

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Trypanosomosis - Krankheitsbild und Bedeutung

Die Trypanosomosis der Haus- und Nutztiere, hervorgerufen durch *T. congolense*, *T. brucei brucei* und *T. vivax*, wird Nagana genannt. Nagana stammt aus der Sprache der Zulu und bedeutet „Zustand des bedrückten Geistes“. Ursprünglich wurden so *T. b. brucei*-Infektionen bei Rindern bezeichnet, heute ist *T. congolense* der wichtigste Nagana-Erreger (LUCIUS, 1997).

Die Wirtsempfindlichkeit für die verschiedenen Nagana-Erreger ist je nach betroffener Art unterschiedlich. Equiden sind hochempfindlich für Trypanosomeninfektionen, erkranken häufig akut mit hohem Fieber und sterben oft schon nach wenigen Tagen. Hunde sind ebenfalls empfänglich und können während einer *T. congolense*-Infektion hohe Parasitämien, hohes Fieber, später Anämie und Gewichtsverluste entwickeln. Die Ausprägung der Symptome ist allerdings rasseabhängig. HÖRCHNER et al. (1985) konnten zeigen, dass einheimische westafrikanische Hunde (aus Liberia), die bis dahin noch nie mit Trypanosomen in Berührung gekommen waren, nach Infektion mit *T. congolense* nur milde Parasitämien und Symptome entwickelten, während zeitgleich infizierte europäische Hunderassen (Beagle) stark erkrankten und starben. Diese Form der Trypanotoleranz wird auch bei einigen westafrikanischen Rinderrassen gefunden (siehe 2.3.3). Die meisten Wildtiere werden mit den Erregern der Nagana infiziert, entwickeln jedoch nur leichte klinische Symptome und tolerieren die Infektion (COETZER et al., 1994). Als Erregerreservoir sind nicht nur sie für die Nagana von entscheidender Bedeutung. MEHLITZ (1979) untersuchte serologisch in Liberia 117 Schweine und 105 Hunde, da vermutet wurde, dass diese Tierarten auch ein mögliches Reservoir für *T. b. gambiense*, den Erreger der Schlafkrankheit des Menschen, bildeten. Bei rund 56% der untersuchten Schweine und 38% der untersuchten Hunde wurden Antikörper gegen die Nagana-Erreger gefunden. Von potentiell humaninfektiösen *T. brucei*-Arten in natürlich infizierten Schweinen wurde erstmals aus Liberia berichtet (MEHLITZ, 1977).

Die Trypanosomosis der Wiederkäuer verläuft je nach Erreger und betroffener Rasse als akute oder chronische Infektion. Ziegen und Schafe erkranken mäßig an *T. b. brucei* und *T. congolense* und entwickeln eine fortschreitende Anämie. Die meisten Rinderrassen

dagegen sind hochempfindlich für die Nagana-Erreger. Die akute Infektion beginnt meist mit einer Inkubationszeit von ungefähr zwei bis drei Wochen. Danach zeigen die erkrankten Rinder beim Auftreten der ersten Parasitämie hohes Fieber und Abgeschlagenheit (SEIFERT, 1992). Der Tod kann nach wenigen Wochen eintreten. *T. congolense*-Infektionen verlaufen bei Rindern meist chronisch über Monate bis hin zu einem Jahr (STEPHEN, 1986). Die Infektion ist in Abhängigkeit der wellenförmigen Parasitämien gekennzeichnet von intermittierenden Fieberanfällen und einer fortschreitenden Anämie. Die Folgeerscheinungen sind Abmagerungen, Konditionsverluste verbunden mit verminderter Arbeits- und Leistungsfähigkeit. Für bestimmte westafrikanische Rinderrassen (Baoulé, N'Dama) sind die Nagana-Erreger weniger pathogen. Diese Rassen werden zwar infiziert, zeigen aber nur milde Krankheitserscheinungen und weniger Leistungsabfälle (COETZER et al. 1994). Das Phänomen der Trypanotoleranz wird noch ausführlicher beschrieben (siehe 2.3.3).

Die afrikanische Trypanosomosis ist nicht nur als reine Einzeltierkrankung zu sehen. Ihre Bedeutung liegt vielmehr in ihrem Einfluss auf die Herdenproduktivität. In der kleinbäuerlichen Landwirtschaft in den afrikanischen Subtropen ist eine erfolgreiche Tierproduktion entscheidend für die tägliche Existenzsicherung. In der Provinz Kéné Dougou (Burkina Faso) wird die Tierhaltung häufig mit dem Ackeranbau kombiniert. Die Landwirte und ihre Familien brauchen die Rinder für die eigene Versorgung mit Milch und Fleisch und nutzen zusätzlich die Zugleistung der Tiere bei der Feldbestellung. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Kleinbauern durch den Einsatz von Zugtieren doppelt so viel Ackerfläche in der gleichen Zeit bearbeiten können, im Vergleich zur Feldbestellung ohne Rindereinsatz. Verminderte Milchleistungen und verringerte tägliche Gewichtszunahmen in der Herde bedrohen die Selbstversorgung der Familien. Körperlich schwache Tiere können nicht zur Feldarbeit herangezogen werden. Eine herabgesetzte Fruchtbarkeit in der Herde (späteres Erstkalbealter, verlängerte Zwischenkalbezeiten, geringere Abkalberaten) hemmen das essentielle Herdenwachstum zur Sicherung der täglichen Existenz und verhindern die Schaffung von Reserven für Notzeiten (BUDD, 1999).

## 2.2 Die Erreger

### 2.2.1 Klassifizierung

Trypanosomen sind einzellige Parasiten (Protozoa) der Gattung *Trypanosoma* aus der Familie der Trypanosomatidae, Ordnung Kinetoplastida.

Auf Grund unterschiedlicher Übertragungswege teilt man die Gattung in zwei Gruppen ein. Die eine Gruppe, Stercoraria, wird azyklisch mit dem Kot infizierter Tabaniden und Schildzecken übertragen und ist meist apathogen (*T. theileri*, *T. melophagium*). Die Chagas-Krankheit (Zoonose des Menschen) wird durch blutsaugende Raubwanzen verbreitet. Die andere Gruppe umfasst die Salivaria. Ihr Übertragungsweg ist zyklisch und erfolgt durch den Speichel infizierter Glossinen (Tsetsefliegen), blutsaugende Musciden der Familie Glossinidae. Die salivarischen Trypanosomen findet man südlich der Sahara, im tropischen Afrika, entsprechend der Verbreitung der Tsetsefliege („Tsetsefliegen-Gürtel“) (LEAK, 1999). Man unterteilt sie in die vier Untergattungen *Trypanozoon*, *Nannomonas*, *Duttonella* und *Pycnomonas* (siehe Tab. 1).

### 2.2.2 Morphologie

Die Familie der Trypanosomatidae zeigen einen ausgeprägten Gestaltwechsel. Die Bezeichnung der verschiedenen Formen richtet sich nach der Geißel und ihrer Lage zum Zellkern (HOARE, 1972) (siehe Tab. 2).

Tab. 1: Gattung *Trypanosoma*: Arten und Wirtsspektrum

Gruppe:	Untergattung:	Spezies, Subspezies:	Vertebraten-Wirt:
Stercoraria:		<i>T. cruzi</i>	Menschen, Haus-, Wildtiere
		<i>T. theileri</i>	Rinder
		<i>T. lewisi</i>	Ratten
		<i>T. melophagium</i>	Schafe
		<i>T. rangeli</i>	Ratten, Menschen
Salivaria:	<i>Duttonella</i>	<i>T. vivax</i>	Wiederkäuer, Equiden
		<i>T. uniforme</i>	
	<i>Nannomonas</i>	<i>T. congolense</i>	Wiederkäuer, Raubtiere
		<i>T. simiae</i>	Schweine
	<i>Trypanozoon</i>	<i>T. brucei</i>	
		<i>T. brucei brucei</i>	Wiederkäuer, Equiden, Schweine, Nager
		<i>T. brucei gambiense</i>	Menschen, Affen, Hund, Schwein, Antilopen
		<i>T. brucei rhodesiense</i>	Menschen, Wiederkäuer, Schweine
		<i>T. brucei evansi</i>	Wiederkäuer, Kamele, Hunde
		<i>T. brucei equiperdum</i>	Equiden
<i>Pycnomonas</i>	<i>T. suis</i>	Schweine	

Bei den im Blut der Säugetiere zirkulierenden Trypanosomen kennt man „monomorphe“ (einheitliche Gestalt) und „pleomorphe“ (schlanke/„slender“ oder gedrungene/„stumpy“ Formen) Arten (HOARE, 1972). Blutformen haben einen lanzettförmigen Körper mit einem spitz auslaufenden Vorderende und einem, je nach Spezies/Subspezies charakteristischen Hinterende. Die Geißel zieht über den Körper hinweg nach vorn, wobei sie sich an einigen Stellen am Zellkörper anheften kann („undulierende Membran“). Durch die Geißelbewegungen wird der Zellkörper nach vorn angetrieben. Im Zellinneren liegt der ellipsoide

Zellkern (meist zentral oder im vorderen Teil) und der Kinetoplast (Mitochondriumfunktion, Lage meist hinter dem Zellkern). Der Kinetoplast als Teil des mitochondrialen Systems enthält ein Netzwerk von DNA-Ketten, die aus etwa 20-50 größeren Ringen („maxicircles“) und 5 000 bis 10 000 kleineren Ringen („minicircles“) bestehen. Die Maxicircles codieren für mitochondriale Proteine und ribosomale RNA.

