

## 5 DISKUSSION

Ziel dieser Untersuchungen war es, zwei Testsysteme, den Standard-Maustest (SMT) und den „Drug Incubation Infectivity Test“ (DIIT), für *T. congolense* zu etablieren und mit ihrer Hilfe eine Auswahl von *T. congolense*-Stämmen hinsichtlich ihrer Medikamentenempfindlichkeit zu überprüfen. Vier *T. congolense*-Klone mit bekannter Isometamidium- und Diminazenempfindlichkeit (*in-vivo*, teilweise auch *in-vitro*) standen als Referenz für die Einteilung der *T. congolense*-Stämme in „sensitiv“ bzw. „resistent“ zur Verfügung. Die verschiedenen *T. congolense*-Populationen stammten aus der Provinz Kéné Dougou in Burkina Faso, die in früheren Forschungsprojekten isoliert wurden (PINDER und AUTHIE, 1984, CLAUSEN et al., 1992, MCDERMOTT et al., 2000).

### 5.1 Medikamentenempfindlichkeit der untersuchten *T. congolense*-Referenzklone

#### 5.1.1 Empfindlichkeit der *T. congolense*-Referenzklone im SMT

Es standen vier *T. congolense*-Klone zur Verfügung, über die aus der Literatur Angaben über die Medikamentenempfindlichkeit bereits bekannt waren. Die Klone IL 1180 und IL 2642 sind als sensitiv gegenüber Isometamidium im Rind beschrieben. Die veröffentlichten  $CD_{50}$ -Werte für Isometamidium in Mäusen wurden angegeben für IL 1180 mit 0,018 mg/kg (PEREGRINE et al., 1991) und für IL 2642 mit 0,007 mg/kg (WILKES et al., 1997) (siehe Tab. 8). Mit dem Klon IL 1180 infizierte Rinder wurden nach einer Behandlung von 1 µg/kg (0,001 mg/kg) Isometamidium geheilt. Die entsprechende Dosis in Mäusen liegt bei 0,5 mg/kg (SONES et al., 1988). Eine Infektion von Mäusen mit IL 2642 lässt sich ebenfalls mit 0,5 mg/kg Isometamidium behandeln (PEREGRINE et al., 1988). Im Gegensatz dazu werden die beiden *T. congolense*-Klone IL 3000 und IL 3338 als isometamidiumresistent beschrieben. Die  $CD_{50}$ -Werte für Isometamidium in Mäusen liegen bei 2,9 mg/kg für IL 3000 und 20,0 mg/kg für IL 3338 (WILKES et al., 1997). Der Klon IL 3338 stammt aus der ersten Passage von IL 3330, einer Population, die im Juli 1989 aus Rindern in Ghibe, Äthiopien isoliert wurde (DIAK et al., 1997) und in Rindern resistent gegenüber Isometamidium (0,5 mg/kg) war (CODJIA et al., 1993).

In dem in dieser Arbeit vorgestellten Standard-Maustest für Isometamidium konnte für die beiden sensitiven Klone IL 1180 und IL 2642 nach einer Behandlung mit 1 mg/kg Isometamidium jeweils ein 100%iger Therapieerfolg (für IL 2642 bereits bei 0,25 mg/kg Isometamidium) erreicht werden. Die dagegen als isometamidiumresistent beschriebenen Klone IL 3000 und IL 3338 waren im SMT bei 1 mg/kg Isometamidium resistent (0% Behandlungserfolg). Für IL 3000 wurde ein  $CD_{80}$ -Wert von 5,0 mg/kg Isometamidium und für IL 3338 von 20,0 mg/kg Isometamidium ermittelt. Die hier im SMT ermittelten Isometamidium-sensitivitäten sind mit den aus der Literatur bekannten Werten vergleichbar.

Die in der Literatur beschriebenen Diminazenenempfindlichkeiten charakterisieren den Klon IL 1180 als diminazensensitiv (PEREGRINE et al., 1991) und Klon IL 3338 als diminazenresistent (CODJIA et al., 1993). In den Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit beiden Klonen vergleichbare Ergebnisse erzielt. Der Klon IL 1180 war im SMT diminazensensitiv mit einem  $CD_{80}$ -Wert von 7 mg/kg, welcher dem in Publikationen veröffentlichten  $CD_{50}$ -Wert von 2,3 mg/kg ähnelt. Der im Rind bekannt diminazen-resistente IL 3338 zeigte auch im Standard-Maustest in dieser Arbeit eine deutliche Diminazenresistenz. Bei 7 mg/kg konnte keine der *Mastomys* geheilt werden und mit der maximalen Dosis von 35 mg/kg wurde ein Behandlungserfolg von nur 60% erreicht.

Für die *T. congolense*-Klone IL 2642 und IL 3000 werden keine *in-vivo*-Angaben hinsichtlich ihrer Diminazenenempfindlichkeit in Rindern und/oder Mäusen gemacht. In dieser Arbeit war der Klon IL 3000 im SMT nach einer Therapie mit 14 mg/kg Diminazen sensitiv (100% Behandlungserfolg); nach einer 7 mg/kg Diminazenbehandlung konnten immerhin 40% der infizierten *Mastomys* geheilt werden. Diese Diminazensensitivität war vergleichbar mit der von Klon IL 1180. Der Klon IL 2642 zeigte im Standard-Maustest ein sehr unterschiedliches Verhalten. In den Stufen 14 und 21 mg/kg Diminazen wurden Behandlungserfolge zwischen 60 und 80% erreicht, erst ab 35 mg/kg konnten 80% der *Mastomys* geheilt werden. Die Sensitivitätsgrenze lies sich hier nicht eindeutig festlegen und umfasste die Stufen 14, 21 und 35 mg/kg Diminazen.

