3.8.4.8 Auswertung der PCR-Ergebnisse**

DNA-Fragmente gleicher Größe, Ladung und Konformation konzentrieren sich bei ihrer Wanderung im Spannungsfeld eines Agarosegels in Banden. Die Banden werden durch das dem Agarosegel zugegebene Ethidiumbromid, welches während der Wanderung der DNA im Gel zwischen die DNA-Stränge interkaliert, nachweisbar. Es wirkt durch UV-Licht bei 312 nm Wellenlänge als leuchtender Fluoreszenzfarbstoff.

Die Identität der Amplifikationsprodukte wurde durch den Vergleich der Bandenlaufstrecken von Amplifikationsprodukten, Positivkontrolle und 100bp-Marker bei der Elektrophorese bestimmt. Jede sich im Gel über dem UV-Licht als Bande darstellende Aufhellung in Höhe der Positivkontrolle wurde als positives PCR-Ergebnis gewertet.

#### **3.8.4.9 Präparative PCR zur Gewinnung der spezifischen DNA-Sonden**

Die DNA-Sonden sollten zur Verifizierung der PCR-Produkte dienen und die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen. Zur Gewinnung der DNA-Sonden (Kap. 3.8.5) wurden die spezifischen DNA-Produkte jedes Trypanosomenreferenz-stammes mittels präparativer PCR amplifiziert.

Weil eine hohe DNA-Ausgangskonzentration für die Sondenherstellung benötigt wurde, sollte pro PCR-Ansatz eine möglichst große Ausbeute an Amplifikationsprodukt erzeugt werden. Der Einsatz eines Templates mit hoher DNA-Konzentration bei der präparativen PCR führt aber wider Erwarten nicht zur Gewinnung einer maximalen Konzentration des gewünschten DNA-Produkts. Mit zunehmend höheren DNA-Ausgangskonzentrationen entstehen bei der PCR auch zunehmend unerwünschte Produkte (insbesondere Dimere). Als Template für die 100 µl PCR-Ansätze wurden deshalb jeweils 20 µl Amplifikat von PCR-Ansätzen, die ihrerseits 10 pg DNA/PCR-Ansatz (DNA der Trypanosomenreferenzstämme) als Template enthalten hatten, eingesetzt.

Der PCR-Ansatz ist in der nachfolgenden Tabelle 3.7 dargestellt; das Temperaturprofil stimmte mit dem bei der Simplex- und Multiplex angewandten überein.

Tab. 3.7: Zusammensetzung der 100 µl-PCR-Ansätze für die präparative PCR

Inhaltsstoff / Ausgangskonz.	Volumen	Endkonzentration
DNase- und RNase freies Aqua dest.	primerabhängig / variabel	–
MgCl <sub>2</sub> / 7,5 mM	40 µl	3 mM
10 x PCR-Puffer*	10 µl	1 x
dNTPs / 100 mM	1,0 µl	1 mM (250 µM pro Nukleotid)
Primer**	primerabhängig / variabel	1 µM (jeder Primer)
Taq Gold Polymerase / 5000 Units/ml	0,8 µl	4 Units / 100 µl
DNA-Extrakt / Template	20 µl	variabel

\*10 x PCR Puffer siehe unter Kap. 8.1.4.2; \*\* Primer siehe unter Kap. 8.1.1

### **3.8.5 DNA-Sondenhybridisierung**

#### **3.8.5.1 Aufreinigung der Sonden-DNA**

Aus den Amplifikaten der präparativen PCR (Kap. 3.8.4.9) wurde durch Behandlung mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen hochgereinigte Sonden-DNA gewonnen. Die Durchführung der Arbeitsschritte erfolgte anhand des entsprechenden Herstellerprotokolls:

Die 100 µl-PCR-Ansätze wurden in Reaktionsgefäße mit jeweils 500 µl PB-Puffer pipettiert und gut durchmischt. Im Anschluss wurde die gesamte Flüssigkeit in auf Sammelröhrchen gesteckte Spin-Säulen überführt und 30 - 60 Sekunden lang bei 13.000g zentrifugiert. Mit diesem Vorgang erfolgte die Bindung der DNA an die Matrix der Spin-Säulen. Die bei der Zentrifugation durchgespülte Pufferlösung wurde verworfen; die Sammelröhrchen wurden erneut verwendet. Es folgte ein Waschvorgang der Spin-Säulen mit 750 µl PE-Pufferlösung, welche kurz zuvor durch Zugabe von Ethanol zur entsprechenden Fertigpufferlösung frisch angesetzt wurde. Nach Zugabe dieser Waschpufferlösung wurden die Säulen wiederum 30 - 60 Sekunden lang bei 13.000g zentrifugiert. Die durchgespülte Pufferlösung wurde verworfen, die Spin-Säulen wurden erneut auf die Sammelröhrchen gesteckt und im Anschluss eine Minute lang bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Zur Gewinnung der DNA wurden die Sammelröhrchen verworfen und durch saubere Auffangröhrchen ersetzt. Je 50 µl EB-Puffer wurden auf die Spin-Säulen gegeben, welche abschließend eine Minute lang bei 13.000g zentrifugiert wurden. Die Eluate mit der Sonden-DNA wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.8.5.2 Messung der DNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Sonden-DNA sowie der gereinigten Trypanosomen-DNA für die Positivkontrollen bei der PCR erfolgte mit dem Photometer.