Tab. 2: Trypanosomatidae: die verschiedenen Gestalten (Formen) und ihre Bezeichnung

Bezeichnung	Vorkommen	Gestalt
Trypomastigot	Wirbeltiere	Geißelursprung hinter dem Zellkern, Geißel zieht entlang der Oberfläche nach vorn (unter Ausbildung einer „undulierenden Membran“)
Epimastigot	Insekten	Geißelursprung kurz vor dem Zellkern mit „undulierender Membran“
Promastigot	Insekten	Geißelursprung am vorderen Zellpol
Amastigot	Wirbeltiere	„geißellos“ Geißel nur mit dem Elektronenmikroskop sichtbar

### 2.2.3 Immunbiologie – „Antigenvarianz“

Der Zellkörper von Trypanosomen ist umgeben von einer einfachen Zellmembran (8 nm dick), auf der bei den Trypanosomenblutstromformen eine weitere ca. 12-15 nm dicke Schicht, der sogenannte „surface coat“ sitzt. Dieser „surface coat“ wird gebildet von einem einzigen Glycoprotein (variable surface glycoprotein VSG), welches sich verändern kann. Es ist für die besondere Fähigkeit der Trypanosomen verantwortlich, die Immunabwehr des Wirtstieres zu umgehen. Nach der Infektion kommt es innerhalb des Wirtes zur Trypanosomenvermehrung, wobei bestimmte Trypanosomenpopulationen mit spezifischen Antigenstrukturen (VSG) dominieren (Variante oder Klon A). Gegen diese VSGs bildet der

Wirtsorganismus spezifische Antikörper, die nach ca. einer Woche, zusammen mit unspezifischen Abwehrmechanismen (Phagozytose und Komplementlyse), diesen Teil der Trypanosomenpopulation eliminieren, und einen Abfall der Parasitämie bewirken. Eine zuvor durch die erste Variante A unterdrückte Trypanosomenpopulation mit neuem Oberflächen-Glycoprotein (Variante oder Klon B) bleibt zurück, vermehrt sich und führt zu einem erneuten Parasitämieanstieg. Es kommt zur Bildung spezifischer Antikörper gegen die Variante B, die schließlich diese Trypanosomenpopulation abtöten. Die Dezimierung der B-Variante begünstigt wiederum die Vermehrung einer neuen Trypanosomenpopulation, die C-Variante und so fort. Die Infektion wird chronisch und zeigt einen typisch wellenförmigen Parasitämieverlauf. Die antigene Variation wird durch entsprechende Gene, die sogenannten VSG-Gene codiert. Trypanosomenblutstromformen besitzen etwa 1000 Gene, die in einer bestimmten Abfolge aktiviert werden (CROSS, 1975).

#### 2.2.4 Stoffwechsel

Je nach Entwicklungsstadium zeigen Trypanosomen verschiedene Energiemetabolismen, die eine Veränderung ihrer Zellstrukturen und -organellen zur Folge haben. Im Vertebratenwirt nutzen Trypanosomen die Blutglucose des Wirtes als Energiequelle, die sie im Zellinneren in den Glycosomen abbauen. Das Mitochondrium der Trypanosomenzelle ist entsprechend zurückentwickelt und der Kinetoplast liegt bei den Trypanosomenblutstromformen hinter dem Zellkern. Die Tsetsefliege dagegen nutzt hauptsächlich Prolin als Energiequelle, was zur Folge hat, dass Trypanosomen in der Tsetsefliege ihren Metabolismus von einem glycolytischen auf einen oxidativen umstellen. Das Mitochondrium vergrößert sich, die Glycosomen ändern ihre Form und der Kinetoplast verlagert sich vor den Zellkern. Die Aufnahme der verschiedenen Nährstoffe erfolgt durch Phago- und Pinocytose. Die Pinocytose ist ein Rezeptor-vermittelter Prozess im Bereich der Geißeltasche, der speziell für die Aufnahme von bestimmten Proteinen (Serum-Albumin) verantwortlich ist (VICKERMANN, 1985).

#### 2.2.5 *Trypanosoma congolense*

*T. congolense* wurde zuerst 1904 durch BRODEN in Leopoldville (Kongo) im Blut von Schafen und eines Esels entdeckt. *T. congolense* ist die kleinste Trypanosomenart mit einer durchschnittlichen Länge von 8-20 µm. Es gibt keine freie Geißel und der Kinetoplast liegt meist subterminal und marginal (HOARE, 1972). Die Körperform ist typisch lanzettförmig mit einem stumpfen Hinterende und einem lang auslaufenden Vorderende (siehe Abb. 1).

Im Blut zeigt *T. congolense* die Eigenschaft, sich an die Blutzellen oder Gefäßwände anzuheften (HEMPHILL et al., 1994). Der Erreger wird durch die Blutzellen verdeckt, weshalb im Nativpräparat die Diagnostik von *T. congolense*-Infektionen deutlich schwieriger ist.



Abb. 1: *T. congolense*-Stamm FAM1788 aus Burkina Faso im Blut von *M. coucha*

*T. congolense* wird durch Glossinen der *Palpalis*-, der *Morsitans*- und der *Fusca*-Gruppe übertragen und kommt daher im gesamten Verbreitungsgebiet der Tsetsefliegen vor. Der Entwicklungszyklus in der Fliege dauert zwei bis drei Wochen. Zwischen 10-15% der Fliegen können mit *T. congolense* befallen sein (LEAK, 1999).

Alle Trypanosomenpopulationen besitzen bestimmte Isoenzyme (verschiedene auftrennbare Enzymformen im gleichen Organismus und mit gleicher katalytischer Aktivität), deren Muster Rückschlüsse auf ihre phylogenetische Beziehung geben. Ein Vergleich der verschiedenen Isoenzymmuster mittels Elektrophorese konnte aufzeigen, dass die verschiedenen

*T. congolense*-Populationen in weitere vier Untergruppen (*Savanna, Forest, Kilifi* und *Tsavo*) eingeteilt werden können (GARSIDE und GIBSON, 1995).

## **2.3 Bekämpfung der Trypanosomosen**

Bei der Bekämpfung der Trypanosomosis gibt es zwei grundsätzliche Vorgehensweisen. Die eine bekämpft den Überträger der Krankheit (Tsetsefliege), während die andere Vorgehensweise sich gegen die Krankheit selbst (Trypanosomen) richtet.

Die Vektorenbekämpfung hat zum Ziel, aus einem bestimmten Gebiet entweder die Tsetsefliegen vollständig zu entfernen („tsetse fly eradication“) oder aber ihre Zahl soweit wie möglich zu reduzieren und auf diesem Niveau zu halten („tsetse fly control“). Völliges Ausmerzen der Glossinen ist extrem aufwendig, kostenintensiv und technisch kaum zu bewältigen. Eine permanent drohende Reinvansion der Fliege in das befreite Gebiet muss dauerhaft verhindert werden. Praktikabler und wirtschaftlicher ist die Tsetsefliegenkontrolle, die so weit wie möglich den Vektor reduziert und entsprechende Kontrollmaßnahmen einsetzt, um die Glossinenzahl niedrig zu halten (BUDD, 1999).

Andere Vorgehensweisen der Bekämpfung richten sich direkt gegen die Trypanosomen selbst. Mit Hilfe der Chemoprophylaxe bzw. Chemotherapie werden Trypanosomeninfektionen entweder verhindert oder therapiert. Der Einsatz trypanotoleranter Rinderrassen verhindert zwar nicht die Infektion mit den Blutparasiten; man nutzt jedoch die Fähigkeit bestimmter autochthoner Rinderrassen aus, eine Trypanosomeninfektion bei erhaltener Leistungsfähigkeit für Milch und Fleisch zu überstehen.

### **2.3.1 Bekämpfung der Vektoren (Tsetsefliegen)**

#### **2.3.1.1 „Spraying“**

In den 50iger bis 80iger Jahren wurde versucht, die Tsetsefliegen durch das Versprühen von Organochlorinen (chlorierte Kohlenwasserstoffe) in Kombination mit der Vernichtung ihres Habitats zu bekämpfen. Durch gezielte Rodungen wurden Ruhe- und Brutplätze beseitigt. Da Tsetsefliegen nicht auf offenem, baum- und strauchlosem Gelände existieren und ungern längere freie Strecken überfliegen, wurden Totalrodungen um Stallungen als natürliche Barriere vorgenommen. Die Habitatvernichtung führte jedoch lediglich zu einer Verdrängung der Tsetsefliege, nicht zu ihrer Eindämmung. Heutzutage werden Rodungen aufgrund der

damit verbundenen Erosionsgefahren und möglichen Vernichtung fruchtbarer Ackerlandes nicht mehr als Mittel der Wahl bezeichnet. Die Organochlorine wurden mit Hilfe von Handsprühgeräten versprüht („Ground Spraying“). Diese Methode wurde sehr erfolgreich in Nigeria eingesetzt und schaffte ein tsetsefliegenfreies Gebiet von 200.000 km<sup>2</sup> (JORDAN, 1978). Die chlorierten Kohlenwasserstoffe waren auf Grund ihrer Persistenz und dem dadurch entstehenden Langzeiteffekt sehr gut wirksam und auf Grund ihrer niedrigen Kosten recht beliebt. Ein wachsendes Umweltbewusstsein in den achtziger Jahren führte dazu, dass ihre Verwendung wegen der nachhaltigen Umweltbelastung und der Kontamination der Nahrungskette von Vögeln und Fischen zunehmend kritischer betrachtet wurde (HOLMES, 1997).

Es wurde eine neue Generation der Insektizide, die Pyrethroide, entwickelt und angewendet. Sie sind wesentlich umweltfreundlicher und werden beim sogenannten „Aerial Spraying“ eingesetzt. Flugzeuge („Starrflügler“) oder Hubschrauber fliegen knapp oberhalb der Baumspitzen und verbreiten die Pyrethroide in Form eines Aerosols, das auf die Blätter niederfällt. Eine Anwendung geringer Dosen bis zu fünf Male hintereinander („Sequential Aerosol Technique“) ist sehr effizient, da die meisten frisch geschlüpften Tsetsefliegen mit dem Pyrethroid in Kontakt kommen, bevor sie das vermehrungsfähige Alter erreicht haben (HOLMES, 1997).

Beide Sprühmethoden führen zu einer deutlichen Reduktion der Tsetsefliegenpopulation in einem Gebiet. Sie sind jedoch, besonders bei einer niedrigen Fliegenpopulationsdichte, extrem kostenintensiv. Die Ausgaben variieren je nach Anzahl benötigter Arbeitskräfte, Transportaufwand, verwendetem Insektizid (Pyrethroide sind wesentlich teurer im Vergleich zu den chlorierten Kohlenwasserstoffen) und der Art des Geländes (Einsatz von teuren Helikoptern).