Zusammenfassend betrachtet ergaben die Untersuchungen im SMT, dass zwei der vier *T. congolense*-Klone als isometamidiumsensitiv (IL 1180 und IL 2642) und zwei (IL 3000 und IL 3338) als isometamidiumresistent beurteilt wurden. Im Bezug auf die Diminazenenempfindlichkeit waren zwei Klone (IL 1180 und IL 3000) diminazensensitiv und ein Klon (IL 3338) diminazenresistent. Der vierte untersuchte Klon (IL 2642) zeigte eine uneinheitliche Diminazenenempfindlichkeit und konnte in den getesteten Diminazenenkonzentrationen nicht eindeutig klassifiziert werden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen der *T. congolense*-Stämme im SMT wurden die Sensitivitätsgrenzen von 1 mg/kg Isometamidium und 14 mg/kg Diminazen als Maßstab zur Beurteilung der Trypanozidempfindlichkeit festgelegt.

#### 5.1.2 Empfindlichkeit der *T. congolense*-Referenzklone im DIIT

KAMINSKY et al. (1990) untersuchten im „Drug Incubation Infectivity Test“ die Infektiosität verschiedener *T. b. brucei*-, *T. b. evansi*- und *T. vivax*-Populationen nach Inkubation in Isometamidium bzw. Diminazen und konnten Unterschiede zwischen den bekannt sensiblen und resistenten Trypanosomenstämmen feststellen. Die ermittelten Sensitivitätsgrenzen lagen bei 1 ng/ml Isometamidium und 0,05 µg/ml Diminazen. SUTHERLAND et al. (1991) beschrieben einen ähnlichen Test für *T. congolense* und Isometamidium und gebrauchten verkürzte Inkubationszeiten zusammen mit höheren Isometamidiumkonzentrationen (bis 500 ng/ml). Die Sensitivitätsgrenze für Isometamidium lag in diesem Verfahren bei 5 ng/ml Isometamidium).

In dieser Arbeit wurde der DIIT in Anlehnung an SUTHERLAND et al. (1991) durchgeführt und die erhöhten Trypanozidkonzentrationen zusammen mit der verkürzten Inkubationszeit von 10 Minuten verwendet. Isometamidium wurde in den Konzentrationen bis zu 500 ng/ml und Diminazen bis zu 10 µg/ml getestet. Vergleicht man die im DIIT erzielten Ergebnisse mit denen aus der Literatur, so wurden auch in diesen Untersuchungen Unterschiede zwischen den sensiblen und resistenten *T. congolense*-Referenzen im Bezug auf ihre Infektiosität sichtbar. Die Konzentrationen, in denen sich die sensiblen von den resistenten *T. congolense*-Referenzen unterschieden ließen, waren 50 ng/ml für Isometamidium (80% bzw. 100% Behandlungserfolg für IL 1180 bzw. IL 2642, 0% Behandlungserfolg für IL 3000 und IL 3338) und 5 µg/ml für Diminazen (100% Behandlungserfolg für IL 1180, 40% Behandlungserfolg für IL 3338; IL 2642 und IL 3000 mindestens 80% Behandlungserfolg). Damit lag im Fall von Iso-metamidium die Sensitivitätsgrenze 50fach höher im Vergleich zu KAMINSKY et al. (1990) (50 ng/ml vs. 1 ng/ml), und 10fach höher im Vergleich zu SUTHERLAND et al. (1991) (50 ng/ml vs. 5 ng/ml). Die ermittelte Sensitivitätsgrenze für Diminazen war 100fach höher im Vergleich zu KAMINSKY et al. (1990) (5 µg/ml vs. 0,05 µg/ml). Da KAMINSKY et al. (1990) den DIIT mit Trypanosomen der *T. brucei*-Gruppe durchführten, ist ein direkter Vergleich zu dieser Arbeit schwierig: Die verschiedenen Trypanosomenarten könnten aber eine Erklärung für die Unterschiede in den Sensitivitätsgrenzen sein. SUTHERLAND et al. (1991) führten den Test ebenfalls mit *T. congolense* durch. Die Sensitivitätsgrenzen sind hier vergleichbar und ihre Ergebnisse ähneln sich (Unterschied zu dieser Arbeit 1:10). Es scheint sich das

Vorgehen von SUTHERLAND et al. (1991) zu bestätigen, dass im Zusammenhang mit verkürzten Inkubationszeiten höhere Konzentrationsstufen verwendet werden müssen.

Problematisch zeigte sich der Test mit Diminazen bei *T. congolense* IL 2642. Es wurden unterschiedliche Behandlungserfolge innerhalb der gleichen Konzentrationsstufe erzielt. Nach Inkubation in 1 µg/ml Diminazen konnten in mehreren Versuchsdurchläufen jeweils 40% (resistent) und 80% (sensitiv) Behandlungserfolg erreicht werden (siehe Tab. 25). In der nächst höheren Konzentrationsstufe von 5 µg/ml Diminazen war IL 2642 allerdings eindeutig sensitiv (100% Behandlungserfolg). Damit kann für den Klon IL 2642 ähnlich wie im SMT die Sensitivitätsgrenze für Diminazen nicht eindeutig festgelegt werden. Sie ist in jedem Fall, wie auch bei IL 1180, nach Inkubation in 5 µg/ml Diminazen erreicht.

Anhand der mit den Referenzklonen gewonnenen Ergebnisse wurden für die nachfolgenden Untersuchungen der *T. congolense*-Populationen aus den Primärisolaten im DIIT 50 ng/ml Isometamidium und 5 µg/ml Diminazen als Sensitivitätsgrenzen zur Unterscheidung sensibler und resistenter Trypanosomenpopulationen festgelegt.

### 5.1.3 Vergleich SMT – DIIT

Innerhalb der verschiedenen *in-vivo*-Versuche ist der Standard-Maustest (SMT) im Vergleich zum Wiederkäuerversuch die einfachere und preiswertere Methode, Trypanosomenpopulationen hinsichtlich ihrer Trypanozidempfindlichkeit zu testen. Problematisch hierbei ist, dass sich Trypanosomenpezies wie *T. vivax* und einige *T. congolense*-Populationen nicht in Labornagern vermehren. Darüber hinaus sind die erzielten Ergebnisse nicht immer ohne weiteres auf Feldergebnisse aus Rindern übertragbar (HAWKING, 1963; SONES et al., 1988; KONE, 1999). Bis heute sind die genauen Wirkungsweisen von Isometamidium und Diminazen nicht geklärt. Man vermutet, dass die Wirksamkeit der Trypanozide von der Pharmakokinetik (Trypanozidverteilung, Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit) des jeweiligen Wirtstieres beeinflusst wird (KAMINSKY et al., 1990).

