

## 5 DISKUSSION

Für die Implementierung geeigneter Bekämpfungsstrategien der Nagana bei bestehenden Trypanozidresistenzen und zum besseren Verständnis der Resistenzursachen im Sinne der Prävention ist es äußerst wichtig, die Gebiete mit Vorkommen von Trypanozidresistenzen zuverlässig zu identifizieren (GEERTS & HOLMES, 1998).

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Nachweismethoden für Trypanozidresistenzen entwickelt (Kap. 2.7), wovon die meisten geeignet sind, eine geringe Anzahl von Trypanosomenisolaten detailliert auf ihre Medikamentenempfindlichkeit zu analysieren. Dagegen besteht ein Mangel an geeigneten Methoden zur Ermittlung resistenter Trypanosomeninfektionen in Nutztierpopulationen unterschiedlicher geographischer Herkunft in einem zeitlich und ökonomisch vertretbaren Rahmen.

Anhand der vorliegenden Studie wurde die Eignung der PCR und DNA-Sondenhybridisierung zur Überprüfung des Behandlungserfolges der Nagana anhand von Blutproben von Rindern aus einem Endemiegebiet mit Vorkommen von Trypanozidresistenzen in Burkina Faso getestet.

Die Ergebnisse einer Studie aus einem Endemiegebiet mit sensitiven Trypanosomenpopulationen in Uganda (CLAUSEN *et al.*, 2001) und von Studien mit experimentell infizierten Tieren in Uganda und Burkina Faso (CLAUSEN *et al.*, 1999; BENGALY *et al.* 2001) wiesen bereits auf die Eignung der PCR zur Identifizierung trypanozidresistenter Trypanosomenpopulationen hin. In Regionen mit Vorkommen von Trypanozidresistenzen wurden derartige Untersuchungen mit der PCR aber bislang noch nicht durchgeführt.

### 5.1 ANALYTISCHE SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT DER SIMPLEX-PCR

Mit Proben gereinigter DNA von verschiedenen Trypanosomenreferenzstämmen und von Rindern als Negativkontrollen wurden alle Primerpaare auf ihre Spezifität getestet (Kap. 3.5). Für die Primerpaare TBR1/TBR2 zum Nachweis von *T. brucei* (MOSER *et al.*, 1989), TV80.24/TV322.24 zum Nachweis von *T. vivax* (MASAKE *et al.*, 1997; CLAUSEN *et al.*, 1998), TCN1/TCN2 zum Nachweis von *T. congolense savannah* (MOSER *et al.*, 1989) und TCF1/TCF2 zum Nachweis von *T. congolense forest* (MASIGA *et al.*, 1992) wurde dabei die in der Literatur beschriebene absolute Spezifität bestätigt. Die verlängerten Primer TBR1.45 und TBR2.47 zum Nachweis von *T. brucei* sowie TCN2.38 zum Nachweis von *T. congolense savannah* (in Verbindung mit TCN1) reagierten ebenfalls absolut spezifisch (Kap. 4.1).

Der Sensitivitätstest derselben Primerpaare anhand dekadischer Verdünnungsreihen gereinigter DNA der Trypanosomenreferenzstämmen erbrachte für jedes Primerpaar eine Nachweisgrenze von 100 fg DNA/PCR-Ansatz (Kap. 4.2). Nach BORST *et al.* (1982) beträgt die in einem einzelnen Trypanosom vorhandene DNA-Menge ca. 100 fg. Demzufolge war mit

der Simplex-PCR theoretisch ein Trypanosom pro PCR-Ansatz nachweisbar. Damit wurde für jedes Primerpaar eine hohe Sensitivität ermittelt, die auch größtenteils mit der in früheren Studien beschriebenen Sensitivität übereinstimmte. MOSER *et al.* (1989) beschrieben ähnliche Sensitivitätstests mit den Primerpaaren TBR1/TBR2 und TCN1/TCN2, wobei die Nachweisgrenze ebenfalls 100 fg DNA/PCR-Ansatz erreichte. CLAUSEN *et al.* (1999) wiesen mit dem Primerpaar TBR1/TBR2 sogar noch 1 fg DNA/PCR-Ansatz nach, während die Nachweisgrenze für das Primerpaar TV80.24/TV322.24 bei 1 pg DNA/PCR-Ansatz lag. Bei Sensitivitätstests mit Lysaten ganzer Trypanosomen ermittelten MASIGA *et al.* (1992) für das Primerpaar TCF1/TCF2 die Nachweisgrenze von einem Trypanosom/PCR-Ansatz. In derselben Studie wurde diese Nachweisgrenze auch für weitere Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense savannah* und *T. simiae* erreicht.

Obwohl die Ergebnisse der verschiedenen Untersucher generell eine gute Übereinstimmung zeigen, wurden teilweise unterschiedliche Nachweisgrenzen für dieselben Primerpaare ermittelt. Diese Differenzen sind sehr wahrscheinlich auf die Verwendung verschiedener Protokolle bei der DNA-Extraktion und/oder bei der PCR zurückzuführen. Die PCR-Reagentien wurden beispielsweise zum Teil in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Ferner wurden verschiedene Taq-Polymerasen und Thermocycler eingesetzt und unterschiedliche Temperaturprofile bei der PCR angewandt (MOSER *et al.*, 1989; MASIGA *et al.*, 1992; CLAUSEN *et al.*, 1999).

## 5.2 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR

### 5.2.1 Besprechung der Ergebnisse der gesamten Stichprobe

Beim Methodenvergleich der BCT mit der PCR anhand von 180 Blutproben, die von Rindern der ISMM-Studie vor der ISMM-Behandlung entnommen worden waren (Kap. 3.5), wurden 92,2% (83/90) der BCT-positiven Rinder mit der PCR bestätigt. Außerdem reagierten 37,8% (34/90) der BCT-negativen Rinder ebenfalls positiv mit der PCR.

Für die gesamte Untersuchungsherde der ISMM-Studie wurde eine Prävalenz von 12,2% mit der BCT ermittelt. Der berechnete Schätzwert für die PCR-Prävalenz (Kap. 4.3.1) war hingegen mit 44% mehr als dreifach so hoch. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen früherer epidemiologischer Studien, wobei stets wenige der parasitologisch positiven Rinder nicht mit der PCR identifiziert werden konnten, während ein beachtlicher Teil der parasitologisch negativen Rinder mit der PCR positiv reagierte (SOLANO *et al.*, 1999; CLAUSEN *et al.* 1998, 2001).

Bei einer von SOLANO *et al.* (1999) durchgeführten Feldstudie in der Region von Sideradougou in Burkina Faso wurden 1036 Rinder parasitologisch mit der BCT untersucht, wovon 55 positiv waren. Das entsprach einer BCT-Prävalenz von 4,2%. Die mit der PCR

ermittelte Prävalenz für eine aus der Testpopulation ausgewählte Stichprobe mit 260 Tieren war dagegen mehr als doppelt so hoch (11,5%). Die Identifikationsrate der parasitologisch positiven Rinder mit der PCR betrug dabei 91% (10/11); von den parasitologisch negativen Blutproben waren 8% (20/249) mit der PCR-positiv (Solano *et al.*, 1999). Bei dieser Studie wurden Primerpaare für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* und *T. congolense forest* eingesetzt.

CLAUSEN *et al.* (1998, 2001) ermittelten bei einer Untersuchung von 486 Rindern aus der Region um Kampala, Uganda, eine Prävalenz von 18,9% mit der HCT und/oder m-AECT. Eine mit der PCR getestete zufällig ausgewählte Stichprobe mit 181 Blutproben ergab hingegen eine Prävalenz von 34,8%. Von den mit der HCT und/oder m-AECT positiven Rindern wurden dabei 92,5% mit der PCR identifiziert; von den negativen Rindern waren 18,4% mit der PCR positiv. Zur Probenanalyse wurden Primerpaare für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* verwendet; *T. congolense savannah* wurde bei keinem der untersuchten Rinder nachgewiesen.