Vor der Konzentrationsmessung der DNA-Extrakte wurde die Küvette des Photometers mehrfach gespült: 1) mit 1 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung, 2) mit 1 ml einer 0,1 M HCl-Lösung und 3) dreimal mit DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser. Die Flüssigkeiten wurden nacheinander in die Küvette pipettiert und diese damit geschwenkt, bevor sie mit einer Vakuumpumpe wieder abgesaugt wurden. Die Einstellung des Nullwertes erfolgte im Anschluss nach der Angabe des Geräteherstellers. Den mit Qiagen-Extraktionskit extrahierten Proben dienten dabei 70 µl destilliertes Wasser als Referenzlösung - den mit Higuchi-Lysispuffer extrahierten Proben 70 µl der Tris-HCl-Lösung. Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wurden nach Absaugen der Referenzlösung 70 µl der zu messenden Probe in die Küvette pipettiert. Die angezeigten Messwerte für die DNA-

Konzentration, die DNA-Protein-Ratio und die DNA-Reinheit wurden dokumentiert. Das untersuchte Probenvolumen wurde nach der Messung verworfen (Kontaminationsgefahr).

### **3.8.5.3 Markierung der DNA-Sonden**

Die Konzentration der mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigten Sonden-DNA wurde durch Zugabe von DNase- und RNase-freiem Wasser auf 20 ng DNA/ $\mu$ l eingestellt. Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit dem ECL Direkt Nucleic Acid Labelling and Detection System (Fa. Amersham) nach den Anweisungen des Herstellers: Jeweils 10  $\mu$ l der Sonden-DNA wurden in Reaktionsgefäße pipettiert. Die gut verschlossenen Reaktionsgefäße wurden fünf Minuten lang im Wasserbad gekocht und weitere fünf Minuten lang auf Eis gelagert. Darauf folgte nacheinander der Zusatz von 10  $\mu$ l Peroxidase-Markerreagenz und 10  $\mu$ l Glutaraldehyd zu jedem Ansatz, wobei zugleich mithilfe der Pipette gemischt wurde. Nach einer weiteren zehnmütigen Inkubation bei 37°C wurde die fertige Sonde entweder sofort zur Hybridisierung eingesetzt (2 Portionen zu je 15  $\mu$ l) oder mit 30  $\mu$ l Glycerin versetzt (2 Portionen zu je 30  $\mu$ l) und bis zu ihrer späteren Verwendung eingefroren.

### **3.8.5.4 Vorbereitung der Slot-Blot-Apparatur und Blotting**

Zur Vorbereitung wurde Whatman-Filterpapier (Kap. 8.1.6) und Hybond -Nylonmembran (Kap. 8.1.6) passend auf die rechteckige Fläche einer Slot-Blot-Apparatur (Kap. 8.1.5) zugeschnitten. Anschließend wurden zwei- bis drei Lagen des Whatman-Filterpapiers sowie die Hybond -Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Pufferlösung (Kap. 8.1.4.4) eingeweicht und auf die mittlere gelochte Kunststoffplatte der Slot-Blot-Apparatur gelegt. Die Nylonmembran wurde durch Kappen ihrer linken unteren Ecke markiert. Nach dem Aufsetzen der geschlitzten oberen Kunststoffplatte wurde die Slot-Blot-Apparatur durch die seitlichen Metallschnallen in diagonaler Reihenfolge verschlossen und an eine Wasserstrahl- oder Vakuumpumpe angeschlossen.

Als Ausgangsprobenlösung für das Nukleinsäureblotting diente eine 1:100 Verdünnung der PCR-Produkte in 2 x SSC-Pufferlösung. Zu 300  $\mu$ l der 2 x SSC-Pufferlösung wurde je 3  $\mu$ l der Amplifikate pipettiert. Die Schlitze der Slot-Blot-Apparatur wurden jeweils mit 100  $\mu$ l der gut durchmischten Probenlösungen beschickt.