KAMINSKY et al. (1990) untersuchten im DIIT, ob die Infektiosität von Trypanosomenpopulationen nach Inkubation in verschiedenen Trypanozidkonzentrationen im direkten Zusammenhang mit ihrer Medikamentenempfindlichkeit steht und wollten mit diesem Verfahren einen zusätzlichen Test zur Untersuchung von Trypanozidresistenzen einführen. Durch den *in-vitro*-Teil des DIITs werden die zu testenden Trypanosomenpopulationen konstant einer bestimmten Medikamentenkonzentration ausgesetzt, was die obengenannten Nachteile (Beeinflussung der Ergebnisse durch die Pharmakokinetik) des SMT vermeidet. Der sich anschließende *in-vivo*-Teil führt allerdings dazu, dass die Durchführung des DIITs

wieder auf für Labornager infektiöse Trypanosomenpopulationen beschränkt bleibt. Beim Vergleich der Ergebnisse aus dem DIIT mit denen aus dem SMT zeigen KAMINSKY et al. (1990) und SUTHERLAND et al. (1991) eine Korrelation zwischen Infektiosität und Trypanozidempfindlichkeit. Sensitive Trypanosomenklone verlieren bereits in niedrigen Trypanozidkonzentrationen ihre Infektiosität, während resistente Klone in höheren Konzentrationen noch infektiös für Mäuse bleiben.

Auch bei den SMT- und DIIT-Ergebnissen dieser Arbeit wird der Zusammenhang sichtbar. Die Sensitivitätsgrenzen im SMT lagen für Isometamidium bei 1 mg/kg Isometamidium und 14 mg/kg Diminazen. Im DIIT konnten die Referenzklone bei 50 ng/ml Isometamidium und bei 5 µg/ml Diminazen unterschieden werden. So war der im SMT bei 1 mg/kg isometamidiumsensitive IL 1180 auch im DIIT nach Inkubation in 50 ng/ml Isometamidium sensitiv. Im SMT für Diminazen war IL 1180 bereits bei 7 mg/kg sensitiv und verlor im DIIT nach Inkubation in 5 µg/ml Diminazen seine Infektiosität. Im Vergleich dazu war IL 3338 isometamidium- und diminazenresistent im SMT und zeigte im DIIT eine erhaltene Infektionsfähigkeit noch nach Inkubation in 500 ng/ml Isometamidium und 10 µg/ml Diminazen. Die anderen Referenzen mit bekannter Isometamidiumempfindlichkeit konnten ebenfalls mit Hilfe des DIITs unterschieden werden. IL 3000 war im SMT bei 1 mg/kg Isometamidium resistent und blieb auch im DIIT nach Inkubation in 50 ng/ml Isometamidium infektiös. Im SMT war IL 3000 bei 14 mg/kg Diminazen sensitiv und zeigte dieses Verhalten ebenso im DIIT (80% Behandlungserfolg nach Inkubation in 5 µg/ml).

Der isometamidiumsensitive Klon IL 2642 war im SMT schon bei 0,25 mg/kg Isometamidium (kleinste Konzentrationsstufe im SMT) sensitiv und zeigte diese Eigenschaft auch im DIIT: nach Inkubation in 0,5 ng/ml Isometamidium (kleinste Konzentrationsstufe im DIIT) verlor der Klon bereits seine Infektiosität. Problematisch zeigte sich der Test mit Diminazen. Wie schon im SMT wurden auch im DIIT innerhalb der gleichen Konzentrationsstufe unterschiedliche Behandlungserfolge erzielt (zwischen 40-80% Behandlungserfolg nach Inkubation in 1 µg/ml Diminazen). Die heterogene Diminazenempfindlichkeit scheint eine spezifische Eigenschaft des Klons IL 2642 zu sein, die sich sowohl im SMT als auch im DIIT ausdrückt.

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie der SMT auch der DIIT ein geeigneter Test ist, um sensitive von resistenten *T. congolense*-Klonen zu unterscheiden. Die Ergebnisse waren übertragbar, d. h. dass im SMT sensitive *T. congolense*-Klone auch im DIIT sensitiv waren, während resistente *T. congolense*-Klone sich sowohl im SMT als auch im DIIT resistent zeigten. Diese Eigenschaft konnte für beide verwendeten Trypanozide, Isometamidium und Diminazen, bestätigt werden. Die heterogene Diminazenempfindlichkeit von IL 2642 war sowohl im SMT als auch im DIIT nachweisbar,

was die Vermutung nahe legt, dass es sich hier nicht um eine testspezifische Wechselwirkung mit Diminazen, sondern vielmehr um eine charakteristische Eigenschaft des Klons handelt.

## 5.2 Medikamentenempfindlichkeit der *T. congolense*-Stämme aus Samorogouan

Verschiedene *T. congolense*-Populationen, die 1982 (SA 53), 1989 (SA 267 und SA 268) und 1998 (SA 95) aus Rindern in Samorogouan (Provinz Kénédougou, Burkina Faso) isoliert worden waren, wurden im Standard-Maustest und DIIT untersucht. Ziel war es zu überprüfen, ob die Feldergebnisse in Rindern mit den Resultaten in Labornagern vergleichbar sind. Außerdem sollte erforscht werden, ob eine Entwicklung der Chemoresistenz in dieser speziellen Region über einen Zeitraum von 16 Jahren aufzuzeigen ist. Im Rahmen aller untersuchten *T. congolense*-Populationen aus Primärisolaten waren die Trypanosomenstämme aus Samorogouan Teil der Untersuchungen zur Validierung von SMT und DIIT.