#### 2.3.1.2 „Pour-on“

Die synthetischen Pyrethroide werden zusätzlich auch bei anderen Bekämpfungsmaßnahmen eingesetzt. In Form von konzentrierten „Pour-on“-Formulierungen werden Rinder behandelt, besprüht oder durch Insektizidbäder getrieben. Das Insektizid verteilt sich über das gesamte Rind und paralyisiert jede zur Blutmahlzeit auf dem Tier landende Tsetsefliege („Knock Down Effect“). In Samorogouan, Burkina Faso, wurden 1990 in einem Projekt rund 2000 Rinder mit Deltamethrin 1% als Spot-on behandelt. In dem Gebiet mit anfänglich hohem Tsetsefliegenvorkommen (54 Fliegen/Falle/Tag) war nach Ablauf von 11 Monaten die Tsetsefliegenpopulation deutlich dezimiert (nur noch 0,6-2 Fliegen/Falle/Tag)

(BAUER et al., 1995). Dieses einfache Kontrollverfahren ist relativ preiswert, sehr gut gegen Tsetsefliegen und zusätzlich auch gegen andere stechende Fliegen wirksam (BUDD, 1999).

#### 2.3.1.3 Tsetsefliegenfallen

Ein häufig angewendetes Verfahren in kleineren Gebieten ist das Aufstellen von Tsetsefliegenfallen. Diese Fallen sind mit bestimmten Lockstoffen präpariert und haben spezielle Formen und Farbkontraste bzw. Hell-Dunkel-Verhältnisse, auf die die Tsetsefliegen reagieren. Der untere Teil der Fallen besteht meist aus dunkelblauer Gaze und einem schwarzen Einlassschlitz, der obere Teil aus hellem Stoff. Die Glossinen werden vom dunklen Stoff angelockt, fliegen unten hinein und verfangen sich bei dem Versuch, die Falle nach oben in Richtung Licht zu verlassen. Eine weitere Methode ist die Verwendung von mit Pyrethroid getränkten schwarzen Tüchern. Sobald die Tsetsefliegen auf den Tüchern landen, erhalten sie durch den Kontakt eine tödliche Dosis des Insektizids.

In Äthiopien (Ghibe Valley) wurden 1990 im Rahmen eines Tsetsefliegenbekämpfungsprogrammes mit Deltamethrin präparierte Fallen aufgestellt. Die täglich gefangene Tsetsefliegenzahl reduzierte sich innerhalb von 12 Monaten von 2,1 Fliegen/Falle/Tag auf 0,4 Fliegen/Falle/Tag (LEAK et al., 1996). Rund 110.000 Fallen schützen im östlichen und südlichen Afrika eine Fläche von 30.000 km<sup>2</sup> (BUDD, 1999). Eine Dezimierung der Tsetsefliegen tritt bei dieser Methode im Vergleich zu den Sprüh-Anwendungen erst nach einem längeren Zeitraum ein. Die regelmäßige Überprüfung der Fallen (Erneuerungen von Lockstoffen, Insektiziden und Tüchern) und ihr Schutz vor Diebstählen ist zudem aufwendig (HOLMES, 1997).

#### 2.3.1.4 Sterile-Männchen-Technik

Eine biologische Methode zur Bekämpfung der Tsetsefliege ist die Freilassung von im Labor gezüchteten, zeugungsunfähigen Tsetsefliegenmännchen („Sterile Male Technique“). Die Basis für diese Methode ist die Tatsache, dass Tsetsefliegenweibchen nur einmal in ihrem Leben begattet werden können. Die sterilen Männchen werden in einem Gebiet in großer Zahl ausgesetzt, mindestens im Verhältnis 6:1 zu den natürlichen Männchen, (SEIFERT, 1992) und konkurrieren bei der Vermehrung mit den natürlichen Tsetsefliegenmännchen. Die Tsetsefliegenpopulation wird sich durch fehlende Nachbrut im Laufe der Zeit verringern.

Die Sterile-Männchen-Technik wurde in drei großen Zentren entwickelt: in Tanga in Tansania, in Nigeria im Rahmen des Bicot-Programmes und im „Centre International de Recherche-Development sur l'Eleveage en Zone subhumide (CIRDES)“ in Burkina Faso. Die

„International Atomic Energy Authority (IAEA)“ war in den meisten Fällen an den Projekten mitbeteiligt. 1994 wurde mit ihrer Hilfe auf Sansibar ein Programm gestartet, in dessen Verlauf über 7,8 Mio Tsetsefliegen (*G.austeni*) freigelassen wurden (Verhältnis 50:1 zu den natürlichen Männchen). 1996 wurden keine Fliegen der natürlichen Populationen mehr in Fallen gefangen, 1997 ihre Ausrottung bestätigt (LEAK, 1999).

Nachteilig an dieser Methode sind der Zeitaufwand und die sehr hohen (Labor-)kosten (höher als der Gebrauch von Insektiziden), mit denen die sterilen Männchen gezüchtet werden. Zusätzlich sind die bestrahlten Männchen deutlich kurzlebiger, so dass ausreichende Barrieren (Insektizideinsatz, Fallen) geschaffen und unterhalten werden müssen, um die Reinvansion von natürlichen Tsetsefliegenpopulationen zu verhindern.

### 2.3.2 Bekämpfung der Erreger (Trypanosomen)

#### 2.3.2.1 Impfstoffe

Die Entwicklung wirksamer Impfstoffe gegen Trypanosomen ist auf Grund ihrer Fähigkeit zur Antigenvarianz (siehe 2.2.3) bisher wenig aussichtsreich. Ein Impfschutz auf Basis der variablen Oberflächenglycoproteine ist wegen der nahezu unbegrenzten Antigen-Variationen nicht möglich.

#### 2.3.2.2 Chemoprophylaxe und –therapie

Eine der wichtigsten Methoden in der Bekämpfung der Trypanosomosis war und ist nach wie vor die Chemotherapie bzw. –prophylaxe (HOLMES und SCOTT, 1982, HOLMES, 1997). Die Entwicklung von Trypanoziden für die Veterinärmedizin begann in den frühen fünfziger Jahren. Ihre Marktzulassung erfolgte Anfang der sechziger Jahre und sie werden seitdem bis heute verwendet. Für den Einsatz bei Rindern sind die drei Mittel Isometamidium, Homidium und Diminazen zugelassen (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Für Rinder verwendete Trypanozide

Wirkstoff	Salz	Handelsname	Dosierungen (mg/kg i.m.)	Wirkung gegen
Isometamidium	-chlorid	Samorin <sup>®</sup> Trypamidium <sup>®</sup>	0,25-0,5 (Therapie) 0,5-1,0 (Prophylaxe)	<i>T. congolense</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. vivax</i> <i>T. b. evansi</i>
Homidium	-chlorid -bromid	Novidium <sup>®</sup> Ethidium <sup>®</sup>	1,0 (Therapie/Prophylaxe)	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>
Diminazen	-aceturat	Berenil <sup>®</sup> Veriben <sup>®</sup> Ganaseg <sup>®</sup>	3,5 (Therapie) 7,0 ( <i>T. b. brucei</i> )	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. b. brucei</i>

Isometamidium und Homidium gehören in die chemische Gruppe der Phenanthridine, deren trypanozide Wirkung bereits Ende der dreißiger Jahre entdeckt wurde (BROWNING et al., 1938). Phenanthridine lagern sich in die Kinetoplast- und Kern-DNA der Trypanosomen ein und hemmen damit die Nukleinsäuresynthese.

Isometamidium ist seit 1961 zur Prophylaxe und zur Therapie bei Trypanosomosis zugelassen. Es wirkt bei Rindern gegen *T. vivax*, *T. congolense* und *T. b. brucei*, und kann auch bei Equiden gegen *T. b. evansi* eingesetzt werden. Die prophylaktische Dosis ist 1 mg/kg und bietet einen sehr variablen Schutz gegen Trypanosomeninfektionen, der zwischen 2-22 Wochen liegt (KIRKBY, 1964; TRAIL et al., 1985, PINDER und AUTHIE, 1984, PEREGRINE et al., 1991). Die Prophylaxisdauer ist abhängig von dem in der Region herrschenden Trypanosomeninfektionsdruck und der allgemeinen Resistenzsituation. Wichtig ist auch, ob die Rinder zum Zeitpunkt der Behandlung mit Trypanosomen bereits infiziert waren. Die therapeutische Dosis von Isometamidium liegt zwischen 0,25-0,5 mg/kg Körpergewicht. Mit der Entwicklung von Isometamidiumimplantaten („Sustained Release Device, SDR“), die unter die Haut von Rindern platziert werden und dort kontinuierliche Mengen des Medikaments abgeben, konnte die prophylaktische Wirkung von Isometamidium gegenüber der einmaligen intramuskulären Injektion verlängert werden. GEERTS et al. (1997) wiesen nach, dass die Serumkonzentrationen von Isometamidium nach Verabreichung eines Implantates über einen Zeitraum von fünf Monaten wesentlich konstanter war als nach einer intramuskulären Injektion.

Der andere Wirkstoff der Gruppe, Homidium, wirkt speziell gegen *T. congolense* und *T. vivax* und befand sich besonders in den sechziger und siebziger Jahren im Einsatz. Mit Zunahme der Chemoresistenzen wurde seine Effektivität stark herabgesetzt. Die prophylaktische Wirkung hält zwischen 2-19 Wochen an (LEACH et al., 1955, DOLAN et al., 1990, 1992). Obwohl schon lange bekannt ist, dass das Medikament auch eine mutagene Wirkung hat (MAC GREGOR und JOHNSON, 1967), befindet es sich immer noch im Einsatz.