Die Identifikationsrate der parasitärischen Tiere mit der PCR lag bei der vorliegenden Dissertation in der Größenordnung der in den Feldstudien von SOLANO *et al.* (1999) und CLAUSEN *et al.* (1998, 2001) beschriebenen. Für das Vorkommen vereinzelter falsch negativer PCR-Reaktionen bei parasitologisch positiven Tieren wurden bisher eine Reihe verschiedener Gründe diskutiert (Kap. 2.4.3.2). Hier waren zwei der sieben falsch negativen Reaktionen mit der PCR nachweislich auf die Wahl der Primer zurückzuführen. Die Probenanalyse war aus zeitlichen und ökonomischen Überlegungen auf die drei Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* beschränkt worden. Diese Trypanosomenspezies bzw. dieser Subtyp von *T. congolense* kommen in der Region am häufigsten vor (LEFRANCOIS *et al.*, 1999; REIFENBERG *et al.*, 1997; SOLANO *et al.*, 1996). Das Primerpaar zum Nachweis von *T. congolense forest* wurde nicht in die Untersuchung aufgenommen, obgleich das Vorkommen dieses Subtyps im Untersuchungsgebiet ebenfalls bekannt war. Bei einer zusätzlichen Analyse mit dem Primerpaar für *T. congolense forest* reagierten zwei der zuvor mit der PCR nicht identifizierten Proben parasitärischer Rinder positiv. Die Identifikationsrate der BCT-positiven Rinder mit der PCR erhöhte sich damit auf 94,4%. Dieses Ergebnis unterstreicht, wie wichtig die Wahl der richtigen Primerpaare bei epidemiologischen Studien für einen erfolgreichen Nachweis von Trypanosomeninfektionen mit der PCR ist.

Mehrere Autoren vermuten in der Existenz (noch) unbekannter Trypanosomenspezies und -subspezies oder -subtypen, für welche keine Primerpaare zur Verfügung stehen (MAJIWA *et al.*, 1994; MORLAIS *et al.*, 1998; SOLANO *et al.*, 1999), einen weiteren Grund für falsch negative Reaktionen der PCR (Kap. 2.4.3.2). Eine diesbezügliche Erfahrung wurde beim Trypanosomennachweis in Untersuchungsmaterial von Tsetsefliegen mittels DNA-Sonden beschrieben, wobei mit den zum Zeitpunkt der Studie verfügbaren DNA-Sonden der

Nachweis nicht gelang. Erst nach der Entdeckung und Charakterisierung der Spezies *T. (Nannomonas) godfreyi*, mit der diese Proben infiziert waren, konnte der erfolgreiche Nachweis mit spezifischen DNA-Sonden erfolgen (MCNAMARA *et al.*, 1989; MASIGA *et al.*, 1996).

Die hohe genetische Diversität des Subgenus *Nannomonas* hat zur Folge, dass bislang noch nie alle nach parasitologischen Kriterien als *Nannomonas* eingestufte Trypanosomen mit den bisher identifizierten repetitiven Sequenzen nachgewiesen werden konnten (MAJIWA & OTIENO, 1990; MAJIWA *et al.*, 1993). Für *T. vivax* und *T. simiae* (MASIGA *et al.*, 1992; SOLANO *et al.*, 1996; LEFRANCOIS *et al.*, 1998) wurden außerdem regionale intraspeziesspezifische Unterschiede beschrieben, die zum Versagen mancher Primer bzw. mancher DNA-Sonden beim Nachweis von Trypanosomen bestimmter Regionen führten (MASAKE *et al.*, 1997). MASAKE *et al.* (1997) entwickelten deshalb ein Primerpaar, welches zum Nachweis von *T. vivax* unterschiedlichen geographischen Ursprungs (Ostafrika, Westafrika, Südamerika) geeignet ist. Mögliche Variationen der repetitiven Sequenzen wurden auch von KATAKURA *et al.* (1997) als Grund für das Misslingen des PCR-Nachweises bei einigen parasitologisch positiven Blutproben mit *T. congolense* und *T. brucei* vermutet.

Bei den hier besprochenen Untersuchungen blieb(en) die Ursache(n) für fünf falsch negative PCR-Reaktionen ungeklärt. Die Tatsache, dass die Proben vom selben Herkunftsort stammten, regt zu Spekulationen über diesbezügliche Ursachen an. Hierbei müsste nicht zuletzt an Beschriftungsfehler der Blutprobenentnahmegefäße oder Fehler beim Blutumfüllen aus den Blutprobenentnahmegefäßen in die Kryoröhrchen zum Einfrieren der Proben gedacht werden. Nachdem zwei Blutproben von denselben Tieren 14 Tage später aber mit beiden Methoden positiv waren, musste wenigstens bei diesen Proben von der Richtigkeit der BCT-Diagnose und dem Vorliegen eines Laborfehlers bei der PCR ausgegangen werden.

Als Fehlerquellen im Laborbereich kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage, wie falsche Mischverhältnisse von Reagenzien durch Pipetierfehler, Inhibitoren im Reaktionsgemisch, DNA-Verluste bei der DNA-Extraktion des Untersuchungsmaterials und verschiedene technische Mängel, welche die PCR blockieren können (KENNETH, 1995; MASAKE *et al.*, 1997; SOLANO *et al.*, 1995 und 1999; REIFENBERG *et al.*, 1997). Um Fehler bei der PCR gänzlich ausschließen zu können, wurde für die Diagnostik von *Coxiella burnetii* eine Multiplex-PCR mit innerer Funktionskontrolle entwickelt (EDINGLOH *et al.*, 1999). Als innere Funktionskontrolle wurde dabei die Ko-Amplifikation eines Targets aus dem Wirtstiergenom (bovines CD18-Gen) genutzt. Mit diesem Test lässt sich nicht nur eine Hemmung des einzelnen PCR-Ansatzes ausschließen, sondern zugleich die gelungene DNA-Extraktion des Untersuchungsmaterials nachweisen (EDINGLOH *et al.*, 1999). Für die Trypanosomendiagnostik wäre die Entwicklung einer solchen Multiplex-PCR mit innerer Funktionskontrolle zur Abgrenzung der laborbedingten Fehler von anderen Ursachen für

PCR-Versagen ebenfalls sinnvoll. Dadurch könnte ferner die Verifizierung der PCR-Ergebnisse durch einen Doppelansatz der Proben oder mittels Hybridisierung der PCR-Produkte mit spezifischen DNA-Sonden entfallen. Sie ist insbesondere bei positiven Reaktionen parasitologisch negativer Tiere unverzichtbar (MAJIWA *et al.*, 1994).

Die hohe Anzahl unterschiedlicher Diagnosen im Sinne von BCT-negativen und zugleich PCR-positiven Rindern ist aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Methoden gut erklärbar. Während bei der vorliegenden Arbeit mit der PCR theoretisch 200 Trypanosomen pro ml Blut nachweisbar waren (ausgehend von einem Extraktionsvolumen von 250 µl und einem Template-Volumen von 5 µl; unter der Annahme, dass theoretisch ein Trypanosom pro Reaktionsansatz nachgewiesen werden kann), wurden für die BCT minimale identifizierbare Trypanosomenkonzentrationen von 5 - 10 x 10<sup>3</sup> Trypanosomen pro ml Blut beschrieben (KALU *et al.*, 1986).

Die Wirtstiere entwickeln bei Trypanosomeninfektionen unterschiedlich starke Parasitämien. Das geschieht einerseits in Abhängigkeit von Rasse, Alter, Geschlecht und Immunitätsstatus der Wirtstiere und wird andererseits durch die an der Infektion beteiligten Trypanosomenspezies, ihre Virulenz und die Infektionsdosis bedingt (CONNOR, 1994). Beim Einzeltier kommt es aufgrund des periodischen Antigenwechsels der Trypanosomen darüber hinaus zu den charakteristischen Fluktuationen der Parasitämie (CONNOR, 1994). Die Auswirkungen der periodischen Zu- und Abnahme der Parasitämien auf die parasitologische Diagnostik wurden bei vergleichenden Untersuchungen mit der PCR anhand experimenteller Infektionen von Mäusen mit *T. congolense* und/oder *T. brucei* und anhand experimenteller Infektionen von Rindern mit *T. vivax* bzw. *T. brucei* beschrieben (MOSEER *et al.*, 1989, MASAKE *et al.*, 1997, CLAUSEN *et al.* 1999). Während der niedrigen Parasitämiephasen waren auch mit den parasitologischen Anreicherungstechniken oftmals keine Trypanosomen mehr nachweisbar; mit dem Übergang in die chronische Erkrankungsphase nahm die Nachweisfrequenz noch weiter ab. Mit der PCR wurden dagegen sowohl während der niedrigen Parasitämiephasen, als auch bei den chronisch erkrankten Tieren regelmäßig Trypanosomeninfektionen diagnostiziert.