PINDER und AUTHIE (1984) beschrieben hohe *T. congolense*-Prävalenzen in Zebu-Rindern in der Region um Samorogouan. Isometamidiumbehandlungen mit 1 mg/kg konnten die Trypanosomenprävalenzen in Rindern nicht verringern. Der Stamm SA 53 wurde von PINDER und AUTHIE (1984) in Mäusen untersucht und zeigte sich resistent bei 1 mg/kg Isometamidium. In dieser Arbeit war SA 53 im SMT bei 1 mg/kg Isometamidium ebenfalls resistent. Die von PINDER und AUTHIE (1984) gefundene „Minimale Effektive Dosis“ (MED) von 4 mg/kg Isometamidium ist vergleichbar mit den SMT-Resultaten dieser Arbeit, in denen SA 53 in höheren Konzentrationen ab 5 mg/kg Isometamidium sensitiv war. Im SMT für Diminazen zeigte SA 53 ein sehr heterogenes Verhalten, ähnlich wie schon zuvor der Referenzklon IL 2642. In mehreren Versuchsdurchläufen (siehe Tab. 19) wurden in den Konzentrationsstufen 21 und 35 mg/kg Diminazen Behandlungserfolge zwischen 20% (resistent) und 80% (sensitiv) erzielt. Eine eindeutige Klassifizierung in „diminazensensitiv“ oder „diminazenresistent“ konnte innerhalb dieser Konzentrationsstufen nicht gemacht werden. Auffällig war, dass in niedrigeren Dosierungen höhere Behandlungserfolge erreicht wurden. Die Empfindlichkeit der Trypanosomenpopulation stand nicht mit den gewählten Konzentrationsstufen in einem direktem Zusammenhang. Gegenüber einer 7 mg/kg Diminazenbehandlung war SA 53 allerdings resistent. Auch im DIIT zeigte sich der Stamm SA 53 resistent gegen Isometamidium in allen getesteten Konzentrationen, wobei in den Stufen 50 und 500 ng/ml immerhin Behandlungserfolge von 40% erreicht wurden. Im Bezug

auf Diminazen dagegen reagierte die Population sensitiv. Bei 5 µg/ml war die Infektiosität völlig aufgehoben. Bereits bei 1 µg/ml wurden Behandlungserfolge zwischen 40% (resistent) und 100% (sensitiv) erreicht. Zusammenfassend betrachtet ist die Trypanosomenpopulation SA 53 sowohl im Rind als auch in Mäusen bei 1 mg/kg Isometamidium resistent. In höheren Isometamidiumdosierungen reagiert die Population aber noch empfindlich. Im Bezug auf Diminazen zeigt sich SA 53 sehr heterogen. Die Population befindet sich in den getesteten Konzentrationen zwischen einer Diminazen-empfindlichkeit und einer –Resistenz. Die Ergebnisse aus SMT und DIIT spiegeln die von PINDER und AUTHIE (1984) dargestellte Situation von 1982 in der Provinz Kéné Dougou wieder, die als weit verbreitete Isometamidiumresistenz in der Region, aber noch unklarer Diminazenempfindlichkeit beschrieben wird.

Die beiden von CLAUSEN et al. (1992) isolierten Trypanosomenpopulationen aus Samorogouan SA 267 und SA 268, die in Rindern und Ziegen resistent waren, zeigten dies auch bei den Ergebnissen von SMT und DIIT. Behandlungen im SMT mit Isometamidium (bis 20 mg/kg) und auch mit Diminazen (bis 35 mg/kg) konnten keine der *Mastomys* der jeweiligen Behandlungsgruppe heilen. Im DIIT blieb nach Inkubation in Isometamidium und Diminazen die Infektiosität von SA 267 und SA 268 nahezu unverändert. Die von CLAUSEN et al. (1992) berichtete Resistenz aus Untersuchungen in Rindern und Ziegen konnte in den Untersuchungen im SMT und DIIT in *M. coucha* unter Laborbedingungen bestätigt werden.

1990 wurde von BAUER et al. (1995) in Samorogouan eine Tsetsefliegen-Bekämpfung begonnen, die nach 11 Monaten zu einer deutlichen Abnahme der Tsetsefliegendichte und damit zur Senkung des Infektionsdrucks führte. 1998 wurden in Samorogouan im Rahmen des Forschungsprojektes „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project), wie beschrieben, erneut Untersuchungen von Rinderherden durchgeführt („Erfolgs-Monitoring“). In einer Herde von 100 untersuchten Rindern wurden parasitologisch nur zwei trypanosomenpositive Tiere gefunden, aus denen ein *T. congolense*-Stamm, SA 95, in *M. coucha* vermehrt und in dieser Arbeit im SMT und DIIT getestet werden konnte. SA 95 war sowohl im SMT als auch im DIIT resistent gegenüber Isometamidium und Diminazen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tsetsefliegenbekämpfung Anfang der 1990er Jahre im Rahmen integrierter Bekämpfungsmaßnahmen zwar die Trypanosomenprävalenz deutlich gesenkt hat, dass die Trypanozidresistenz aber immer noch in der Region zu finden ist.

Zusammenfassend betrachtet waren, mit Ausnahme von SA 53 (fragliche Diminazenempfindlichkeit im SMT und sensitive Diminazenempfindlichkeit im DIIT), alle in Samorogouan über einen Zeitraum von 1982 bis 1998 isolierten Trypanosomenpopulationen sowohl

in Rindern als auch im SMT und DIIT resistent gegenüber Isometamidium und Diminazen. Für Samorogouan bedeutet dies, dass auch 10 Jahre nach Einsatz der Vektorenbekämpfung immer noch resistente Trypanosomenpopulationen in Rindern dieser Region vorhanden sind. Bisher wurde angenommen, dass in dem Moment, in dem keine Trypanozide mehr innerhalb einer bestimmten Region eingesetzt werden müssen, innerhalb einer Trypanosomenpopulation trypanozidresistente Trypanosomen von trypanozidsensitiven Trypanosomen verdrängt werden (Theorie von der „biologischen Fitness“, COLEMAN und MCDERMOTT, 2000). Diese Vermutung konnte für Samorogouan nicht bestätigt werden. Die Resistenz gegen Isometamidium und Diminazen hat den Trypanozideinsatz und die Vektorkontrolle über 10 Jahre überlebt. Sollte es in Samorogouan, auf Grund nachlassender Anstrengungen in der Vektorkontrolle zu einer Reinvansion der Tsetsefliege kommen, dann ist damit zu rechnen, dass durch die Ausbreitung von trypanozidresistenten Trypanosomenpopulationen die Trypanosomenprävalenzen in den Rindern schnell wieder ansteigen werden, mit erheblichen wirtschaftlichen Folgen auf Grund des vorhandenen Therapienotstandes. Am Beispiel Samorogouan wird deutlich, wie wirksam und wichtig eine Kombination der verschiedenen Bekämpfungsmöglichkeiten ist („Integrated Disease Management“). Es wird empfohlen, in Regionen mit Medikamentenresistenzen den Einsatz von Trypanoziden zu reduzieren und die Tsetsefliegenbekämpfung zu verstärken. Wo immer möglich sollten auch fliegensichere Ställe und trypanotolerante Rinderrassen eingesetzt werden (ICPTV, 2000). Es wird allerdings auch klar, dass die Entwicklung neuer wirksamer Trypanozide auf lange Sicht ein sehr wichtiges und unverzichtbares Mittel zur Bekämpfung resistenter Trypanosomen ist.