Der dritte für Rinder zugelassene Wirkstoff ist Diminazen, ein aromatisches Diamidin, das sich von Surfen C ableitet (JENSCH, 1958) und als Diaceturatsalz auf dem Markt erhältlich ist. Auch dieses Medikament wirkt auf den Kinetoplasten in Form einer Bindung an die Kinetoplast- DNA (kDNA). Andere Wirkungsmechanismen können allerdings nicht ausgeschlossen werden (PEREGRINE und MAMMAN, 1993). In den fünfziger Jahren wurde in ersten Versuchen festgestellt, dass das Medikament äußerst wirksam sowohl gegen Trypanosomen als auch gegen Babesien war (BAUER, 1955; 1958). Da Diminazen im Organismus schnell abgebaut wird, wird es nur als Therapeutikum und nicht zur prophylaktischen Behandlung eingesetzt. VAN HOEVE und CUNNINGHAM (1964) konnten allerdings im Serum von behandelten Rindern eine prophylaktische Wirkung von bis zu drei Wochen feststellen. Die empfohlene therapeutische Dosis für *T. vivax*- und *T. congolense*-Infektionen im Rind liegt bei 3,5 mg/kg. Bei *T. b. brucei*- Infektionen wird die doppelte Dosis (7 mg/kg) angewendet. Der Diminazeneinsatz hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Das Medikament besitzt einen höheren therapeutischen Index als andere Mittel und zeigte häufig dann noch eine Wirkung, wenn Behandlungen mit anderen Trypanoziden (z.B. Isometamidium) nicht mehr ansprachen (WILLIAMSON, 1970, 1976). Im Zuge der häufigeren Anwendung stieg auch die Anzahl der Berichte über Resistenzentwicklungen bei Diminazen (PEREGRINE, 1994). In Labor- und Feldstudien fand man heraus, dass die Trypanozide Quinapyramin (zur Anwendung bei Kamelen und Pferden) und Cymelarsan<sup>®</sup> (zur Anwendung bei Kamelen) Kreuzresistenzen zu Diminazen entwickeln. Als Ursache vermutet man, dass Diminazen, die durch Cymelarsan<sup>®</sup> induzierte Zellysis, aufhebt (ROSS und BARNS, 1996). Das Konzept des Gebrauchs von „sanative pairs of drugs“, erstmalig vorgeschlagen von WHITESIDE (1960) und aktuell vom ICPTV-Workshop (April 2000) immer noch befürwortet, sieht vor, in Regionen mit Resistenzproblemen nur die Medikamente einzusetzen, die keine Kreuzresistenzen zu einander erzeugen (Isometamidium und Diminazen; Homidium und Diminazen) (PEREGRINE und MAMMAN, 1993).

Alle drei Trypanozide sind sehr toxisch (besonders enge therapeutische Breite bei Diminazen, PEREGRINE, 1994). Sie sind stark geweberreizend, was häufig zu Schäden an

den Injektionsstellen führt. Für Isometamidium wird empfohlen, eine Dosis von mehr als 15 ml auf zwei Injektionen an verschiedenen Stellen zu verteilen.

### 2.3.3 Trypanotolerante Rinderrassen

Bestimmte autochthone, taurine Rinderrassen (z.B. Ndama, Baoulé) zeigen trypanotolerante Eigenschaften. Sie werden zwar von Trypanosomen infiziert, tolerieren die Krankheit jedoch besser als Zebu-Rassen oder europäische Hochleistungsrinder. Die Anämie entwickelt sich langsamer, wodurch bei diesen Rindern die Produktivität (Milch-, Fleischleistung, Arbeitskraft) erhalten bleibt. Mischinfektionen mit anderen Parasiten oder Krankheitserregern werden leichter überstanden im Vergleich zu den hochempfindlichen Rinderrassen (D'ETEREN et al., 1998).

Obwohl der Einsatz trypanotoleranter Rinder eine sehr geeignete Bekämpfungsmethode ist, ist die Akzeptanz dieser Rinderrassen bei den afrikanischen Farmern eher mäßig. Trypanotolerante Rinder sind kleinrahmiger und liegen in ihrer Milchleistung deutlich niedriger im Vergleich zu den populärerem größeren (europäischen) Rassen bzw. Rindern mit hohem Zebu-Anteil (JABBAR et al., 1995). Zählungen in Westafrika (1983) ergaben, dass es rund 10 Millionen trypanotolerante Rinder gegenüber 44 Millionen empfängliche Rinderrassen gibt (SHAW und HOSTE, 1987). Der Versuch, durch gezielte Kreuzungen eine leistungsfähige, trypanotolerante Rinderrasse zu schaffen, war wenig erfolgreich, da das besondere Resistenzpotential der autochthonen Rinder in den Kombinationskreuzungen verloren geht (SEIFERT, 1992).

## 2.4 Chemoresistenz

### 2.4.1 Vorkommen trypanozidresistenter Trypanosomen

In Afrika leben etwa 44 Millionen Rinder mit dem Trypanosomeninfektionsrisiko, in einem von Tsetsefliegen bevölkerten Gebiet von rund 7 Millionen km<sup>2</sup> (PEREGRINE, 1994). In vielen Regionen sind Rinder und andere landwirtschaftliche Nutztiere nur durch prophylaktische Behandlung bzw. regelmäßige Therapie zu halten. Die heute für Rinder zugelassenen Trypanozide Isometamidium, Homidium und Diminazen (siehe 2.3.2.2) wurden vor rund 40 Jahren entwickelt. Erste Berichte über das Auftreten von Resistenzen gab es bereits kurz nach ihrer Markteinführung. Ende der sechziger Jahre erschienen Veröffentlichungen über

Resistenzen gegenüber Isometamidium, Homidium und Diminazen in Nigeria, Tschad, in der Zentralafrikanischen Republik und Kenia. Anfang der siebziger Jahre berichtete man von resistenten *T. congolense*-Populationen in Uganda, im Sudan und in Tansania. In den achtziger Jahren folgten Publikationen über Resistenzen in der Côte d'Ivoire und Burkina Faso. Insgesamt sind 13 afrikanische Staaten (Äthiopien, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Kenia, Nigeria, Uganda, Sambia, Somalia, Sudan, Tansania, Tschad, Zimbabwe, Zentralafrikanische Republik) südlich der Sahara betroffen, In acht dieser Staaten fand man Mehrfachresistenzen (PEREGRINE, 1994, GEERTS und HOLMES, 1998, siehe Tab. 4). Da bisher nicht in allen afrikanischen Ländern Untersuchungen zur Medikamentenempfindlichkeit durchgeführt wurden, können durchaus noch weitere Länder betroffen sein. Die veröffentlichten Daten beschreiben zumeist nur einzelne Projekte in bestimmten Regionen und geben daher keine Auskunft über die Situation in dem gesamten jeweiligen Land.

Tab. 4: Übersicht über afrikanische Länder mit Trypanozidresistenzen bei Rindern (Publikationen)

Land	Trypanosomenart	Resistenz gegen	Publikation
Äthiopien	<i>T. congolense</i>	ISMM, DIM, HOM	CODJIA et al., 1993 AFEWERK et al., 2000
Burkina Faso	<i>T. congolense</i>	ISMM, DIM, HOM	PINDER und AUTHIÉ, 1984 CLAUSEN et al., 1992
Côte d'Ivoire	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	ISMM, HOM	KÜPPER und WOLTERS, 1983
Kenia	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	ISMM, DIM, HOM	GITATA, 1979 RÖTTCHER und SCHILLINGER, 1985 SCHÖNEFELD et al., 1987
Nigeria	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	ISMM, DIM, HOM	JONES-DAVIES und FOLKERS, 1966 JONES-DAVIES, 1967 GRAY und ROBERTS, 1971
Somalia	<i>T. vivax</i>	ISMM, HOM	SCHÖNEFELD et al., 1987 AINANSHE et al., 1992
Sudan	<i>T. congolense</i> <i>T. brucei</i> <i>T. vivax</i>	ISMM, HOM	ABDEL GADIR et al., 1972 MOHAMED-AHMED et al., 1992
Tansania	<i>T. congolense</i>	DIM	NJAU et al., 1981
Tschad	<i>T. vivax</i>	DIM	GRABER, 1968
Uganda	<i>T. brucei</i> <i>T. vivax</i>	ISMM, DIM	MATOVU et al., 1997
Zimbabwe	<i>T. congolense</i>	ISMM, DIM	JOSHUA et al., 1995

ISMM = Isometamidium  
 DIM = Diminazen  
 HOM = Homidium

## 2.4.2 Mechanismus der Medikamentenresistenz

Der Mechanismus der Resistenzentstehung bei Trypanosomen ist noch weitestgehend unklar. Die These, dass resistente Trypanosomen sich durch einen veränderten Stoffwechsel (chemische Veränderung des Medikaments, was zur seiner Unwirksamkeit führt), der trypanoziden Wirkung der Medikamente entziehen, konnte im Bereich der humanen Trypanosomosis und Melarsoprol nicht bestätigt werden, so dass sich die Untersuchungen vermehrt auf den Medikamententransport in die Zelle konzentrierten (ROSS und SUTHERLAND, 1997). Studien an Krebszelllinien (FOJO et al., 1985; KARTNER und LING, 1989), Protozoen wie *Plasmodium falciparum* (KROGSTAD et al., 1987) und *Entamoeba histolytica* (SAMUELSON et al., 1990) ergaben einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten Medikamentenkonzentration in der Zelle und Bestehen einer Resistenz gegenüber dem Medikament. Wie es zu der verminderten Medikamentenkonzentration in der Zelle kommt, ist noch nicht bekannt. Man vermutet zum einen eine geringere Aufnahme des Medikaments in die Zelle (DAMPER und PATTON, 1976), zum anderen wird eine erhöhte Ausscheidung des Medikaments aus der Zelle dafür verantwortlich gemacht (KROGSTAD et al., 1987; KARTNER und LING, 1989; SAMUELSON et al., 1990).

Untersuchungen von SUTHERLAND et al. (1991) zeigten bei sensitiven *T. congolense*-Populationen eine schnellere Isometamidiumaufnahme in die Zelle pro Zeiteinheit als bei den resistenten Trypanosomenpopulationen. Sie konnten mit ihren Ergebnissen jedoch die zusätzliche Beteiligung einer aktiven Medikamentenausscheidung aus der Zelle nicht ausschließen. SUTHERLAND und HOLMES (1993) demonstrierten einen erhöhten Rückfluss von Isometamidium aus der Zelle. MULUGETA et al. (1997) zeigten beim Vergleich von sensitiven und resistenten Trypanosomenpopulationen, dass die Isometamidiumaufnahme (Vmax) bei den resistenten Populationen signifikant niedriger war als bei den sensitiven Populationen.