Aufgrund ihrer hohen Sensitivität würde die PCR bei einem Einsatz in epidemiologischen Studien eine zuverlässige Gebietseinteilung in Nicht-, Niedrig- und Hochprävalenzgebiete für die Nagana zulassen. Gemeinsam mit entomologischen Daten und Informationen über den Trypanozideinsatz könnte sie zu einer genaueren Beurteilung des Trypanosomoserisikos in verschiedenen landwirtschaftlichen Nutzungszonen beitragen (CLAUSEN *et al.* 1998). Darüber hinaus hätten Prävalenzunterschiede in der Größenordnung, wie sie hier mit der BCT und der PCR ermittelt wurden und auch bei den Feldstudien von CLAUSEN *et al.* (1998, 2001) und SOLANO *et al.* (1999) beschrieben wurden, Auswirkungen auf die Wahl der regionalen Bekämpfungsstrategien der Nagana (SOLANO *et al.*, 1999).

Die bei den verschiedenen Studien ermittelten unterschiedlichen Anteile der PCR-positiven Reagenten unter den parasitologisch negativen Tieren - bei der Studie von SOLANO *et al.* (1999) in Burkina Faso waren es 8%, bei der Studie von CLAUSEN *et al.* (1998, 2001) in Uganda 18,4 % und in dieser Studie 37,8% - sind sehr wahrscheinlich hauptsächlich auf das unterschiedliche Trypanosomoserisiko in den ausgewählten Untersuchungsgebieten zurückzuführen. Die Studie von SOLANO *et al.* (1999) fand in einem ehemaligen Interventionsgebiet zur Evaluierung der Tsetse-Reinvasion statt, während in Uganda die Auswirkung der Nagana auf lokale Milchproduktionsbetriebe untersucht werden sollte (CLAUSEN *et al.*, 1998, 2001). Bei der aktuellen Studie in Burkina Faso stand hingegen ein Problemgebiet mit bekanntem hohem Trypanosomoserisiko im Mittelpunkt.

Als weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Ergebnisse der verschiedenen Studien gehabt haben könnten, müssen Unterschiede in der Rasse- und Alterstruktur der untersuchten Herden sowie unterschiedliche Anteile männlicher und weiblicher Tiere genannt werden. Darüber hinaus könnten auch methodisch bedingte Sensitivitätsunterschiede eine Auswirkung auf die Ergebnisse gehabt haben. Die DNA-Extraktion wurde von SOLANO *et al.* (1999) mithilfe von Chelex, einem Chelator, durchgeführt, wobei der Buffy-Coat als Ausgangsmaterial diente. Von CLAUSEN *et al.* (1998) und in dieser Arbeit wurde hingegen die DNA-Extraktion nach Higuchi mit Vollblut als Ausgangsmaterial durchgeführt (Kap. 3.8.3.2). Diese verschiedenen Methoden haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Effektivität bei der DNA-Extraktion Auswirkungen auf die DNA-Menge, die schließlich aus dem Ausgangsmaterial gewonnen wird. Ferner wurden teilweise unterschiedliche PCR-Protokolle, Enzyme, Primerpaare und Thermocycler verwendet. Der mögliche Einfluss der verschiedenen Reaktionsbedingungen auf die Sensitivität der PCR wurde bereits angesprochen.

Zur Überprüfung des Behandlungserfolges der ISMM-Prophylaxe mit der PCR standen 177 Blutproben derselben Rinder zur Verfügung, die den Tieren 14 Tage nach der ISMM-Behandlung entnommen worden waren (Kap. 3.5.1). Als Vergleichswerte lagen die Ergebnisse des eben besprochenen Methodenvergleichs zugrunde.

Mit beiden Methoden wurden 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe der Rinder erneut Trypanosomeninfektionen diagnostiziert. Die Zahl der positiven Diagnosen war dabei im Vergleich zur Untersuchung vor der ISMM-Behandlung mit beiden Methoden zurückgegangen (Kap. 4.3.1.3). Unabhängig von der Diagnostikmethode wäre nach einer effektiven ISMM-Prophylaxe der Rinder das völlige Ausbleiben positiver Befunde zu erwarten gewesen. Behandlungsfehler hinsichtlich der Dosierung und der Applikation der Medikamente, sowie eine mangelhafte Qualität des Wirkstoffs u.a. (Kap. 2.6.1), konnten hier als Ursache für das Behandlungsversagen ausgeschlossen werden. Den Rindern waren einwandfreie Medikamente bekannter Qualität von sachkundigem Personal appliziert worden (MCDERMOTT *et al.*, 2000; OUÉDRAOGO, 2001). Das Gewicht jedes Rindes war ferner zur

richtigen Dosierungsberechnung mit einer elektronischen Viehwaage bestimmt worden. Beim Auftreten von Trypanosomeninfektionen 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe war deshalb von der Existenz ISMM-resistenter Erreger auszugehen. Mit dem ISMM-ELISA, dessen Feldeinsatz während der ISMM-Studie ebenfalls getestet wurde, waren außerdem hohe prophylaktische Wirkstoffkonzentrationen in den Serumproben der Rinder nachgewiesen worden (EISLER *et al.*, 1997; DIARRA, 1999). Bei einer Reihe von *T. congolense*-Isolaten, die von diesen Tieren stammten, wurde die ISMM-Resistenz darüber hinaus durch Medikamentensensitivitätstests in Mäusen bestätigt (MCDERMOTT *et al.*, 2000; DIARRA, 1999).

Mit 97,1% lag die Identifikationsrate der parasitärischen Rinder mit der PCR höher als vor der ISMM-Behandlung. Die möglichen Ursachen für falsch negative PCR-Reaktionen wurden weiter oben besprochen. Weil es sich hier nur um eine falsch negative Probe handelte, wurde auf eine Nachuntersuchung mit dem Primerpaar für *T. congolense* forest verzichtet. Die Differenz bei der Anzahl der BCT- und PCR-positiven Rinder hatte sich nach der ISMM-Behandlung ebenfalls vergrößert. Während vor der ISMM-Behandlung 30% mehr positive Rinder mit der PCR als mit der BCT identifiziert wurden (117 PCR-positive Rinder und 90 BCT-positive Rinder), waren es 14 Tage nach der ISMM-Behandlung 114% mehr PCR- als BCT-positive (75 PCR-positive Rinder und 35 BCT-positive Rinder). Dieses Phänomen lässt sich mit niedrigeren Parasitämien der positiven Rinder nach der ISMM-Behandlung im Vergleich zu vor der Behandlung erklären. An natürlichen Infektionen im Wirtstier ist in der Regel eine Vielzahl verschiedener Trypanosomenpopulationen von einer oder mehreren Trypanosomenspezies beteiligt (MASAKE *et al.*, 1988). Die meisten dieser Trypanosomenpopulationen verhalten sich dabei sensibel gegenüber den trypanoziden Wirkstoffen und werden demzufolge bei einer korrekten Trypanozidbehandlung vernichtet. Bei einer Studie zur Interaktion zwischen trypanozidsensiblen und trypanozidresistenten *T. congolense*-Isolaten in experimentell infizierten Ziegen, wurde durch Superinfektion mit einem sensiblen Trypanosomenisolat die bestehende Infektion mit den resistenten Trypanosomen unterdrückt (SONES *et al.*, 1989). Daraus wurde geschlossen, dass die Lebensfähigkeit der resistenten Trypanosomen schlechter als die der sensiblen Trypanosomen ist und bei Ko-Infektionen der Anteil der sensiblen Trypanosomen überwiegt. Demzufolge wurde hier die Parasitenkonzentration im Wirtstierblut nach der ISMM-Behandlung in jedem Fall reduziert, auch wenn resistente Trypanosomenpopulationen überlebten. Die Nachweisgrenze der BCT wurde also aufgrund der allgemein niedrigeren Parasitämie der positiven Rinder häufiger als vor der ISMM-Behandlung unterschritten. Deshalb wurden verhältnismäßig weniger positive Tiere mit dieser Methode identifiziert. Der höhere mittlere Hämatokritwert der aparasitärischen PCR-positiven Tiere weist ebenfalls auf die Richtigkeit dieser Erklärung hin. Die mit beiden Methoden negativ beurteilten Rinder wurden als geheilt betrachtet, wenn auch mit den

spezifischen DNA-Sonden keine Hybridisierungsreaktionen der PCR-Produkte festgestellt wurden.