### **5.3 Medikamentenempfindlichkeit der *T. congolense*-Stämme aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)**

Alle nachfolgend beschriebenen *T. congolense*-Populationen stammen aus Primärisolaten, die in der Querschnittsstudie und der Blockbehandlungsstudie in der Provinz Kéné Dougou (Burkina Faso) im Rahmen des internationalen Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project) hergestellt wurden.

Die Ermittlung ihrer Medikamentenempfindlichkeit im SMT und DIIT waren Teil der Validierung von SMT und DIIT mit *T. congolense*-Stämmen verschiedener Herkunft.

Außerdem sollten die gefundenen Ergebnisse Anhaltspunkte über das Vorkommen bzw. Ausmaß von Trypanozidresistenzen in den untersuchten Dörfern des Projektgebiets Kéné Dougou geben.

### 5.3.1 Empfindlichkeit der *T. congolense*-Stämme aus der Querschnittsstudie

Aus der Querschnittsstudie wurden vier *T. congolense*-Populationen im SMT und DIIT untersucht. Ihre Anzahl ist nicht repräsentativ und die Auswahl erfolgte aus Gründen der Zeitersparnis und zur Verringerung des Arbeitsaufwandes willkürlich aus einer Anzahl von mausadaptierten Trypanosomenpopulationen. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Vermehrung in *Mastomys* war so wesentlich höher. Die Untersuchungen zeigten, dass alle vier Trypanosomenpopulationen sowohl im SMT als auch im DIIT isometamidium- und diminazenresistent waren. Im SMT waren sie bei 1 mg/kg Isometamidium resistent und blieben es auch in der höheren Dosierung von 10 mg/kg Isometamidium (20-40 % Behandlungserfolg). Eine Behandlung mit 14 bzw. 21 mg/kg Diminazen führte nur in 20-60% der Fälle zur erfolgreichen Heilung. Nach Inkubation in Isometamidium bzw. Diminazen war die Infektiosität aller *T. congolense*-Populationen bei 50 ng/ml Isometamidium bzw. 10 µg/ml Diminazen nahezu vollständig erhalten.

### 5.3.2 Empfindlichkeit der *T. congolense*-Stämme aus der Blockbehandlungsstudie

Aus der Blockbehandlungsstudie wurden insgesamt acht *T. congolense*-Populationen im SMT und im DIIT untersucht. Fünf von ihnen stammten aus „Primärisolaten aus nicht erfolgreich therapierten Rindern“, drei stammten aus „Primärisolaten aus erfolgreich therapierten Rindern“. Sie wurden in Orten mit hohen Trypanosomenprävalenzen hergestellt (Kotoura 27,5%, Toussian-Bandougou 26,3%, M'Bie 16%, Dieri 12,5%, Samoghohiri 11,4%), in denen *T. congolense*-Infektionen dominierten (WOITAG, 1998). Dieri, Kotoura und Toussian-Bandougou waren außerdem Orte mit sehr hohen Isometamidiumfehlerraten (60%, 50%, 33%) (siehe 3.1.4).

Jeder *T. congolense*-Stamm wurde im SMT und DIIT auf seine Isometamidiumempfindlichkeit getestet. Alle acht *T. congolense*-Populationen konnten im SMT und im DIIT eindeutig klassifiziert werden. Sie waren sowohl im DIIT (erhaltene Infektiosität nach Inkubation in 50 ng/ml Isometamidium) als auch im SMT resistent. Nach einer Behandlung mit 10 mg/kg Isometamidium waren, mit Ausnahme eines Stammes (TBU 2054), die untersuchten *T. congolense*-Populationen ebenfalls resistent (Behandlungserfolge zwischen

0-60%). Die *T. congolense*-Stämme aus Primärisolaten aus Rindern ohne Behandlungserfolg waren im SMT bzw. DIIT isometamidiumresistent, d.h. die aus Rindern und Mäusen gewonnenen Ergebnisse waren miteinander vergleichbar. Auffällig ist, dass die *T. congolense*-Stämme, die aus Primärisolaten aus erfolgreich therapierten Rindern gewonnen wurden, im SMT ebenfalls isometamidiumresistent reagierten. Hier lassen die Ergebnisse aus Untersuchungen in Mäusen keine Rückschlüsse auf die Medikamentenempfindlichkeit in Rindern zu. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte bei den verwendeten Nachweismethoden für Trypanosomeninfektionen liegen. Bei Rindern sind die Parasitämien oft sehr gering, so dass die BCT-Methode, die bei Querschnitts- und Blockbehandlungsstudie zum Nachweis von Trypanosomeninfektionen im Feld eingesetzt wurde, möglicherweise in den Nachuntersuchungen bei den Rindern „mit Therapieerfolg“ nicht empfindlich genug war. So schienen diese Rinder zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchungen da aparasitämisch, nicht infiziert zu sein, was als Therapieerfolg nach der Isometamidiumblockbehandlung angesehen wurde. Tatsächlich aber blieb die Infektion parasitologisch unentdeckt.