Für den Transport von Trypanoziden in die Zelle werden verschiedene Membrantransportproteine verantwortlich gemacht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Melarsoprol über einen Nukleosidtransporter in die Trypanosomenzelle transportiert wird. Trypanosomen kennen keine *de-novo*-Purin-synthese und verfügen zum Ausgleich über eine Vielzahl substrat-spezifischer Nukleosidtransporter (ROSS und SUTHERLAND, 1997). CARTER und FAIRLAMB (1993) zeigten, dass melarsoprolsensitive *T. b. brucei*-Klone einen Nukleosidtransporter besaßen, mit Hilfe dessen sie Adenosin, Adenin und Melarsoprol in die Zelle transportierten. Wurden diese Klone gegen Melarsoprol resistent gemacht, so fehlte dieser

Transporter oder er war verändert. Ähnlich schien es sich mit Cymelarsan, dem 1990 neu auf den Markt erschienen Trypanozid für Kamele, zu verhalten (ROSS und BARNES, 1996).

Die Gruppe der ABC-Transporter („ATP-binding cassette transporters“) spielt eine wesentliche Rolle im Bereich der Resistenzen bei Krebszellen (RIORDAN et al., 1985) und Hefen. Sie scheinen auch an Mehrfachresistenzbildungen bei pathogenen Protozoen beteiligt zu sein (WILSON et al., 1989, 1993; SAMUELSON et al., 1990; CHOW et al., 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass ABC-Transporter aktiv toxische Moleküle aus dem Cytosol entfernen, sowohl bei eukaryotischen als auch bei prokaryotischen Zellen (DOIGE und FERRO-LUZZI AMES, 1993). Um mehr Einblick in den Mechanismus des Membrantransportes bei Trypanosomen zu erhalten, wurden Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von trypanosomalen Proteinen durchgeführt, die am Substrattransport durch Membranen beteiligt sein sollen. MÄSER und KAMINSKY (1998) beschrieben die Identifizierung von drei Genen in *Trypanosoma brucei* spp., die für ABC-Transporter kodieren. Es bleibt zu klären, ob die verringerte Aufnahme von Isometamidium auf ähnliche Weise, d.h. durch eine geringere Anzahl von Membranproteintransportern entsteht oder durch ein verändertes Ein-/Rückfluss-Verhältnis. Bei Diminazen ist die Resistenzbildung ebenfalls nicht klar. Hier werden ebenfalls eine verminderte Akkumulation des Medikaments in der Zelle und veränderte Nucleosidtransporter diskutiert (CARTER et al., 1995).

Auf genetischer Ebene diskutiert man drei verschiedene Wege, die zur Resistenzbildung führen (HAYES und WOLF, 1990). Genveränderungen (Mutationen), Genvervielfachungen (Amplifikationen) und Genaustausch (Transfer). Leishmanien haben die Fähigkeit zur Genamplifikation, wenn sie abtötenden Medikamenten ausgesetzt werden. Dieses Phänomen konnte auch bei Trypanosomen nachgewiesen werden. Es konnte aber noch nicht geklärt werden, ob dieser Mechanismus für die Resistenzbildung in Trypanosomen verantwortlich ist (ROSS und SUTHERLAND, 1997).

## **2.5 Untersuchungsmethoden zur Medikamentenempfindlichkeit**

Zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit sind eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden (PEREGRINE, 1994; KAMINSKY und BRUN, 1993). Viele von ihnen sind vielversprechend, befinden sich jedoch noch in der Erprobungsphase oder sind in der Routine noch nicht anwendbar und müssen validiert werden. Die derzeit am häufigsten verwendeten Tests sind nach wie vor *in-vivo*-Studien an Wiederkäuern und Labornagern,

sowie einige *in-vitro*-Tests. Nachfolgend wird eine Auswahl der verschiedenen Methoden beschrieben.

## 2.5.1 In-vivo-Tests

### 2.5.1.1 Tests in Wiederkäuern

Für Tests in Wiederkäuern werden meist Rinder, Schafe oder Ziege verwendet. Dazu müssen die Tiere in fliegensichere Ställe oder in eine tsetsefliegenfreie Region gebracht werden, um die Gefahr einer Reinfektion während des Versuchs auszuschließen. Die Tiere werden mit Trypanosomenpopulationen infiziert und über einen bestimmten Zeitraum beobachtet. Tiere, die parasitärmisch werden, werden zunächst mit der für Wiederkäuer üblichen Dosierung behandelt. Im Fall, dass diese Behandlung nicht erfolgreich verläuft und Resistenzen vermutet werden, versucht man durch Dosiserhöhungen die sogenannte Effektive Dosis (ED: Dosis, bei der keine Trypanosomen in der Blutzirkulation mehr nachweisbar sind) und die Kurative Dosis (CD: Dosis, die infizierte Tiere dauerhaft heilt), zu bestimmen.

Im Rahmen eines EU-Projektes (INCO) zur „Bekämpfung von pathogenen Trypanosomen und ihren Vektoren“ („Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors, ICPTV) wurde im Juni 1999 in einem Workshop in Nairobi, Kenia, ein standardisiertes Protokoll für Tests zur Medikamentenempfindlichkeit in Kälbern und Mäusen entwickelt. Der Test für Rinder wurde bereits in Kenia, Tansania und Sambia bei Untersuchungen zur Epidemiologie der Trypanozidresistenz angewendet (GEERTS et al., 1999). Das Protokoll sieht vor, dass zwischen drei bis sechs Tiere pro Versuch eingesetzt werden. Bevorzugt werden drei bis sechs Monate alte Kälber (möglichst von den lokal vorhandenen Rinderrassen), ohne vorherigen Kontakt mit Trypanosomen, die etwa einen Monat vor geplanten Versuchsbeginn in fliegensichere Ställe verbracht werden. Sie werden gegen Helminthen, Trypanosomen (3,5 mg/kg Diminazen) und bakterielle Infektionen behandelt. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wird zweimal wöchentlich der Hämatokrit bestimmt. Zu Versuchsbeginn wird in jedes Tier die zu testende Trypanosomenpopulation (via Jugularvene) injiziert. Anschließend wird mindestens zweimal wöchentlich bei jedem Tier der Hämatokrit bestimmt und das Blut mittels „Buffy Coat-Technik“ (siehe 3.4.4.3) auf Trypanosomen untersucht. Mit der ersten Parasitenwelle werden die Kälber gewogen und intramuskulär mit entweder 0,5 mg/kg Isometamidium oder 3,5 mg/kg Diminazen behandelt. Dabei sollte das in der Region vorwiegend genutzte Trypanozid gewählt werden. Wenn in einem Überwachungszeitraum von 100 Tagen nach Behandlung die Tiere nicht mehr

parasitämisch werden, gilt die Trypanosomenpopulation als sensitiv gegenüber der gewählten Therapie und Dosierung. Werden während der Beobachtungszeit Erreger parasitologisch nachgewiesen („Relapse“) erfolgt bei Gewichtskontrolle eine Behandlung mit dem jeweils anderen Medikament in der angegebenen Dosis („Sanative Pair“). Eine Diminazenbehandlung sollte dabei nicht früher als 30 Tage nach einer Isometamidiumtherapie erfolgen. Lassen sich nach Ablauf weiterer 100 Untersuchungstage keine Trypanosomen im Blut feststellen, so gilt die Population als sensitiv gegenüber der letzten Behandlung. Wird eine Parasitämie sichtbar, so erfolgt noch am selben Tag eine Therapie mit Homidium (1,0 mg/kg). Zwischen einer Diminazen- und einer Homidiumbehandlung sollten ebenfalls mindestens 30 Tage liegen. Die Trypanosomenpopulation ist homidiumsensitiv, wenn nach 100 Tagen keine Parasitämie mehr nachweisbar ist.

Ein Vorteil dieses Tests ist, dass sich die meisten im Feld aus Rindern gewonnenen Trypanosomenpopulationen in den Versuchstieren vermehren und dass die gewonnenen Ergebnisse direkt auf Feldbedingungen übertragbar sind, die Resistenz also tatsächlich messbar ist. Von entscheidendem Nachteil sind jedoch die hohen Kosten (Anschaffung der Tiere und deren Versorgung über mehrere Monate) und die lange Versuchsdauer (bis zu sechs Monate sind nötig, um brauchbare Daten zu erhalten) (GEERTS und HOLMES, 1998). Eine Untersuchung einer größeren Anzahl von Trypanosomenpopulationen ist praktisch durch den enormen Arbeits- und finanziellen Aufwand nicht möglich.

#### 2.5.1.2 Tests in Labornagern

Um die Kosten und auch logistischen Probleme, die im Wiederkäuerversuch auftreten, einzugrenzen, werden vielerorts Labornager zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit verwendet. Die hier anfallenden Versuchskosten sind deutlich geringer und die Versuchszeit verkürzt sich auf meist maximal zwei Monate. Problematisch allerdings ist, dass bestimmte Trypanosomenarten (*T. b. gambiense*, *T. vivax*, *T. simiae* und einige *T. congolense*-Populationen) nicht infektiös für Mäuse oder Ratten sind (DUKES et al., 1991). Zusätzlich zeigen die verschiedenen Labornager unterschiedliche Empfänglichkeiten für Trypanosomen. So wurden *T. b. gambiense* im Tierversuch primär in saugenden Ratten untersucht, da sie in NMRI-Mäusen nur sehr geringe Parasitämien entwickelten (Nachweis mittels HCT oder im Nativpräparat, siehe 3.4.4.1 und 3.4.4.2). MEHLITZ (1978) stellte fest, dass *Mastomys (M.) natalensis* eine signifikant höhere Empfänglichkeit für *T. b. gambiense* hat als NMRI-Mäuse und konnte so den „Blood Incubation Infectivity Test“ (BIIT) (siehe 2.5.2.6) weiterentwickeln.