Bei einer ähnlichen Studie zur Überprüfung des Behandlungserfolges mit ISMM bei natürlich infizierten Rindern in Uganda war die mit der HCT und/oder mAECT ermittelte Prävalenz bei den Folgeuntersuchungen der Tiere einen, zwei und drei Monate nach der ISMM-Behandlung auf 0,4% bzw. 0,7% bzw. 3,2% gesunken. Mit der PCR war während der ersten drei Monate nach der Behandlung keine der aparasitämischen Blutproben positiv. Die ersten PCR-positiven Ergebnisse tauchten erst drei Monate nach der Behandlung mit dem Ende der Wirksamkeit des Medikaments auf. Diese Ergebnisse spiegelten eine hohe ISMM-Sensitivität der Trypanosomenpopulationen aus dem Untersuchungsgebiet wieder, die auch in zusätzlichen *in vivo*- und *in vitro*-Tests zur Chemoresistenz bestätigt wurden (CLAUSEN *et al.*, 2001).

Zur Überprüfung des Behandlungserfolges der DIM-Therapie standen Blutproben von 34 Rindern, die 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe aufgrund ihres parasitologisch positiven Befundes zusätzlich mit DIM behandelt worden waren, zur Verfügung (Kap. 3.5.1). Die Ergebnisse aus den beiden vorausgehenden Untersuchungen lagen als Vergleichswerte für die Beurteilung zugrunde.

Auch 14 Tage nach der zusätzlichen DIM-Therapie wurden mit beiden Methoden wieder positive Tiere diagnostiziert (Kap. 4.3.1.4). Ein Therapieversagen durch eine fehlerhafte Behandlung der Rinder konnte wiederum ausgeschlossen werden (Kap. 2.6.1).

Die Identifikationsrate der BCT-positiven Rinder mit der PCR erreichte bei dieser Untersuchung 100%. Die Differenz der beiden Methoden bei der Anzahl der positiven Diagnosen hatte sich gegenüber den vorausgehenden Untersuchungen vor bzw. nach der ISMM-Behandlung immens vergrößert. Nach der zusätzlichen DIM-Behandlung wurden mit der PCR 320% mehr positive Tiere diagnostiziert, als mit der BCT (21 PCR-positive Rinder und 5 BCT-positive Rinder). Mit der Vernichtung der DIM-sensiblen Trypanosomenpopulationen aufgrund der DIM-Therapie wurde die Parasitämie der Rinder noch weiter reduziert. Die Trypanosomennachweisgrenze der BCT wurde damit noch häufiger unterschritten, als nach der ISMM-Behandlung. Darüber hinaus muss hierbei berücksichtigt werden, dass alle untersuchten Rinder vor der DIM-Applikation parasitämisch waren.

Die Wirksamkeit von Diminazen als Therapeutikum hält bedingt durch die kurze Halbwertszeit im Organismus nicht lange an - die Angaben reichen von zwei bis 21 Tage (WILLIAMSON, 1976; PEREGRINE & MAMMAN, 1993). Bei positiven Befunden 14 Tage nach der DIM-Therapie wurde hier von der Existenz DIM-resistenter Erreger ausgegangen. Durch Sensibilitätstests in Mäusen wurde die DIM-Resistenz von *T. congolense*-Isolaten von Rindern der ISMM-Studie bestätigt (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Damit wurde zugleich die mögliche Beteiligung des ISMM am Resistenzeffekt des DIM widerlegt. Nachdem 14 Tage zuvor bei denselben

Wirtstieren schon ISMM-resistente Trypanosomeninfektionen nachgewiesen worden waren, musste hier außerdem von der Existenz mehrfach resistenter (d.h. resistent gegen beide Wirkstoffgruppen) Erreger ausgegangen werden.

Die Blutentnahme der DIM-behandelten Rinder war aus logistischen Gründen erst 14 Tage nach der Behandlung erfolgt. Um eine Verwechslung mit Reinfektionen, die nach dem Abfall der Medikamentenkonzentration unter einen wirksamen Spiegel auftreten können, auszuschließen, müsste die Untersuchung mit der PCR zum frühest möglichen Zeitpunkt nach der DIM-Therapie geschehen. Dabei müsste sichergestellt sein, dass sich bei erfolgreich behandelten Tieren keine Trypanosomen-DNA abgetöteter Erreger mehr im Blut befindet.

Wie bei einer Studie an vier künstlich mit *T. brucei* infizierten Rindern in Uganda demonstriert wurde, verschwanden die PCR-Signale bei zwei Rindern drei bzw. vier Tage nach der DIM-Behandlung einhergehend mit einer deutlichen Verbesserung ihres Gesundheitszustandes. Bei den beiden anderen Rindern waren hingegen mehrere Blutproben nach der Behandlung PCR-positiv einhergehend mit einer klinischen Verschlechterung mit ZNS-Symptomatik, welche schließlich zum Tod der Tiere führte (CLAUSEN *et al.*, 1999). WUYTS *et al.* (1994) berichteten vom Verschwinden der PCR-Signale innerhalb von 12 Stunden bzw. innerhalb von 6 - 12 Stunden nach der DIM-Behandlung eines mit *T. evansi* experimentell infizierten Kalbes bzw. bei mit *T. evansi* experimentell infizierten Mäusen in Thailand. Bei einer Studie mit experimentell infizierten Schafen (mit *T. congolense savannah*, *T. congolense forest* und *T. vivax*) in Burkina Faso verschwanden die PCR-Signale ein bis zwei Tage nach der Behandlung der Schafe mit DIM einhergehend mit einem Abfall der AK-Spiegel und einer Erhöhung des Hämatokritwertes (BENGALY *et al.*, 2001). Mit der PCR wurde dabei nach 19 Tagen Behandlungsversagen bei einem der Tiere festgestellt, während mit der BCT erst 42 Tage später Parasiten bei diesem Tier diagnostiziert wurden.

Weil die Pharmakokinetik von Diminazen tierartliche Unterschiede aufweist - kleine Wiederkäuer und Mäuse eliminieren den Wirkstoff schneller als große Wiederkäuer (PEREGRINE, 1993), wird in Anlehnung an die Beobachtungen bei den Rindern vorgeschlagen, bei Feldstudien den Therapieerfolg mit DIM eine Woche nach der Behandlung der Rinder mit der PCR zu überprüfen.

### 5.2.2 Besprechung der Ergebnisse auf Dorfebene

Vor der ISMM-Behandlung wurde in sieben von neun Dörfern, wo mit beiden Methoden Trypanosomeninfektionen diagnostiziert worden waren, die Anzahl der parasitologisch positiven Tiere von der Anzahl der PCR-positiven Reagenten übertroffen (Kap. 4.3.2). In einem Dorf wurden (unter Berücksichtigung der mit der PCR diagnostizierten *T. congolense forest*-Infektion) mit beiden Methoden gleich viele positive Tiere ermittelt. Nur in Sokoroni,

woher die fünf mit der PCR nicht identifizierten parasitärischen Rinder stammten, wurden mehr positive Tiere mit der BCT diagnostiziert.

In acht Dörfern wurden PCR-positive Reagenten unter den parasitologisch negativen Rindern ermittelt, deren Anteil zwischen 7,1% und 85,7% variierte. Sehr wahrscheinlich waren diese auffallenden Variationen auf lokale Prävalenzunterschiede zurückzuführen, die auf dem regional schwankenden Trypanosomoserisiko - möglicherweise in Zusammenhang mit lokalen Resistenzunterschieden der Trypanosomenpopulationen - basierten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass in den Dörfern mit den höchsten BCT-Prävalenzen, die Anzahl der PCR-positiven Reagenten unter den BCT-negativen Rindern ebenfalls am höchsten war. Die zum Teil sehr großen Prävalenzunterschiede, die mit den beiden Methoden in den einzelnen Dörfern ermittelt wurden, dürften ebenso wie auf regionaler Ebene Konsequenzen bei der Auswahl der Bekämpfungsmethode der Nagana haben.