Die Ergebnisse aus weiterführenden Untersuchungen mit der Polymerasekettenreaktion (PCR), einem sehr empfindlichen und spezifischen Test zum Nachweis von Trypanosomen (CLAUSEN et al., 1998, 1999), scheinen diese Aussage zu bestätigen. GALL et al. (2001) untersuchten in der PCR Blutproben von den gleichen Rindern, aus denen die Isolate dieser Arbeit stammten. Es wurden Proben aus Rindern mit positivem BCT-Ergebnis am Tag der Blockbehandlung überprüft, die erwartungsgemäß durch positive PCR-Ergebnisse bestätigt wurden. Weiterhin wurden Blutproben von vier Rindern „ohne Therapieerfolg“ (14 Tage nach Isometamidiumbehandlung) untersucht (Ursprungswirte der *T. congolense*-Populationen DRI 13, TBU 2054, TBU 2114, KRA 2343), die ebenfalls positive PCR-Ergebnisse ergaben. In einer dritten Untersuchungsreihe wurden mit der PCR Blutproben aus drei Rindern „mit Therapieerfolg“ (14 Tage nach der Isometamidiumbehandlung) überprüft (Ursprungswirte der *T. congolense*-Populationen MBI 2050, TBU 2130, SRI 2179), die in zwei Fällen (MBI 2050, SRI 2179) PCR-Produkte präsentierten. Damit konnte die PCR in zwei von drei Rindern Trypanosomeninfektionen nachweisen, die mittels BCT-Methode nicht entdeckt worden waren.

Die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Trypanosomenpopulationen, die aus erfolgreich therapierten Rindern isoliert wurden und die sich im SMT bzw. DIIT als resistent herausstellten, ist nicht repräsentativ. Trotzdem wird deutlich, dass zur Überprüfung der Resistenzsituation in einem bestimmten Gebiet neben den Behandlungsversuchen im Feld, weiterführende Tests benötigt werden, die schnell, zuverlässig und aussagekräftig die

Trypanozidempfindlichkeit isolierter Trypanosomenpopulationen bestimmen können und die geeignet sind, die Entwicklung der Resistenzsituation in einem bestimmten Gebiet über einen bestimmten Zeitraum zu überwachen („Verlaufs-Monitoring“).

#### **5.4 Vergleich der beschriebenen Methoden zur Bestimmung resistenter *T. congolense*-Stämme**

##### 5.4.1 Isometamidium-Blockbehandlungsstudie des Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-funded Special Project)

Im Rahmen des internationalen Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project, 1998-1999) wurde eine Isometamidium-blockbehandlungsstudie zur direkten Bestimmung von Resistenzen gegen Trypanozide im Feld durchgeführt. Dazu wurde eine statistisch repräsentative Anzahl von Rindern ausgesucht. Alle ausgewählten Rinder (726 Tiere) wurden mit 1 mg/kg Isometamidium behandelt und anschließend im 14tägigen Abstand erneut parasitologisch untersucht. Die Tiere, die in den Nachuntersuchungen trypanosomenpositiv waren, wurden mit 3,5 mg/kg Diminazen nachbehandelt. Die Blockbehandlung war eine effektive Methode, um Trypanozidresistenzen im Feld, in Rindern, zu entdecken. Sie lieferte direkte aussagekräftige epidemiologische Ergebnisse aus der untersuchten Region, mit dem Vorteil, dass im Anschluss Bekämpfungsmaßnahmen direkt in den betroffenen Herden bzw. am Einzeltier durchgeführt werden konnten. Aufwendig waren die Planung und Durchführung der Blockbehandlungsstudie (arbeits-, zeit- und kostenintensiv) und die Erhebung und Auswertung der ermittelten Daten. Logistische (Passierbarkeit der Strassen in der Regenzeit) und politische (Mitarbeit von Tierherdenbesitzern und der lokalen Veterinärbehörden) Einflüsse mussten berücksichtigt, hierbei entstehende Datenverluste eingeplant werden (BMZ SPECIAL PROJECT, ANNUAL REPORT 1998, ANNUAL AND FINAL REPORT 1998-1999).

##### 5.4.2 Tests in Wiederkäuern

Der Vorteil des Wiederkäuerversuchs liegt darin, dass sich die aus Rindern gewonnenen Trypanosomenstämme problemlos vermehren lassen und direkt hinsichtlich ihrer Medikamentenempfindlichkeit untersucht werden können. Die erzielten Ergebnisse aus dem Rinder- und Ziegenversuch können unmittelbar auf die Feldsituation übertragen werden. Von

Nachteil ist der erhebliche Arbeits- und finanzielle Aufwand. Die Tiere müssen angeschafft, in fliegensichere Ställe verbracht und versorgt werden. Die Untersuchungen können zwangsläufig nur auf eine geringe Anzahl von Trypanosomenstämmen beschränkt bleiben.

CLAUSEN et al. (1992) testeten *T. congolense*-Populationen in Rindern und Ziegen in fliegensicheren Ställen. Die Behandlungen mit 1 mg/kg Isometamidium und 7 mg/kg Diminazen waren nicht erfolgreich. Die vom Hersteller vorgeschlagenen therapeutische Dosen wurden in einem weiteren Versuch gezielt erhöht (14 mg/kg Diminazen bei Rindern; 17,5 mg/kg Diminazen und 2 mg/kg Isometamidium bei Ziegen), die trotzdem zu keinem Therapieerfolg führten.

#### 5.4.3 In-vitro-Tests

Im Vergleich zu den *in-vivo*-Untersuchungen können mit *in-vitro*-Tests in kurzer Zeit eine wesentlich größere Anzahl von Trypanosomenstämmen hinsichtlich der Medikamentenempfindlichkeit untersucht werden. Für *T. congolense* allerdings sind die *in-vitro*-Tests wegen der beschriebenen Problematik der *in-vitro*-Kultivierung (siehe 2.5.2) wenig geeignet. Bisher ist es nicht möglich, *T. congolense*-Blutstromformen aus dem Wirt direkt in die Kultur zu bringen und zu vermehren. Die Adaptation gelingt nur über die Erzeugung von prozyklischen Formen und kann nach Angaben von GRAY und PEREGRINE bis zu 12 Wochen dauern (GRAY und PEREGRINE, 1993). CLAUSEN et al. (2000) untersuchten zehn *T. congolense*-Populationen *in-vitro* und konnten lediglich einen Stamm (SA 268, isoliert 1989) erfolgreich transformieren. Es scheint, dass die Adaptationsphase für *T. congolense* an die *in-vitro*-Kultur bisher zu aufwendig und langwierig ist, um routinemäßig diese Trypanosomenspezies *in-vitro* zu testen.