Bei der Überprüfung der Medikamentenempfindlichkeit in Labormäusen wird die „Minimale Effektive Dosis“ bzw. „Kurative Dosis“ bestimmt. HAWKING (1963) untersuchte verschiedene *T. congolense*-Populationen in Mäusen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber diversen Trypanoziden. Die Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegen das jeweilige getestete Trypanozid wurde gemessen als „Minimale Effektive Dosis“ („Minimal Effective Dose“ oder „ED<sub>80</sub>“) oder als „Minimale Kurative Dosis“ („Minimal Curative Dose“ oder „CD<sub>80</sub>“). Die ED<sub>80</sub> ist die Dosis, bei der spätestens vier Tage nach Applikation bei 80% der Versuchstiere keine Trypanosomen mehr nachweisbar sind. Die CD<sub>80</sub> ist die Dosis, bei der die Versuchstiere nach Behandlung über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen negativ bleiben (erfolgte Heilung). Es ist zwar möglich, dass nach Ablauf dieser Zeit noch Trypanosomen im Blut erscheinen, doch ist die Zahl dieser Fälle statistisch unbedeutend. Die untersuchten *T. congolense*-Populationen stammten aus Ostafrika oder Nigeria und zeigten ED<sub>80</sub>-Werte zwischen 2,5-25 mg/kg und CD<sub>80</sub>-Werte von 25–50 mg/kg für Diminazen. Die Maustestergebnisse waren größtenteils mit den Ergebnissen bei Rindern vergleichbar. AUTHIE (1984) untersuchte verschiedene *T. congolense*-Populationen aus Burkina Faso im Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Isometamidium und Diminazen und berechnete ED<sub>75</sub>-Werte zwischen 0,5–4 mg/kg Isometamidium und 5–20 mg/kg Diminazen. Der Trypanosomenstamm SA53, der auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, zeigte einen ED<sub>75</sub>-Wert von 2 mg/kg für Isometamidium und  $\geq 5$  mg/kg für Diminazen und einen CD<sub>75</sub> -Wert von 20 mg/kg Diminazen. Zum Zeitpunkt der Isolierung wurden Rinder in der Provinz Kénédougou mit 1 mg/kg Isometamidium und 7 mg/kg Diminazen behandelt. Bei anderen Autoren waren Ergebnisse aus dem Mäuseversuch nicht auf die kurative Dosis für Rinder im Feld übertragbar (SONES et al., 1988; AINANSHE et al., 1992). Untersuchungen von KONE (1999) zeigten, dass in Mäusen isometamidiumsensitive *T. congolense*-Populationen (CD<sub>80</sub>=1 mg/kg Isometamidium) im Rind nach Behandlung mit 0,5 mg/kg Isometamidium nicht therapiert werden konnten.

Das 1999 in Kenia im Workshop „Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors, ICPTV“ vorgeschlagene Protokoll für den Test in Mäusen gilt für die Testung einer größeren Anzahl von Trypanosomenpopulationen und nutzt lediglich eine einzige Dosierung des jeweiligen Trypanozids („Single Dose Mouse Test“). Das Protokoll wurde erstellt in Anlehnung an das bereits für den Test in Rindern erwähnte EU-Projekt. Pro Versuchsansatz werden zwei Gruppen (eine Behandlungs- und eine Positivkontrollgruppe) zu je sechs Mäusen gleichen Geschlechts, Alters und Gewichts zusammengestellt. Die Mäuse werden mit  $10^5$  Trypanosomen intraperitoneal infiziert. Eine Therapie erfolgt 24 Stunden später mit entweder 1 mg/kg Isometamidium oder 20 mg/kg Diminazen. Die Mäuse der

Positivkontrollgruppe erhalten eine Injektion mit isotonischer NaCl-Lösung (ohne Medikament). Anschließend werden für 60 Tage zweimal wöchentlich einige Tropfen Schwanzblut der Mäuse im Nativpräparat mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Der Test ist dann auswertbar, wenn fünf von sechs unbehandelten Mäusen aus der Positivkontrollgruppe im Verlauf der Untersuchungen parasitologisch positiv werden und aus der Behandlungsgruppe mindestens fünf Mäuse überleben (entweder bis sie parasitämisch werden oder bis zum Ablauf des Untersuchungszeitraumes von 60 Tagen). Sind nach Ablauf von 60 Tagen mindestens fünf Mäuse aus der Behandlungsgruppe geheilt (parasitologisch negativ), ist der untersuchte Trypanosomenstamm sensitiv gegenüber der getesteten Dosierung. Um die Medikamentenempfindlichkeit einer einzelnen Trypanosomenpopulation genauer zu bestimmen, werden mindestens fünf Behandlungsgruppen pro Versuchsansatz benötigt („Multi Dose Test“). Die Dosierungen für Isometamidium sollten im Bereich zwischen 0.01 bis 20 mg/kg und für Diminazen im Bereich zwischen 1 bis 60 mg/kg liegen. Die Klassifizierung in sensitiv oder resistent verläuft wie im Ein-Dosis-Test („Single Mouse Test“) (EISLER et al., 2001).  $CD_{50}$ ,  $CD_{80}$  oder  $CD_{95}$ -Werte können mit Hilfe der Standard Logit oder Probit Analyse berechnet werden (PEREGRINE et al., 1991).

### 2.5.2 In-vitro-Tests

In den siebziger Jahren begann man intensiv daran zu arbeiten, Trypanosomen *in-vitro* zu kultivieren. Zunächst versuchte man die verschiedenen Arten zu vermehren, um später ihren kompletten Lebenszyklus *in-vitro* nachzuahmen. *T. b. brucei* war der erste aus der Trypanosomengruppe, der sich *in-vitro* vermehren ließ (HIRUMI et al., 1977). Die ersten *T. congolense*-Kulturen entstanden aus in Nährmedien gehaltenen infizierten Tsetsefliegenorganen (Proboscis) (GRAY et al., 1981). Durch den Einsatz ausgesuchter Medien (BALTZ et al., 1985) und Zellkulturen (KAMINSKY et al., 1987) wurde die Dauerkultivierung kontinuierlich verbessert. Es konnten auch schwer an Kulturen zu adaptierende Trypanosomenarten wie *T. congolense in-vitro* gehalten werden (HIRUMI und HIRUMI, 1984). Schließlich war man in der Lage, alle wichtigen Stadien wie prozyklische, epimastigote, metazyklische und Trypanosomenblutstromformen zu erzeugen (BOID et al., 1996). Basierend auf diesen Fortschritten wurden Tests entwickelt, mit Hilfe derer die Medikamentenempfindlichkeit von Trypanosomenpopulation bestimmt werden konnte. Für *T. congolense* sind diese Verfahren erst nach Adaptation an die Kultur möglich, was bisher nur gelingt, wenn der gesamte Entwicklungszyklus in der Tsetsefliege *in-vitro* nachgeahmt wird (GRAY und PEREGRINE, 1993).

KAMINSKY (1993) unterschied zwischen Methoden, bei denen die Trypanosomen an die *in-vitro*-Kultivierung angepasst sein mussten und solchen, bei denen keine Adaptation erforderlich war. An die *in-vitro*-Kultivierung adaptierte Trypanosomen werden benötigt für den "Photometric Assay", den "Fluorescence Assay", den "Growth Inhibition Assay", den "Long-term Viability Assay" und den "Metacyclic Incubation Test for *T. congolense*". Diese Testsysteme messen die Trypanosomenvermehrung bzw. die Wachstumshemmung als Kriterium zur Beurteilung der Chemosensitivität. Nicht an Zellkultur angepasste Trypanosomen benötigt man für den „Blood Incubation Infectivity Test“ (BIIT), den „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT), den „Drug Incubation Glossina Infectivity Test“ (DIGIT) und den "[3H] Hypoxanthine Incorporation Assay". In diesen Verfahren werden die Trypanosomen dem Medikament nur einen kurzen Zeitraum ausgesetzt.

#### 2.5.2.1 Photometrischer Test (ZINSTAG et al., 1991)

Für den photometrischen Test („Photometric Assay“) werden etablierte Trypanosomenkulturen benötigt. Der Test misst Farbumschläge des Mediums, die im Rahmen des Glucosestoffwechsels der Trypanosomen entstehen. Bei ihrer Vermehrung setzen die Trypanosomen Pyruvat frei, welches den pH-Wert des Mediums senkt und durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Trypanozidempfindliche Trypanosomenkulturen werden im Wachstum gehemmt, geben dementsprechend weniger (oder gar kein) Pyruvat ab, wodurch die Farbe des Kulturmediums sich nur wenig bis gar nicht ändert. Diese Änderung kann mittels eines Photometers ("ELISA-reader“) gemessen oder semi-quantitativ visuell ausgewertet werden. Der Test wurde von KAMINSKY und WASIKE (1992) speziell für *T. congolense* weiterentwickelt, unter Ausnutzung der Eigenschaft, dass *T. congolense* sich an den Boden von Kulturschalen anheftet. Nach einer Inkubationszeit (72 h) in verschiedenen Trypanozidkonzentrationen werden die angehefteten Trypanosomen mit Sulforhodamin B angefärbt. Die Löcher der Multischale, in denen sich die Trypanosomen ungehindert weiter vermehren konnten, werden am stärksten von dem Farbstoff gefärbt. Man misst die Absorption bei 540 nm, welche direkt proportional zur Trypanosomenanzahl ansteigt.

#### 2.5.2.2 Fluoreszenztest (OBEXER et al., 1995)

Der Fluoreszenztest ("Fluorescence Assay“) arbeitet mit Hilfe des Esterasesubstrates Bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein-acetoxymethyl-Ester, kurz BCECF-AM und dient als Marker für die Überlebensfähigkeit von Zellen. In Zellen wird BCECF-AM (nicht fluoreszierend) in das Cytoplasma als Esterderivat aufgenommen und anschließend durch die dort

vorhandenen membrangebundenen, nicht spezifischen Esterasen gespalten. Das Hydrolyseprodukt ist nur schwer membrangängig und zeigt eine starke Fluoreszenz. Diese Eigenschaften wurde für einen *in-vitro*-Versuch zur Bestimmung der Wirkung von Trypanoziden auf Trypanosomen zunutze gemacht. Nach Inkubation (Zeitdauer 72 h) der Trypanosomen in den verschiedenen Medikamentenverdünnungen zusammen mit dem Substrat wird die Fluoreszenz gemessen und die Werte der Kontrollgruppe (=lebensfähige Trypanosomen = größte Fluoreszenz) mit denen aus den verschiedenen Verdünnungen (geschädigte Zellen = verminderte Fluoreszenz) verglichen.