Bei der Untersuchung 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe der Rinder waren mit der PCR in neun Dörfern positive Tiere nachweisbar, während mit der BCT nur in sieben Dörfern parasitäre Tiere diagnostiziert wurden. Die Existenz der ISMM-resistenten Trypanosomeninfektionen blieb demzufolge in zwei Dörfern mit der BCT unerkannt (Kap. 4.3.2.2). Im Übrigen war die Anzahl der PCR-positiven Tiere in sechs der sieben Dörfer höher als die Anzahl der BCT-positiven; in einem Dorf wurden mit beiden Methoden gleich viele Infektionen identifiziert.

Vierzehn Tage nach der DIM-Therapie wurden mit der PCR in allen sieben Herkunftsdörfern positive Tiere nachgewiesen, während mit der BCT nur in zwei Dörfern parasitäre Tiere identifiziert wurden (Kap. 4.3.2.3). Die DIM-resistenten Trypanosomeninfektionen blieben somit sogar bei der Mehrheit der betroffenen Dörfer mit der BCT unentdeckt.

Wie die Ergebnisse der ISMM-Studie zeigen, variierte nicht nur die Prävalenz von Dorf zu Dorf, sondern auch die Resistenzsituation. Die Beispiele der Dörfer, wo mit der BCT im Gegensatz zur PCR keine Trypanozidresistenzen nachgewiesen wurden (Kap. 4.3.2.4), machen das besonders deutlich. Sie demonstrieren außerdem, dass der Nachweis von Trypanozidresistenzen mit parasitologischen Methoden insbesondere in Regionen mit niedrigeren Prävalenzen unzuverlässig ist. Eine Fehleinschätzung der Resistenzsituation hätte wiederum Konsequenzen auf die Wahl der Bekämpfungsstrategie. So werden für Gebiete mit bestehenden Trypanozidresistenzen integrierte Bekämpfungsstrategien mit einer starken Gewichtung der Tsetsebekämpfung empfohlen, um den Medikamenteneinsatz möglichst stark zu reduzieren. Für die Bekämpfung von einfachen und multiplen Trypanozidresistenzen werden wiederum unterschiedliche Empfehlungen herausgegeben (Kap. 2.6.4). Beispielsweise sollen die Medikamente beim Vorkommen multipler Trypanozidresistenzen strikt den klinischen Fällen vorbehalten werden, während bei einfachen Trypanozidresistenzen der Einsatz des Wirkstoffes, gegen den noch keine Resistenzen vorliegen, immer noch in einem größeren Umfang möglich ist (GEERTS & HOLMES, 1998; ICPTV, 2000).

Bekämpfungrichtlinien für Gebiete mit Trypanozidresistenzen wurden bei einem ICPTV-Workshop (ICPTV, 2000) aufgestellt. Sie orientieren sich wesentlich an den Empfehlungen von GEERTS & HOLMES (1998) (Kap. 2.6.3 und 2.6.4). Die Problemgebiete wurden dabei basierend auf der Häufigkeit von im Tierversuch (Single-Dose Test für Mäuse, Tests in Kälbern) ermittelten Trypanozidresistenzen festgelegt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass die PCR eine geeignete Methode zur Ermittlung trypanozidresistenter Infektionen bei Rindern ist und eine interessante Alternative zum Single-Dose Test für Mäuse bei der Ermittlung solcher Problemgebiete bieten könnte. Weiter unten wird unter Berücksichtigung der Trypanosomenspeziesdiagnostik noch näher darauf eingegangen.

### 5.2.3 Besprechung der Ergebnisse der Speziesdiagnostik

Als am häufigsten vorkommender Erreger der Nagana wurde mit beiden Methoden *T. congolense* vor *T. vivax* und *T. brucei* identifiziert (Kap. 4.3.3). Die Differenz zwischen den beiden Methoden war beim Nachweis von *T. brucei* im Vergleich zu den anderen Trypanosomenspezies besonders auffallend - sowohl in Bezug auf die Anzahl der diagnostizierten Infektionen, als auch hinsichtlich ihrer Verbreitung. Mit der BCT wurden *T. brucei*-Infektionen nur in einem Dorf diagnostiziert, während mit der PCR in vier Dörfern positive Reagenten ermittelt wurden. *T. vivax*-Infektionen wurden mit der BCT in sieben und mit der PCR in acht Dörfern diagnostiziert.

Die Anzahl der mit der PCR identifizierten Mischinfektionen war im Vergleich zur BCT ebenfalls auffallend hoch. Dabei war *T. brucei* an fast zwei Drittel der Mischinfektionen beteiligt (Kap. 4.3.3).

Auf die Schwierigkeit, Mischinfektionen bei der mikroskopischen Betrachtung erkennen zu können, wurde schon von mehreren Untersuchern hingewiesen. Bei einer Studie in der Côte d'Ivoire wurde ein hoher Anteil an Mischinfektionen (64%) mit *T. congolense savannah*, *T. congolense forest* und *Trypanozoon* spp. bei Proben aus dem Mitteldarm von wild gefangenen Tsetsefliegen mit der PCR aufgedeckt (MC NAMARA *et al.* 1995). Eine von MORLAIS *et al.* (1998) durchgeführte PCR-Untersuchung von Fliegenorganen bei Wildfängen in Kamerun ergab einen Anteil von 40,4% Mischinfektionen. Hierbei kamen Kombinationen von *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense forest* und *T. simiae* vor. Weitere Erfolge bei der Identifizierung von Mischinfektionen mit der PCR wurden bei Proben von wildgefangenen Tsetsefliegen und Blutproben natürlich infizierter Rinder, sowie bei der Charakterisierung von Isolaten natürlich infizierter Haustiere in Burkina Faso beschrieben (LEFRANCOIS *et al.*, 1999; SOLANO *et al.*, 1996, 1999; REIFENBERG *et al.*, 1997).

Es muss davon ausgegangen werden, dass eine unterschiedliche Anzahl der verschiedenen Trypanosomenspezies im Blut der Wirtstiere zirkuliert, wobei die weniger zahlreich

vorhandene(n) Spezies bei der Mikroskopie leicht übersehen werden kann/können. Das Nichterkennen der meisten *T. brucei*-Infektionen mit der BCT stand hier sehr wahrscheinlich mit ihrem häufigen Auftreten als Mischinfektionen in Zusammenhang. In der Regel wurde(n) dabei jeweils nur die andere(n) beteiligte(n) Trypanosomenspezies mit der BCT erkannt (Kap. 4.3.3).

Bei den 90 BCT-positiven Rindern wurde die Übereinstimmung der Speziesdiagnosen von BCT und PCR überprüft. Vollständig oder teilweise übereinstimmende Diagnosen wurden bei insgesamt 85,6% der Proben beobachtet (Kap. 4.4.1). Als „teilweise übereinstimmende Diagnosen“ wurden dabei die Fälle definiert, bei denen zwar eine Speziesdiagnose bei beiden Methoden übereinstimmte, mit einer der beiden Methoden aber eine Mischinfektion - d. h. also noch eine weitere Spezies - diagnostiziert worden war. Bei nur 6,7% der Proben stimmte die Speziesdiagnose überhaupt nicht überein. Der Anteil der nicht mit der PCR identifizierbaren Proben nahm 7,8% ein.

Die Speziesdiagnosen von BCT und PCR stimmten bis auf den mangelhaften Nachweis von *T. brucei*-Infektionen und damit verbunden von Mischinfektionen mit der BCT also relativ gut überein. Aufgrund der absoluten Spezifität und höheren Sensitivität der PCR wurde die Ursache für die nicht übereinstimmenden Diagnosen (exklusive der falsch negativen PCR-Reaktionen) in Fehldiagnosen mit der BCT gesehen.