#### 5.4.4 Labornager (*Mastomys*)

Unter Laborbedingungen ist man bislang noch auf die Verwendung von Labornagern angewiesen. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Trypanozidempfindlichkeit wurden *Mastomys* aus der institutseigenen Zucht verwendet. Der Einsatz von Labornagern konnte viele Nachteile des Wiederkäuerversuchs vermeiden. Beispielsweise waren die Kosten und der Arbeitsaufwand im Bezug auf Anschaffung, Versorgung und Unterbringung deutlich niedriger.

Ein Nachteil jedoch ist die Tatsache, dass viele *T. congolense*-Populationen sich nicht in Mäusen vermehren. Die bereits Maus-adaptierten *T. congolense*-Populationen aus der

Querschnittsstudie konnten problemlos in *Mastomys* vermehrt werden, aber nur ein Drittel der inokulierten Primärisolate aus der Blockbehandlungsstudie bildeten eine Infektion in *Mastomys* aus.

Da jede Vermehrung eines Primärisolats in Labornagern oder in der *in-vitro*-Kultur (Passage) die in dem Isolat vorhandenen Trypanosomenpopulation verändert, wurden als Ausgangsmaterial für SMT und DIIT nur 2.-4. Passagen der *T. congolense*-Populationen verwendet. Ziel war es, eine möglichst wenig veränderte (heterogene) Trypanosomenpopulation eines Primärisolats zu untersuchen, um so die ermittelten Medikamentenempfindlichkeiten in Rindern und in Mäusen besser miteinander vergleichen zu können.

Für die Durchführung des SMT mussten zunächst die Dosierungen für die einzelnen Behandlungsgruppen bestimmt werden. Aus der Literatur konnten einige Angaben zu den Isometamidiumempfindlichkeiten verschiedener *T. congolense*-Stämme entnommen werden; über ihre Diminazenempfindlichkeiten war aber nur wenig veröffentlicht. Ein standardisiertes Protokoll zur Durchführung von Maustesten gab es zu Beginn dieser Untersuchungen nicht. Angaben wie  $CD_{50^-}$ ,  $ED_{50^-}$ ,  $CD_{80^-}$ , MEM- und  $ED_{75^-}$ -Werte und verschiedene institutsabhängige Bezeichnungen für gleiche Trypanosomenpopulationen bzw. –klone erschwerten die Literaturrecherche und den Vergleich der gefundenen Trypanozidempfindlichkeiten. EISLER et al. (2001) stellten im Rahmen des ICTPV-Workshops in Kenia eine Anleitung zur Durchführung eines Ein-Dosis-Tests („Single Dose Test“) für Rinder und Mäuse vor, die zur schnellen Untersuchung einer großen Anzahl von Trypanosomenstämmen konzipiert ist und eine mögliche Trypanozidresistenz (ja/nein-Ergebnis), aber nicht ihr Ausmaß feststellt. Die vorgeschlagenen Trypanozidkonzentrationen, die im Ein-Dosis-Test verwendet werden sollen, sind 1 mg/kg Isometamidium und 20 mg/kg Diminazen für die Untersuchungen in Mäusen, und 0,5 mg/kg Isometamidium und 3,5 mg/kg Diminazen für die Untersuchungen in Rindern.

Für den in dieser Arbeit beschriebenen SMT wurden Höchstdosierungen bis 20 mg/kg für Isometamidium und 35 mg/kg für Diminazen gewählt. Höhere Dosierungen sollten routinemäßig wegen möglicher Nebenwirkungen (z.B. Gefahr der Peritonitisbildung nach i.p.-Gabe) nicht verwendet werden. Diese Konzentrationen waren ausreichend, um die bekannt sensitiven von den bekannt resistenten *T. congolense*-Referenzen zu unterscheiden. Die Ausnahme bildete Klon IL 2642 mit unbekannter Diminazenempfindlichkeit, der im SMT für Diminazen ein uneinheitliches Verhalten zeigte und sich nicht in das Dosierungsschema mit den ermittelten Sensitivitätsgrenzen einfügen ließ. Dieses Verhalten zeigte wesentlich ausgeprägter auch der *T. congolense*-Stamm SA 53. Eine Erklärung wäre, dass diese Trypanosomenpopulation so heterogen ist, dass je nach Variante, die in der Population dominiert, eine bestimmte Trypanozidsensitivität ausgebildet wird, die innerhalb der

Versuchswiederholungen deutlich wird. Für den Klon IL 2642, von dem ausgegangen wird, dass er eine homogene Population ausbildet, kann dies allerdings keine Begründung sein.

Der SMT wurde in Anlehnung nach SONES et al. (1988) entwickelt und bewertete die untersuchten Trypanosomenpopulationen anhand der  $CD_{80}$ , der „Kurativen Dosis“, nach deren Anwendung vier von fünf *Mastomys* (80%) über den Zeitraum von 30 Tagen geheilt werden. Bei einem Behandlungserfolg von 80% wurden die Trypanosomenreferenzen als sensitiv gegenüber der getesteten Dosis bezeichnet. Mit Hilfe dieses Schemas konnten bei 1 mg/kg Isometamidium und 14 mg/kg Diminazen sensitive von resistenten Referenzen unterschieden werden. Die zur Verfügung stehenden *T. congolense*-Stämme wurden in diesen Dosierungen getestet und charakterisiert.

Mit Ausnahme von SA 53 waren alle getesteten *T. congolense*-Populationen im SMT gegenüber Isometamidium und Diminazen resistent. Bei den Stämmen aus der Blockbehandlungsstudie konnte sogar nachgewiesen werden, dass *T. congolense*-Populationen, isoliert aus Rindern, die mit Isometamidium erfolgreich behandelt werden konnten, sich im SMT als resistent herausstellten. In diesen Fällen war der SMT den Felduntersuchungen überlegen.