Um mögliche Kontaminationen bei diesem Vorgang auszuschließen, wurden je sechs bis zehn Negativkontrollproben mit reiner SSC-Pufferlösung bzw. Probelösungen mit PCR-Produkten negativer Kontrollrinder zu jeder Nylonmembran (60 Proben/Nylonmembran) hinzugefügt.

Nach dem vollständigen Einsickern der Flüssigkeit wurde je ca. 100  $\mu$ l der 2 x SSC-Pufferlösung mit einer Pasteurpipette auf die Schlitze getropft. Die Pufferlösung wurde nachfolgend mit der Wasserstrahlpumpe vollständig durch die Membran und das Filterpapier

gesaugt. Im Anschluss an drei solche Spülvorgänge mit je ca. 100 µl der 2 x SSC-Pufferlösung wurde die Nylonmembran aus der Apparatur entnommen. Nacheinander wurde sie fünf Minuten lang in Denaturierungspuffer (Kap. 8.1.4.4), fünf Minuten lang in Neutralisierungspuffer (Kap. 8.1.4.4) und zwei Minuten lang in NaOH-Lösung (Kap. 8.1.4.4) geschwenkt, bevor sie schließlich für 15 - 30 Minuten in 20 x SSC-Pufferlösung belassen wurde.

An dieser Stelle konnte die Prozedur unterbrochen werden und die Membran in Haushaltsfolie eingewickelt bei -20°C im Gefrierschrank bis zu ihrer Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Um alle Plätze des Hybridisierungssofens auszulasten, wurden vor jedem Prähybridisierungsvorgang sechs Membranen auf diese Weise gesammelt.

### 3.8.5.5 Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion

Für den Vorgang der Prähybridisierung und Hybridisierung wurden die Membranen in zylindrische Glasgefäße mit Schraubverschluss verbracht, welchen jeweils 5 ml Prähybridisierungspuffer (Kap. 8.1.4.5) hinzugefügt wurde. Die Glasgefäße mit den Membranen wurden in den vorgeheizten Hybridisierungssofen bei 42°C verbracht, wo sie zur Prähybridisierung sechs Stunden lang unter Rotation inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von jeweils 15 µl der frisch markierten DNA-Sonden oder 30 µl der aufgetauten DNA-Sonden (mit Glycerinzusatz) zum Prähybridisierungspuffer. Für die anschließende Hybridisierung wurden die Membranen ca. 12 Stunden lang (über Nacht) bei 42°C unter Rotation im Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluss wurde die Hybridisierungslösung abgekippt und die Membranen wurden zweimal zwanzig Minuten lang mit dem auf 42°C vorgewärmten Waschpuffer (Kap. 8.1.4.5) gespült (wiederum bei 42°C und unter Rotation im Hybridisierungssofen). Dabei waren die Glasgefäße zu je zwei Drittel mit Waschpuffer gefüllt. Es folgte ein letzter fünfminütiger Spülvorgang in 2 x SSC-Pufferlösung bei offener Ofentüre (ca. 38°C), bevor die Membranen aus den Glasgefäßen entnommen wurden.

Für die Nachweisreaktion der hybridisierten Sonden-DNA wurden die Membranen mit ihrer Vorderseite nach oben je zwei Minuten lang in einer Schale mit Detektionslösung geschwenkt. Diese wurde unmittelbar zuvor durch Vermischen von je 5 ml der Detektionsreagensflüssigkeiten Nr. 1 und 2 des ECL-Kits hergestellt. Zur besseren Handhabung bei der Filmbelichtung und zur anschließenden Aufbewahrung wurden die Membranen nach der Entnahme aus der Detektionslösung in Frischhaltefolie eingepackt.

Die Nylonmembranen, welche Multiplex-PCR-Proben enthielten, wurden nacheinander mit den spezifischen DNA-Sonden für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah hybridisiert. Vor jedem neuen Prähybridisierungsvorgang wurden sie zweimal 20 Minuten lang in 20 x SSC-Pufferlösung bei 60°C und Rotation im Hybridisierungssofen gespült.