Die Diagnose der Trypanosomenspezies nimmt aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathogenität für Rinder und andere Haustiere eine wichtige Stellung für das Verständnis der Epidemiologie der Trypanosomose der Haustiere ein. In Westafrika ist *T. congolense* der pathogenste und damit wichtigste Naganaerreger beim Rind (CONNOR, 1994). Die Infektionen mit *T. vivax* werden von den Rindern besser toleriert, während die Infektionen mit *T. brucei* bei Rindern in der Regel symptomlos verlaufen (CONNOR, 1994). In Ostafrika wurde dagegen auch das Vorkommen hochpathogener Hämorrhagien verursachender *T. vivax*-Infektionen beschrieben (ASSOKU *et al.*, 1989; WELLDE *et al.*, 1989). Durch die humanmedizinische Bedeutung der *T. brucei*-Subspezies *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* als Erreger der menschlichen Schlafkrankheit ist die Diagnose von *T. brucei* auch bei Haustieren besonders wichtig. Haustiere können die humanpathogenen Erreger als Reservoirwirte beherbergen und so eine wichtige Rolle als Infektionsquelle für die Schlafkrankheit darstellen (MEHLITZ, 1986). Das Nichterkennen von *T. brucei*-Infektionen in Endemiegebieten der Schlafkrankheit könnte dort weitreichende Konsequenzen für Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen haben. Dieser Zusammenhang unterstreicht die Bedeutung, die der Entwicklung von Primerpaaren zur Unterscheidung aller Subspezies der *T. brucei*-Gruppe zukommt (WELBURN *et al.*, 2001; RADWANSKA *et al.*, 2001).

Vierzehn Tage nach der ISMM-Prophylaxe wurde *T. congolense* wiederum am häufigsten mit beiden Methoden diagnostiziert, während der Anteil der *T. vivax*-Infektionen gegenüber der Erstuntersuchung mit beiden Methoden stark zurückgegangen war. Der Anteil der

Mischinfektionen war mit der PCR stark gesunken, während er mit der BCT im Vergleich zu vorher etwa gleich gering war.

Mit der BCT wurden zwei Fälle mit *T. brucei*-Infektionen nachgewiesen, während diese Spezies mit der PCR nicht diagnostiziert wurde (Kap. 4.3.3.2). Die Ergebnisse der BCT deuteten also auf das Vorkommen resistenter *T. brucei*-Populationen hin, wogegen die PCR-Ergebnisse signalisierten, dass alle Infektionen mit *T. brucei* erfolgreich behandelt worden waren.

Bei beiden Rindern mit *T. brucei*-Infektionen laut der parasitologischen Diagnose wurden spezifische DNA-Produkte von *T. congolense* savannah amplifiziert. Sehr wahrscheinlich handelte es sich dabei um zwei Fehldiagnosen bei der Speziesbestimmung mit der BCT. Weiter unten (Kap. 5.4) wird diskutiert, dass das Vorkommen von *T. brucei* dennoch nicht auszuschließen war.

Vierzehn Tage nach der DIM-Behandlung wurde bei allen parasitärischen Rindern *T. congolense* identifiziert; weder *T. brucei*- noch *T. vivax*-Infektionen wurden diagnostiziert. Mit der PCR wurde ein *T. vivax*-positiver Reagent ermittelt. Bei den übrigen positiven Reagenten wurde ebenfalls *T. congolense* nachgewiesen.

Mit der parasitologischen Untersuchung wurde demnach die Existenz DIM-resistenter *T. congolense*-Infektionen festgestellt, wogegen mit der PCR außerdem der Nachweis einer DIM-resistenten *T. vivax*-Infektion gelang.

Bei den Naganaerregern haben Trypanozidesistenzen bei hochpathogenen Spezies sehr wahrscheinlich viel gravierendere ökonomische Folgen als Resistenzen bei wenig pathogenen Spezies. Für die Entscheidung über Maßnahmen gegen Trypanozidresistenzen ist es außerdem aus dem oben genannten Grund auch wichtig zu wissen, ob sie sich gegen tier- und/oder humanpathogene Erreger richten sollen. Unterschiede der Speziesdiagnostik zwischen den beiden Methoden bei könnten also ebenfalls Konsequenzen hinsichtlich der Bekämpfungsstrategie der Trypanosomose haben - insbesondere bei Auftreten von chemoresistenten Trypanosomenpopulationen.

### 5.3 ERGEBNISSE DER DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG

Die Identität der PCR-Amplifikate wurde in dieser Arbeit durch die Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden verifiziert. Die zuverlässige Bestätigung der positiven PCR-Ergebnisse war besonders wichtig, weil die PCR ohne einen Doppelansatz der Proben durchgeführt wurde. Darüber hinaus wurde die Sensitivität der PCR durch zusätzliche Hybridisierungsreaktionen von negativen PCR-Produkten bei der ersten Untersuchungsrunde (vor der ISMM-Behandlung; Kap. 4.4) um 6,8 % und bei der zweiten Untersuchungsrunde (14 Tage nach der ISMM-Behandlung; Kap. 4.4.2) um 10,7 % gesteigert.

Möglicherweise wäre die Zahl der Hybridisierungsreaktionen noch höher gewesen, wären alle PCR-Produkte, die aus den Untersuchungen auf *T. brucei* stammten, getestet worden. Diese Ergebnisse waren mit den von CLAUSEN *et al.* (1998, 1999, 2001) bei einer Feldstudie mit Rindern in Uganda beschriebenen vergleichbar, wo die Sensitivität der PCR mittels DNA-Sondenhybridisierung (mit spezifischen Sonden für *T. brucei* und *T. vivax*) um 7,3% gesteigert wurde. Die von MOSER *et al.* (1989) geäußerte Vermutung einer 100-fachen Sensitivitätssteigerung der PCR mit der DNA-Sondenhybridisierung konnte durch diese Untersuchung nicht bestätigt werden.

#### 5.4 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR MIT DER MÄUSEINOKULATION

Die Infektion von Mäusen mit dem Blut BCT-positiver Rinder gelang nur mit weniger als der Hälfte der vor der ISMM-Behandlung entnommenen Blutproben (43/90) und mit weniger als einem Drittel der 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe entnommenen Blutproben (11/35) (DIARRA, 2001).

Mit *T. congolense* und *T. vivax* herrschten gerade die Trypanosomenspezies vor, mit denen eine Infektion von Mäusen nur teilweise bzw. kaum gelingt (PARIS *et al.*, 1982). Das Nichtgelingen der Infektion von Mäusen mit der Mehrheit der Blutproben war deshalb nicht verwunderlich.

Gegenüber den BCT- und PCR-Ergebnissen war der Anteil der *T. brucei*- und der *T. vivax*-Infektionen bei den Mäusen erhöht, was bei *T. brucei* aufgrund seiner guten Anzuchtbarkeit in Mäusen zu erwarten war, während es bei *T. vivax* aus dem oben genannten Grund sehr überraschte und unerklärlich war. Bei den Mäusen wurden - selbst im Vergleich zur PCR - anteilmäßig mehr Mischinfektionen identifiziert (Kap. 4.5).

Die Übereinstimmung der Speziesdiagnosen zwischen der Mäuseinokulation und den beiden anderen Methoden war nach der Addition der vollständig und teilweise übereinstimmenden Diagnosen relativ hoch (81,4% mit der BCT und 92,5% mit der PCR). Insgesamt wich das Infektionsmuster bei der Mäuseinokulation jedoch stark von den Ergebnissen der BCT und PCR ab. Die Ergebnisse von BCT und PCR zeigten dem gegenüber eine bessere Übereinstimmung. Vor der ISMM-Behandlung war *T. brucei* der bei den Mäusen am häufigsten diagnostizierte Erreger. Die *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen wiesen zahlenmäßig keinen großen Unterschied auf.

Auch bei den 14 Tage nach der ISMM-Behandlung entnommenen Blutproben war der Anteil der *T. brucei*- und der *T. vivax*-Infektionen gegenüber den Ergebnissen von BCT und PCR erhöht. Die fünf *T. brucei*-Infektionen der Mäuse lagen alle als Mischinfektionen mit *T. congolense* bzw. als Dreifachinfektion vor, während mit der PCR bei diesen Proben jeweils *T. congolense* identifiziert wurde. Im Hinblick auf den Resistenznachweis wäre die

Bestätigung der *T. brucei*-Infektionen der Mäuse mittels PCR oder DNA-Sonden zu empfehlen.