#### 5.4.5 DIIT als Kombination eines *in-vivo* und *in-vitro*-Testsystems

Ziel dieser Untersuchungen war es, den DIIT als Kombination eines *in-vivo*- und *in-vitro*-Tests für *T. congolense* zu etablieren und zu validieren. Der Test sollte die Nachteile des SMT (Abhängigkeit der Trypanozidwirksamkeit von der Pharmakokinetik im jeweiligen Wirtstier) ausschalten. Für *T. congolense* war das Verfahren bisher nur mit Isometamidium beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden *T. congolense*-Referenzklone zusätzlich auch in verschiedenen Diminazenkonzentrationen getestet. Mit Hilfe der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der DIIT zur Ermittlung der Isometamidium- und Diminazenempfindlichkeiten von *T. congolense*-Referenzklonen geeignet ist. Im Anschluss daran wurde die Medikamentenempfindlichkeit einer Auswahl von *T. congolense*-Populationen aus dem Forschungsprojekt „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project) bestimmt.

Alle untersuchten *T. congolense*-Populationen waren im DIIT sowohl gegenüber Isometamidium als auch, soweit untersucht, gegenüber Diminazen resistent. Mit Ausnahme eines Trypanosomenstammes unterschieden sich die DIIT-Ergebnisse aller untersuchten Trypanosomenpopulationen nicht von ihren SMT-Ergebnissen. Der *T. congolense*-Stamm SA 53 konnte anhand des erarbeiteten Untersuchungsschemas im SMT für Diminazen nicht

eindeutig charakterisiert werden (Sensitivitätsgrenze zwischen 14, 21 und 35 mg/kg Diminazen). Im DIIT für Diminazen dagegen war der Stamm eindeutig resistent.

Vergleicht man den SMT mit dem DIIT, so gibt es im Bezug auf die Ergebnisfindung, (Ausnahme: Diminazenempfindlichkeit von Stamm SA 53), keine Unterschiede. Die Trypanozidempfindlichkeit von insgesamt 16 untersuchten *T. congolense*-Stämmen konnte mit Hilfe beider Verfahren gleich gut charakterisiert werden. Der DIIT ist durch den *in-vitro*-Teil methodisch sehr aufwendig, so dass der SMT wesentlich einfacher und praktikabler für die Untersuchung einer größeren Anzahl von *T. congolense*-Populationen aus Primärisolaten ist. Allerdings zeigte die Untersuchung des Stammes SA 53, dass im DIIT für Diminazen eine Charakterisierung möglich war, während im SMT die Diminazenempfindlichkeit nicht eindeutig bestimmt werden konnte. In diesem Fall war der DIIT der methodisch empfindlichere Test. Die Überprüfung einer statistisch signifikanten Anzahl von *T. congolense*-Populationen könnten die Überlegenheit des DIITs gegenüber des SMTs bei der Resistenzbestimmung zeigen.

#### 5.4.6 Schlussbetrachtungen

Wenn diese Arbeit auch nicht das Ziel hat, die epidemiologische und wirtschaftliche Bedeutung der Medikamentenresistenz in Burkina Faso zu beurteilen, wird mit diesem methodischen Beitrag jedoch zweifelsfrei die Dimension der Problematik deutlich. In Rahmen des Forschungsprojekts „Epidemiology of drug resistance of animal trypanosomes in West Africa“ (BMZ-Special Project, 1998-1999) wurde bei Rinderherden in der Provinz Kéné Dougou eine weitverbreitete Trypanozidresistenz festgestellt. Das dort vorhandene landwirtschaftliche Produktionssystem ist gekennzeichnet aus einer Vielzahl von kleinbäuerlichen Farmen, für die die Rinder lebensnotwendige Milch-, Fleisch- und Arbeitskraftlieferanten sind und der Rinderbesitz zugleich auch eine finanzielle Sicherheit für die eigene Familie bedeutet. Die sozio-ökonomischen Auswirkungen des gehäuften Einsatzes von Trypanoziden und das Vorkommen von therapieresistenten Trypanosomenpopulationen sind für jeden einzelnen Herdenbesitzer enorm. Die Untersuchungen des Forschungsprojekts haben gezeigt, dass dringend alternative Lösungen zum Trypanozideinsatz bzw. eine Kombination der verschiedenen Bekämpfungsmöglichkeiten („Integrated Disease Management“: z.B. wirksame Tsetsefliegenkontrolle und/oder der Einsatz trypanotoleranter Rinderrassen) benötigt werden. Innerhalb der verschiedenen Bekämpfungsmaßnahmen ist die Mitarbeit der Farmer ein essentieller Bestandteil. Dazu sind umfassende Information und Beratung von veterinärmedizinischer und behördlicher Seite

gefordert. Wirksame Aufklärung und Qualitätskontrollen im Bereich der Medikamentenabgabe und -anwendung sind erforderlich, um die Vermarktung von Trypanoziden minderer Qualität bzw. vorkommende Fehldosierungen zu verhindern (OUEDRAOGO, 2000).

Trotz alternativer Methoden bleibt der Gebrauch von Trypanoziden ein unverzichtbares Mittel in der Krankheitsbekämpfung (GEERTS und HOLMES, 1998). Solange neue wirksame Trypanozide nicht auf dem Markt erhältlich sind, müssen die vorhandenen für Rinder zugelassenen Medikamente sorgfältig eingesetzt werden. Voraussetzungen hierfür sind genaue Kenntnisse über die Empfindlichkeit der Erreger gegenüber den kommerziell erhältlichen Trypanoziden. Zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit werden Methoden benötigt, die auch unter einfachen Feldbedingungen aussagekräftige Ergebnisse liefern. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass der Standard-Maustest solange der geeignete, praktikable und aussagekräftige Test zur Bestimmung der Medikamentenempfindlichkeit von *T. congolense*-Populationen sein wird, bis die Schwierigkeiten bei der *in-vitro*-Kultivierung von *T. congolense*-Populationen überwunden sind.