#### 2.5.2.3 Wachstumshemmtest (KAMINSKY und ZWEYGARTH, 1989)

In einem Wachstumshemmtest ("Growth Inhibition Assay") werden Trypanosomen in verschiedenen Medikamentenverdünnungsstufen in Gewebekulturplatten für 24-48 h inkubiert und anschließend ausgezählt. Die durch die verschiedenen Trypanozidkonzentrationen im Wachstum gehemmten Trypanosomen werden jeweils mit den Kontrollgruppen (=ungehemmtes Wachstum) verglichen. Man benutzt dazu entweder einen Zellenzähler ("Coulter Counter"), um einen  $EC_{50}$ -Wert („Effektive Konzentration“, bei der 50% der Trypanosomenpopulation im Wachstum gehemmt wurden) zu bestimmen oder man zählt die Trypanosomen mit Hilfe eines Hämocytometers (Zählkammer) aus und ermittelt die MEC („Minimal Effective Concentration“) nach 24 Stunden (ZHANG et al. 1992). Der Vorteil dieses Tests liegt darin, dass er schnell und ohne teure Ausrüstung anwendbar ist. Von Nachteil ist jedoch, dass für bestimmte Medikamente die Inkubationszeit von 24 h zu kurz zu sein scheint.

#### 2.5.2.4 Langzeittest (KAMINSKY et al., 1989)

Der Langzeittest ("Long-term Viability Assay") untersucht die Überlebensfähigkeit von Trypanosomen. Etablierte Trypanosomenkulturen werden in den jeweiligen Medikamentenverdünnungen in einer Lochplatte mit Zellrasen über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen beobachtet. Dabei wird täglich das Wachstum bzw. die Überlebensfähigkeit der Trypanosomen mikroskopisch kontrolliert und Medium (MEM mit Serumanteil) mit der entsprechenden Medikamentenkonzentration so ausgetauscht, dass die Vermehrung der Trypanosomen kontinuierlich in der Wachstumsphase bleibt. Für die Lebensfähigkeit werden Morphologie, Motilität und Vermehrung der in den Medikamentenverdünnungen inkubierten Trypanosomen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen beurteilt. Eingeführt wurde die Methodik für *T. b. brucei* und später für

*T. vivax* angewendet (ZWEYGARTH et al. 1991). 1993 ließ sich auch *T. congolense* mit diesem Verfahren testen (KAMINSKY et al., 1993).

PELLMANN (1999) testete 16 *T. b. brucei*-Stämme aus Uganda im Langzeitversuch auf ihre Diminazempfindlichkeit und beschrieb in ihrer Arbeit, dass alle untersuchten Trypanosomenstämme nach Diminazinkubation in ihrem Wachstumsverhalten zwischen den diminazensensitiven und -resistenten Referenzstämmen lagen. Nach 10 Tagen Inkubation in 1 µg/ml Diminaz wies auch der resistente Referenzklon CP 547 kein Wachstum mehr auf. Die MIC-Werte (Minimale Hemmstoffkonzentration: die geringste Konzentration, bei der die Trypanosomen keine normale Morphologie und Bewegung nach Ablauf von 10 Tagen mehr zeigen) der sensitiven Referenzstämmen und der empfindlichen Trypanosomenpopulationen lagen zwischen  $\leq 0,003$  µg/ml und 0,05 µg/ml.

SCHEER (2001) untersuchte 16 *T. b. brucei*-Stämme aus Uganda im Langzeittest, auf ihre Isometamidiumempfindlichkeit. Die resistenten Referenzstämmen zeigten erst ab 1 ng/ml (CP 547) bzw. 10 ng/ml (CP 2469) eine deutliche Beeinträchtigung ihres Wachstums während die sensitiven Referenzklone ILTat 1.4 und 345 RA schon bei 0,1 ng/ml keine Vermehrung mehr aufwiesen. Die Isometamidiumempfindlichkeiten der Trypanosomenstämme lagen zwischen den sensitiven und resistenten Referenzklonen, wobei fünf Trypanosomenpopulationen als hoch empfindlich, 15 als intermediär und eine Population als reduziert empfindlich kategorisiert wurden.

Voraussetzung für diese Form des Langzeittests sind etablierte Trypanosomenkulturen. PELLMANN (1999) und SCHEER (2001) beobachteten beide, dass für die *T. b. brucei*-Referenzklone keine oder nur wenige Tage Adaptation an die Zellkultur nötig waren, und auch die Trypanosomenstämme meist innerhalb von vier bis zehn Tagen an die *in-vitro*-Kultivierung gewöhnt werden konnten. Die Trypanosomen blieben zu jedem Zeitpunkt infektiös für Mäuse, was bewies, dass es sich um Trypanosomenblutstromformen handelte. Für *T. congolense* ist der Langzeittest nur bedingt geeignet. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass eine längere *in-vitro*-Kultivierung von *T. congolense*-Stämmen zum Verlust ihrer Infektiosität für *M. coucha* führte. Bisher ist es nicht möglich, direkt aus dem Wirt gewonnene *T. congolense*-Stämme erfolgreich als Blutstromformen *in-vitro* zu kultivieren (GRAY und PEREGRINE, 1993). Eine längere Kultivierung ist nur durchführbar, wenn der Entwicklungszyklus (von prozyklisch bis metazyklisch) der *T. congolense*-Populationen *in-vitro* durchlaufen wurde. Die Gewinnung von *in-vitro* erzeugter metazyklischer Trypanosomen variiert je nach Stamm und kann bis zu 12 Wochen dauern (GRAY und PEREGRINE, 1993). Für *in-vitro*-Tests müssen Trypanosomenblutstromformen verwendet werden, da die *in-vitro*-Ergebnisse zur

Medikamentenempfindlichkeit nur bei Blutstromformen mit den *in-vivo*-Ergebnissen korrelieren, während die Trypanozidempfindlichkeit bei prozyklischen Trypanosomen variieren und nicht ohne weiteres auf das Verhalten *in-vivo* übertragen werden können (BRUN und RAB, 1991).

Der LILIT ("Low Inoculation Long Incubation Test") ist eine andere Form des "Long-term Viability Tests". Hier werden sehr geringe Zahlen von an Zellkultur adaptierte Trypanosomen ( $10^3$  in 100µl) in einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen Medikamentenverdünnungen in einem deutlich kürzeren Zeitraum (4 Tage) inkubiert, ohne in dieser Zeit einen Mediumwechsel durchzuführen (BRUN und LUN, 1994). Auch hier wird mikroskopisch die MIC („Minimum Inhibitory Concentration“) festgestellt.

#### 2.5.2.5 Test für metazyklische *T. congolense*-Formen (GRAY und PEREGRINE, 1993)

Im Inkubationstests für metazyklische *T. congolense*-Formen ("Metacyclic Incubation Test for *T. congolense*") werden *in-vitro*-erzeugte metazyklische Trypanosomen in einem zellfreien System für 48h in verschiedenen Medikamentenverdünnungen inkubiert. Anschließend transferiert man die Trypanosomen in eine Mikrotiterplatte, die Endothelzellen enthält. Nach etwa zwei Stunden haben sich die Trypanosomen an die Zellen angeheftet, und die Medikamentenkonzentrationen werden durch frisches Medium (ohne Medikament) ersetzt. Am fünften Tag wird die Platte untersucht und die MIC bestimmt.

Wie bereits in 2.5.2.4 angesprochen, ist die Entwicklung von *in-vitro*-hergestellten Trypanosomen an diesem Test problematisch. Bis Mitte der achtziger Jahre war es lediglich gelungen, verschiedene Insektenformen von *T. congolense in-vitro* zu kultivieren. Ein *in-vitro*-System, das das kontinuierliche Wachstum von Blutstromformen unterstützt, wurde von HIRUMI und HIRUMI (1984) vorgestellt. Sie setzten bovine Endothelzellen ein und konnten eine *T. congolense*-Population (ILRAD K45) aus Ostafrika von der Maus direkt in die Kultur bringen und bis zum Abbruch des Experiments für 93 Tage kultivieren. Dennoch bereitet die direkte Kultivierung von *T. congolense*-Populationen immer noch Schwierigkeiten und ist als routinemäßig einsetzbares Verfahren noch nicht etabliert (CLAUSEN et al., 2000).

#### 2.5.2.6 „Blood Incubation Infectivity Test“ (BIIT) (RICKMAN und ROBSON, 1970)

Der "Blood Incubation Infectivity Test" (BIIT) beruht auf der Basis, dass Humanserum eine trypanozide Wirkung auf *T. b. brucei* hat, im Gegensatz zu den humanserumresistenten *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*. Da sich die Erreger der *T. brucei*-Gruppe morphologisch nicht unterscheiden lassen, ist der BIIT ein viel genutzter Test, um bei frisch

isolierten *T. brucei*-Populationen aus Wild- bzw. Haustieren die für den Menschen infektiösen *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* von den nicht infektiösen *T. b. brucei* zu differenzieren. Der Test besteht aus einer *in-vitro*-Phase, in der die Trypanosomen mit dem Humanserum inkubiert werden und einer *in-vivo*-Phase, in der nach Ablauf der Inkubationszeit die Trypanosomen in saugende Ratten oder NMRI-Mäuse inokuliert werden. Diese Labornager sind für *T. b. gambiense*-Populationen meist nur sehr schwach empfänglich. MEHLITZ (1978) entwickelte diesen Test weiter und setzte *M. natalensis* ein, die sich für das *T. b. gambiense*-Modell besser eignen.

#### 2.5.2.7 „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) (KAMINSKY et al., 1990)

Der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) ist eine Kombination aus einem *in-vitro*- und *in-vivo*-Testsystem. Man untersucht die Infektiosität der Parasiten nach Inkubation in einem Trypanozid. Dazu werden Trypanosomenblutstromformen aus parasitärischen Mäusen gewonnen und in ein verschiedene Medikamentenkonzentrationen enthaltenes Medium gebracht. Nach einer bestimmten Inkubationszeit inokuliert man die Trypanosomen in Mäuse. Anschließend werden die Mäuse über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen kontrolliert und das Auftreten von Parasitämien in Abhängigkeit von der Medikamentenkonzentration festgestellt.