Für *T. brucei* ist der Tierversuch neben der PCR eine hochsensitive Nachweismethode. Zum Nachweis von *T. brucei* in Mäusen würde theoretisch ein lebender Trypanosom reichen - womit in diesem Fall - bei einer Inokulationsdosis von 0,5 ml - mindestens zwei Trypanosomen/ml Blut vorhanden sein müssten. Die theoretische Nachweisgrenze für die PCR lag hier bei mindestens 200 Trypanosomen/ml Blut (Kap. 4.2). Aufgrund der hohen Sensitivität des *T. brucei*-Nachweis in Mäusen, der mit einer Erregervermehrung einhergeht, muss hier von der Richtigkeit der Speziesdiagnose ausgegangen werden. Theoretisch wäre das Vorkommen von Dreifachinfektionen, wobei *T. congolense* und *T. vivax* nur mit der PCR und *T. brucei* nur in Mäusen diagnostiziert werden, sogar möglich.

Bei einem experimentell mit *T. brucei* infizierten Rind, das schließlich unter zentralnervösen Störungen verendete, konnte nach der DIM-Behandlung an manchen Tagen keine DNA mit der PCR nachgewiesen werden, wogegen der Nachweis an anderen Tagen gelang (CLAUSEN *et al.*, 1999). Nachdem die PCR immer wieder positiv war und das Tier schließlich an der Infektion starb, waren offenbar stets Erreger vorhanden gewesen, wenngleich ihr Nachweis mit der PCR nicht immer gelang. Dieses Experiment bestätigte einerseits die hohe Sensitivität der PCR, wies andererseits aber auch auf ihre Grenzen hin.

## 5.5 VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR ANHAND WEITERER PARAMETER

Nachfolgend werden die mittleren Hämatokritwerte der positiven und negativen Rinder im Hinblick auf die Unterschiede zwischen BCT und PCR besprochen.

Ein möglicher Rasse-, Alters- und Geschlechtseinfluss auf die Ergebnisse der beiden Methoden wird ebenfalls diskutiert. Weil nur wenige Tiere nach der zusätzlichen DIM-Behandlung untersucht wurden und deren Zusammensetzung hinsichtlich Rasse, Alter und Geschlecht gegenüber den vor bzw. nach der ISMM-Behandlung untersuchten Rindern verändert war, wurden diese dabei nicht berücksichtigt.

### 5.5.1 Mittlerer Hämatokrit

Bei den mit beiden Methoden positiven Rindern lag der mittlere Hämatokritwert (Hkt-MW) (WOITAG, 1999) mit 26,4 Vol.% deutlich unter dem Wert der übereinstimmend negativen Rinder (32,0 Vol.%). Der Hkt-MW der Schnittmenge aus BCT-negativen und PCR-positiven Rinder lag mit 29,0 Vol.% ziemlich exakt in der Mitte (Kap. 4.6.1). Die nachweisliche Korrelation zwischen Parasitämie und Anämie bestätigte hiermit die obige Erklärung für die Vergrößerung der diagnostischen Differenz zwischen BCT und PCR (MURRAY *et al.*, 1977, TRAIL *et al.*, 1990).

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung präsentierte sich annähernd dasselbe Bild: Der Hkt-MW der mit beiden Methoden übereinstimmend positiven und negativen Rinder lag bei 25,9 Vol.% bzw. 30,7 Vol.%, während sich der Hkt-MW der BCT-negativen und PCR-positiven Rinder mit 28,2 Vol.% wieder in der Mitte befand (Kap. 4.6.1). Im Vergleich zu vor der ISMM-Behandlung waren mehr aparasitämische Tiere PCR-positiv.

Nach der zusätzlichen DIM-Behandlung der Rinder schlug sich die insgesamt niedrigere Parasitämie der positiven Tiere auch in einem Anstieg des Hkt-MW nieder. Die Werte für die übereinstimmend positiven und negativen Rinder lagen bei 27,6 Vol.% bzw. 29,5 Vol.%, während der mittlere Hämatokritwert der BCT-negativen und PCR-positiven Rinder 29,2 Vol.% erreichte (Kap. 4.6.1).

Nachdem die Grenzen der parasitologischen Diagnostikmethoden bekannt sind, wurde der Hämatokritwert schon mehrfach in Verbindung mit diesen Methoden als Entscheidungskriterium für den Trypanozideinsatz zur Behandlung der Nagana bei Rindern verwendet bzw. empfohlen (BAUER *et al.*, 1999; ICPTV, 2000; McDERMOTT *et al.*, 2000). Aufgrund dieses hämatologischen Parameters sollten die parasitologisch nicht identifizierbaren Infektionsträger als Kandidaten für eine Trypanozidbehandlung aus den Herden herausgefiltert werden.

Im Rahmen einer integrierten Bekämpfungskampagne gegen die Nagana in einem Hochprävalenzgebiet im Süden von Burkina Faso wurden neben der Tsetsebekämpfung mit insektizidgetränkten Targets und durch Insektizidbehandlung der Rinder alle parasitologisch mit der BCT positiven Tiere und alle Tiere mit einem Hämatokrit mit  $\leq 25$  Vol.% DIM therapiert. Wenn ihr Anteil pro Herde 40% überstieg, wurde die ganze Herde behandelt. Mit dieser Vorgehensweise wurde die Inzidenzrate in den Herden von teilweise über 30% vor der Bekämpfungskampagne auf weniger als 5% gesenkt. Die mittleren Hämatokritwerte stiegen von 26,5 - 30,9 Vol.% vor der Bekämpfung auf 30,7 - 36,3 Vol.% danach an. Wie diese Bekämpfungskampagne demonstriert, hatte die Nagana in diesem Hochprävalenzgebiet einen entscheidenden Einfluss auf den Hämatokritwert - ungeachtet anderer Faktoren, die eine Anämie hervorrufen könnten, wie beispielsweise hohe Wurmbürden und Mangelernährung. Als einfache Methode zur Evaluierungsmöglichkeit des Trypanosomoserisikos schlugen BAUER *et al.* (1999) den Einsatz des sog. POS (Production Opportunity Set) vor, wonach die Infektionsrate in den Herden 5% nicht über- und der mittlere Hämatokritwert 28 Vol.% nicht unterschreiten sollte, um eine ökonomische Tierproduktion zu gewährleisten. Das POS wurde auch als Methode zur Identifizierung von Problemgebieten für den Nachweis von Trypanozidresistenzen empfohlen (ICPTV, 2000). Der mittlere Hämatokritwert der Untersuchungsherde der ISMM-Studie lag vor der ISMM-Behandlung jedoch bei 30,4 Vol.% und 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe bei 30,0 Vol.% - trotz der nachweislich hohen Prävalenzen und Trypanozidresistenzen. Eine Eignung zur

Identifizierung von Risikogebieten mit Trypanozidresistenzen muss dem POS deshalb abgesprochen werden.

Bei der ISMM-Studie (Kap. 3.3) wurden 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe außer den parasitologisch positiven Rindern auch die anämischen Tiere mit einem Hämatokritwert  $\leq 25$  Vol.% mit DIM therapiert (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Von den 25 anämischen parasitologisch negativen Tieren der PCR-Stichprobe waren 11 PCR-positiv und 14 PCR-negativ (Kap. 4.6.1). Das bedeutet, dass über die Hälfte der behandelten Tiere negativ war. Von den 117 aparasitämischen Rindern mit einem Hämatokritwert  $>25$  Vol.% waren dagegen 29 PCR-positiv (Kap. 4.6.1). Diese Tiere wurden von der Behandlung nicht erfasst. Die Eignung des Hämatokritwertes als Entscheidungskriterium für eine Trypanozidbehandlung scheint aufgrund dieser Ergebnisse eher fragwürdig - insbesondere im Hinblick auf die Resistenzproblematik und einen gezielten Medikamenteneinsatz.