### 3.8.5.6 Filmbelichtung und -entwicklung

Während der Spülvorgänge der Nylonmembran mit dem Waschpuffer (Kap. 8.1.4.5) wurden in der Dunkelkammer Schalen mit Entwicklungs- und Fixierflüssigkeit und zum Wässern der Filme vorbereitet. Nach dem Schwenken der Nylonmembran in der Detektionslösung des ECL-Kits wurde umgehend der Film belichtet (Die Fluoreszenzreaktion hält nur begrenzte Zeit an!): Dazu wurde der markierte (an einer Ecke gekappte) Röntgenfilm in einer 24 x 36 Röntgenkassette auf die Vorderseite der Nylonmembran aufgelegt. Die Belichtungszeit wurde in Abhängigkeit von Hintergrundreaktionen zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten gewählt. Nach der Entnahme aus der Kassette wurde der Film zuerst zwei bis drei Minuten lang im Entwickler geschwenkt und nach kurzem Zwischenwässern etwa genauso lange im Fixierer geschwenkt. Es folgte ein letztes Wässern des Filmes unter fließendem Wasser und das Aufhängen des Filmes zum Trocknen.

Die Proben von Nylonmembranen, die Hintergrundsignale bei kurzer Belichtungsdauer zeigten, wurden erneut geblottet und hybridisiert.

## 3.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die deskriptive Statistik (Häufigkeiten, Kreuztabellen) wurde SPSS 9.0 verwendet; die aus den ermittelten Daten angefertigten Diagramme wurden mit MS Excel 2000 erstellt. Die approximativen 95%-igen Konfidenzintervalle der Hämatokrit-Mittelwerte wurden ausgehend von einer Normalverteilung mit SPSS 9.0 berechnet. Die Berechnung der exakten binomialen Konfidenzintervalle für die Alters-, Geschlechts- und Rasseanteile der BCT- bzw. PCR-positiven Rinder und für die BCT-Prävalenz beim ersten Besuch der ISMM-Blockbehandlungsstudie (Kap. 4.3.1) wurde nach Collett (1999) durchgeführt. Die PCR-Prävalenz des ersten Besuches  $P_{\text{PCR}}$  mit 95%-igen Konfidenzintervallen (KI) wurde wie nachfolgend dargestellt ermittelt:

$$P_{\text{PCR}} = w_1 P_1 + w_2 P_2$$

Wobei :

- $P_{\text{PCR}}$  = Wahrscheinlichkeit für ein PCR-positives Ereignis in der Stichprobe
- $P_1$  =  $P_{\text{PCR/BCT+}}$  = Wahrscheinlichkeit für ein PCR-positives Ergebnis bei einem BCT-positiven Rind; geschätzt wurden diese durch  $n_5/n_3 = 83/90$
- $P_2$  =  $P_{\text{PCR/BCT-}}$  = Wahrscheinlichkeit für ein PCR-negatives Ergebnis bei einem BCT-positiven Rind; geschätzt wurden diese durch  $n_6/n_4 = 34/90$

Unter der Annahme, dass  $P_{\text{BCT}}$  eine unverfälschte Schätzung der wahren BCT-Prävalenz zum Zeitpunkt des ersten Besuches der ISMM-Blockbehandlungsstudie war, sind

$w_1$  =  $P_{\text{BCT}+}$  = Wahrscheinlichkeit des Anteils BCT-positiver Rinder; geschätzt wurde diese durch  $n_1/N = 90/738$

$w_2$  =  $P_{\text{BCT}-}$  = Wahrscheinlichkeit des Anteils BCT-negativer Rinder; geschätzt wurde diese durch  $n_2/N = 648/738$

$N$  = Anzahl der Rinder in der gesamten Untersuchungsherde = 738

$n_1$  = Anzahl der BCT-Positiven in der gesamten Untersuchungsherde = 90

$n_2$  = Anzahl der BCT-Negativen in der gesamten Untersuchungsherde = 648

$n_3$  = Anzahl der BCT-Positiven in der PCR-Stichprobe =  $n_1 = 90$

$n_4$  = Anzahl der BCT-Negativen in der PCR-Stichprobe = 90

$n_5$  = Anzahl PCR-Positiver unter den BCT-Positiven der PCR-Stichprobe = 83

$n_6$  = Anzahl PCR-Positiver unter den BCT-Negativen in der PCR-Stichprobe = 34

Die Varianz und das 95% Konfidenzintervall (KI) wurden wie folgt berechnet:

$$\text{var} (P_{\text{PCR}}) = w_1^2 \times \text{var} (P_1) + w_2^2 \times \text{var} (P_2),$$

$$\text{wobei:} \quad \text{var} (P_1) = \frac{P_1 (1 - P_1)}{n_3} \quad \text{und} \quad \text{var} (P_2) = \frac{P_2 (1 - P_2)}{n_4}$$

$$\text{KI}_{\text{PCR}} = P_{\text{PCR}} \pm 1,96 (\text{var} (P_{\text{PCR}}))^{0,5}$$