Der Test wurde für *T. b. brucei*, *T. b. evansi* und *T. vivax* (KAMINSKY et al., 1990) und für *T. congolense* (SUTHERLAND et al., 1991) beschrieben. KAMINSKY et al. (1990) benutzten ein nach BALTZ modifiziertes Iscove's Medium mit fötalen Rinderserumanteil und inkubierten für 24 Stunden. Isometamidium wurde in den Konzentrationen 0 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 50 ng/ml und Diminazen in den Konzentrationen 0 – 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,5 – 1 µg/ml getestet. Der sensitive *T. b. brucei*-Klon ILTat 1.4 verlor seine Infektiosität nach Inkubation in 1 ng/ml Isometamidium, während der resistente Referenzklon CP 547 nach Inkubation in 50 ng/ml Isometamidium seine Infektiosität behielt. Nach Inkubation in 1 µg/ml Diminazen blieb der Klon CP 547 voll infektiös, während der diminazensensitive ILTat 1.4 nach Inkubation in 0,05 µg/ml keine Mäuse mehr infizierte. SUTHERLAND et al. (1991) modifizierten das Verfahren und beschrieben 1991 einen Isometamidiuminkubationstest für *T. congolense*. Der Test wurde mit verkürzten Inkubationszeiten von 10 Minuten und höheren Konzentration von 0 – 0,5 – 5 – 500 ng/ml durchgeführt. Als Medium wurde Phosphatsalz-Glucose-Lösung (PSG) mit einem Rinderserumanteil verwendet. Nach erfolgter Inokulation wurden die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen bis sieben Tage nach dem Auftreten von Trypanosomen in der Kontrollgruppe untersucht. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden nach Ablauf von 10 Tagen parasitärisch. Der bekannt sensitive Stamm GRVPS 61 konnte nach Inkubation in

den genannten Konzentrationen keine Mäuse mehr infizieren. Der bekannt hochresistente GRVPS 56 dagegen war auch nach 500 ng/ml Inkubation in Isometamidium noch infektiös.

#### 2.5.2.8 „Drug Incubation Glossina Infectivity Test“ (DIGIT) (CLAUSEN et al., 1999)

Eine andere Variante eines Inkubationsinfektionstests ist der „Drug Incubation Glossina Infectivity Test (DIGIT)“. Der bekannt sensitive *T. congolense*-Klon IL 1180 und ein bekannt resistenter *T. congolense*-Stamm aus Burkina Faso (MBOI/BK/89/SA267) wurden in verschiedenen Isometamidium- und Diminazenkonzentrationen inkubiert. Zur Initiierung des Tests wurden Blutproben von Spenderziegen genommen, die eine Parasitämie von mindestens  $1 \times 10^4$  Trypanosomen pro Milliliter Blut zeigten. 250 µl Trypanozidverdünnung wurde zu 25 ml Vollblut gegeben und für 10 bzw. 30 Minuten inkubiert. Kontrollgruppen erhielten destilliertes Wasser. Anschließend wurden tenerale (48h alte) Glossinen der Art *G. morsitans submorsitans* mit dem Blut via Membran gefüttert. Jede Medikamentengruppe und Kontrollgruppe bestand aus 50 Fliegen, die für weitere 20 Tage gehalten wurden (tägliche Fütterungen mit nicht infiziertem Blut vom Schwein). Nach Ablauf der Zeit wurden die Fliegen sezirt und Labrum, Hypopharynx und Mitteldarm jeder Fliege auf Trypanosomen untersucht. Die Kontrollgruppen von IL 1180 infizierten zwischen 13,6 – 42,2% der Fliegen. Eine Inkubation in 0,5 µg/ml Isometamidium und 0,5 µg/ml Diminazen war ausreichend, um Infektionen der Tsetsefliegen mit IL 1180 zu verhindern. Der bekannt resistente Trypanosomenstamm MBOI/BK/89/SA267 dagegen war nach Inkubation (10 min) in 10 µg/ml Isometamidium und nach Inkubation in 100 µg/ml (30 min) bzw. 10 µg/ml (12 h) Diminazen immer noch infektiös für Tsetsefliegen. Eine Unterscheidung zwischen sensitiven und resistenten Trypanosomenpopulationen war mit dem DIGIT möglich. Von Vorteil bei diesem Test ist, dass mit Ausnahme von Tsetsefliegen nur wenige Versuchstiere benötigt und Ergebnisse in kürzeren Zeiten erzielt werden.

#### 2.5.2.9 [3H] Hypoxanthin-Test (BUN und KUNZ, 1989)

Der “[3H] Hypoxanthin-Test (“[3H] Hypoxanthine Incorporation Assay”) arbeitet mit Hypoxanthin, einem Baustein in der Nukleinsäuresynthese der Trypanosomen. Er wurde angewendet für *T. b. brucei* (BUN und KUNZ, 1989), *T. b. gambiense* (BRUN et al., 1989), *T. congolense* (ROSS und TAYLOR, 1990; BRUN und RAB, 1991) und *T. b. evansi* (BRUN und LUN, 1994).

Die Trypanosomen werden für 24h in verschiedenen Medium-Medikamenten-Verdünnungen inkubiert. Das normalerweise dem Medium zugesetzte Hypoxanthin fehlt. Anschließend gibt man mit Tritium radioaktiv markiertes Hypoxanthin hinzu, inkubiert weitere 16h und misst

nach Ernten der Trypanosomen auf einen Glasfilter, in wie weit der normalerweise stattfindende Hypoxanthineinbau durch die Anwesenheit des Medikamentes gehemmt wurde. Die Ergebnisse werden als ED<sub>50</sub>-Werte dargestellt (Effektive Dosis, die verglichen mit den Kontrollgruppen, den Einbau zu 50% hemmt).

PELLMANN (1999) untersuchte mit Hilfe dieses Testverfahrens die Diminazempfindlichkeit von 20 *T. b. brucei*-Stämme aus Uganda. Der sensitive *T. b. brucei*-Referenzklon STIB 354 zeigte ED<sub>50</sub>-Werte zwischen 0,01–0,06 µg/ml, der resistente Referenzklon CP 547 zeigte Werte zwischen 3,92–6,46 µg/ml. Die ED<sub>50</sub>-Werte der getesteten Trypanosomenpopulationen lagen im Bereich zwischen den ED<sub>50</sub>-Werten der beiden Referenzen. Acht Trypanosomenstämme zeigten vergleichbare Werte zum sensitiven STIB 354 und vier Trypanosomenstämme bewegten sich im resistenten Referenzbereich. Acht *T. b. brucei*-Populationen konnten nicht klassifiziert werden, da ihre ED<sub>50</sub>-Werte zwischen sensitivem und resistentem Referenzbereich lagen. PELLMANN (1999) vermutete, dass diese Trypanosomenpopulationen aus Mischpopulationen mit unterschiedlicher Diminazempfindlichkeit bestanden.

SCHEER (2001) untersuchte mit dem Hypoxanthin-Test die Isometamidiumempfindlichkeit der oben erwähnten *T. b. brucei*-Stämme aus Uganda und verglich die Ergebnisse mit den Referenzstämmen. Für den sensitiven Referenzklon 345 RA wurden ED<sub>50</sub>-Werte zwischen 0,006–0,011 µg/ml gefunden. Der andere, als isometamidiumempfindlich beschriebene Referenzklon ILTat 1.4 lag im Bereich der bekannt resistenten Referenzklone (ILTat 1.4: 0,57–0,83 µg/ml; CP 547 0,385–0,565 µg/ml). Die gefundenen Werte zeigten keinen eindeutigen Unterschied zwischen den bekannt isometamidiumsensitiven und –resistenten *T. b. brucei*-Referenzen und ermöglichten daher keine Klassifizierung der untersuchten *T. b. brucei*-Stämme. SCHEER (2001) vermutete, dass die Testdauer für Isometamidium als „slow-acting-drug“ zu kurz war, und Isometamidium in dieser Zeit seine volle trypanozide Wirkung nicht entfalten konnte. Eine Verlängerung der Inkubationszeit war jedoch nicht möglich, da die *T. b. brucei*-Populationen axenisch die längere Versuchsdauer nicht überlebten.

### 2.5.3 Andere Tests

#### 2.5.3.1 „Isometamidium-Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ISMM-ELISA) (EISLER et al., 1993)

Mit Hilfe dieses Enzym-Immuntests werden die Serumkonzentrationen von Isometamidium bei behandelten Rindern gemessen. EISLER et al. (1993) stellten fest, dass es für Isometamidium einen Zusammenhang zwischen der prophylaktischen Wirkung und der Höhe der Serumkonzentration in Rindern gibt. Unter normalen Feldbedingungen bietet eine einmalige Dosis von 1 mg/kg Isometamidium einen Schutz gegen eine Trypanosomeninfektion von 2–3 Monaten (KIRKBY, 1964; TRAIL et al., 1985). In einem Versuch wurden Rinder mit 1 mg/kg Isometamidium behandelt und anschließend monatlich von infizierten Tsetsefliegen gestochen. Die Tsetsefliegen waren jeweils Träger zweier sehr resistenter *T. congolense*-Populationen (IL 3889 und IL 3893, der von Klon IL 3330 abstammt) und eines sensitiven *T. congolense*-Klons (IL 1180). Rinder, die den resistenten *T. congolense*-Stämmen ausgesetzt waren, waren bereits im ersten Infektionsversuch einen Monat nach der Isometamidiumbehandlung parasitologisch positiv. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mittlere Serumkonzentration von Isometamidium in den infizierten Rindern rund 6 ng/ml. Nach Ablauf von drei Monaten lag die Isometamidiumserumkonzentration bei 0,75 ng/ml. Ein Infektionsversuch mit dem bekannt sensitiven *T. congolense* IL 1180 gelang erst nach sechs Monaten (EISLER et al., 1994). EISLER et al. (1994) schlossen daraus, dass *T. congolense*-Populationen, die Isometamidiumserumkonzentrationen von mehr als 6 ng/ml überstehen, als hoch resistent, bei Konzentrationen von mehr als 0,75 ng/ml als moderat resistent und bei Konzentrationen unter 0,75 ng/kg als sensitiv gelten können. In Kombination mit parasitologischen Untersuchungen ist der Isometamidium-ELISA eine geeignete Methode, um in Rinderherden Isometamidiumresistenzen festzustellen (ICPTV, 2000).

## 2.6 Untersuchungsmethoden in dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden die Isometamidium- und Diminazenenempfindlichkeiten verschiedener *T. congolense*-Stämme aus Burkina Faso mit Hilfe zweier Testsysteme untersucht. Ziel war es, den Standard-Maustest (SMT) und der „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT) für *T. congolense* zu etablieren und zu validieren. Dazu standen vier *T. congolense*-Klone mit bekannter Isometamidium- und Diminazenenempfindlichkeit als Referenzen zur Verfügung.