### 5.5.2 Einfluss der Rasse

Vor der ISMM-Behandlung waren 58,3% der trypanotoleranten Baoulés, 55% der Kreuzungsrinder (Baoulé x Zebu) und 34,0% der Zebus aus der PCR-Stichprobe mit der BCT positiv, während mit der PCR 83,3% der Baoulés, 70,6% der Kreuzungsrinder und 42,6% der Zebus positiv waren. Wider Erwarten waren also die Anteile der parasitämischen Tiere bei den Baoulés und Kreuzungsrinder höher als bei den empfänglicheren Zebus. Die Mehrzahl der Baoulés stammte allerdings aus Dörfern mit hoher BCT-Prävalenz, während die Mehrzahl der Zebus aus Dörfern mit niedrigerer BCT-Prävalenz bzw. aus Fama, wo überhaupt keine Infektionen festgestellt wurden, stammte. Das unterschiedliche Trypanosomoserisiko in den Herkunftsorten der Tiere war somit sehr wahrscheinlich die Ursache dieses Phänomens. Weil die Rasseverteilung in den einzelnen Herden sehr heterogen war, wurden nur die Ergebnisunterschiede zwischen BCT und PCR vor bzw. 14 Tage nach der ISMM-Behandlung betrachtet. Hierbei konnte wiederum ein gewisser Einfluss der unterschiedlichen pro Rasse untersuchten Tierzahlen (24 Baoulés, 109 Kreuzungsrinder und 47 Zebus) nicht ausgeschlossen werden.

Beim Methodenvergleich fiel auf, dass die Differenz zwischen den mit beiden Methoden pro Rinderrasse positiv diagnostizierten Tieren stark variierte. So wurden mit der PCR 25% mehr positive Baoulés, 15,6% mehr positive Kreuzungsrinder und 8,6% mehr positive Zebus ermittelt als mit der BCT (Kap. 5.5.2). Dieser Ergebnisunterschied basierte sehr wahrscheinlich auf der niedrigeren Parasitämie der trypanotoleranten Rinder und ihren Kreuzungsprodukten im Vergleich zu den empfänglichen Rindern.

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung waren 26,1% der Baoulés, 16,8% der Kreuzungsrinder und 23,4% der Zebus parasitämisch. Damit war bei den Kreuzungsrindern und Baoulés ein wesentlich stärkerer Rückgang der Infektionen mit der BCT zu verzeichnen,

als bei den Zebus. Mit der PCR wurden dagegen 60,9% positive Reagenten unter den Baoulés, 46,7% unter den Kreuzungsrindern und gleichfalls 23,4% unter den Zebus ermittelt. Bei den Baoulés und Kreuzungsrindern hatte sich die diagnostische Differenz zwischen BCT und PCR im Vergleich zu vor der ISMM-Behandlung also stark vergrößert, während der Anteil der positiven Zebus bei beiden Methoden gleich war. Sehr wahrscheinlich führte die Fähigkeit zur besseren Kontrolle der Parasitämie bei den Baoulés und deren Kreuzungsprodukten zur längeren Aufrechterhaltung des niedrigen Erregerniveaus nach der ISMM-Behandlung, während sich die resistenten Trypanosomenpopulationen in den Zebus schneller erholten und vermehrten.

Diese Ergebnisse unterstreichen die bekannten rassebedingten Unterschiede der Rinder bei der Ausprägung von Parasitämien bei Trypanosomeninfektionen. Die Fähigkeit, die Parasitämie bei einer Trypanosomeninfektion besser kontrollieren zu können, wird gleichzeitig als Hauptursache für die höhere Widerstandsfähigkeit der trypanotoleranten Rinder gegenüber klinischen Erkrankungen im Vergleich zu den empfänglichen Rassen angesehen (MURRAY *et al.*, 1982, D'IETEREN *et al.*, 1998).

### 5.5.3 Einfluss des Alters

Vor der ISMM-Behandlung waren 47,9% der Kälber und Jungtiere (Tiere <3 Jahre) und 51,4% der adulten Rinder der PCR-Stichprobe parasitologisch positiv. Mit der PCR waren dagegen 60,3% der Kälber und Jungtiere und 68,2% der adulten Rinder positiv. Im Vergleich zur BCT wurden also 12,4% mehr positive Kälber und Jungtiere und 16,8% mehr positive adulte Rinder mit der PCR diagnostiziert (Kap. 4.6.3). Die Differenz zwischen den beiden Methoden war hier nicht sehr bedeutend. In die Untersuchung waren 73 Kälber und Jungtiere und 107 Adulte eingegangen, wobei die Kälber (Tiere <1 Jahr) aufgrund ihrer geringen Anzahl (6) mit den Jungtieren zusammengefasst worden waren.

Nach der ISMM-Behandlung betrug der Anteil der parasitämischen Tiere 18,1% bei den Kälbern und Jungtieren und 21,0% bei den Adulten, während mit der PCR 33,3% der Kälber und Jungtiere und 48,8% der Adulten positiv reagierten. Im Vergleich zur BCT wurden mit der PCR somit 15,2% mehr positive Kälber und Jungtiere und 27,8% mehr positive Adulte nachgewiesen. Die Differenz zwischen den mit der BCT und der PCR nachgewiesenen positiven Tieren war nach der ISMM-Behandlung also wesentlich größer als vor der Behandlung. Wahrscheinlich war das Vermögen, die nach der ISMM-Behandlung reduzierte Parasitämie länger auf niedrigem Niveau halten zu können, bei den Adulten größer als bei den Kälbern und Jungtieren.

Dafür spricht die von ROWLANDS *et al.* (1993) bei einer Studie mit äthiopischen Zebus gemachte Beobachtung, wonach bei Kälbern und Jungtieren bis zum Alter von 25-36 Monaten der mittlere monatliche Prävalenzanstieg mit der BCT stark zunahm, um bei den

Adulten (>3 Jahre) wieder etwas abzunehmen. Als Ursache der zunehmenden Trypanosomenprävalenz bei den Jungtieren wurde die mit dem Alter zunehmende Tsetseexposition sowie eine kumulative Exposition gegenüber multiplen Infektionen in Gebieten mit hohem Tsetседruck bzw. die Unmöglichkeit, mit Trypanozidbehandlungen alle Infektionen zu eliminieren, gesehen. Die Rinder entwickeln mit zunehmendem Alter insbesondere gegen Infektionen mit *T. vivax* eine Immunität, die zu deutlich niedrigeren Prävalenzen dieser Spezies bei den adulten Tieren führt; gegen Infektionen mit *T. congolense* wird dagegen nur eine schwache Immunität ausgebildet (ROWLANDS *et al.*, 1993).

#### 5.5.4 Einfluss des Geschlechtes

Vor der ISMM-Behandlung waren 46% der weiblichen und 55% der männlichen Rinder der PCR-Stichprobe parasitämisch. Mit der PCR waren dagegen 62% der weiblichen und 69% der männlichen Tiere positiv. Im Vergleich zur BCT wurden 16% mehr positive weibliche und 15,9% mehr positive männliche Tiere mit der PCR diagnostiziert (Kap. 4.6.4). Mit beiden Methoden wurde also jeweils ein etwas höherer Anteil positiver männlicher als weiblicher Tiere ermittelt. Geschlechtsbedingte Auswirkungen auf die Ergebnisunterschiede zwischen BCT und PCR waren dabei nicht ersichtlich.

Vierzehn Tage nach der ISMM-Behandlung waren 15,2% der weiblichen und 25,6% der männlichen Tiere wiederum parasitämisch. Im Vergleich zu vor der ISMM-Behandlung wurden noch mehr parasitämische männliche als weibliche Tiere diagnostiziert. Mit der PCR reagierten 40,4% der weiblichen und 44,9% der männlichen Tiere positiv. Im Vergleich zur BCT hatte der Anteil der positiven weiblichen Tiere um 25,2% und der positiven männlichen Tiere um 19,3% mit der PCR zugenommen. Dabei waren 61% der aparasitämischen PCR-positiven Rinder weiblich. Demzufolge hatten die weiblichen Tiere nach der ISMM-Behandlung insgesamt niedrigere Parasitämien als die männlichen.

Bei äthiopischen Zebus fanden ROWLANDS *et al.* (1993) ebenfalls eine höhere Prävalenz bei männlichen als bei weiblichen Tieren, die ab einem Alter von 25-36 Monaten signifikant war. Weil weniger als ein Drittel der männlichen Tiere über 3 Jahre als Zugtiere genutzt wurden, wurde vermutet, dass als Ursachen dafür nicht ausschließlich die andere Umgebung und folglich die veränderte Tsetseexposition der männlichen Tiere sowie der Arbeitsstress in Frage kamen. Auch bei experimentell mit *T. congolense* infizierten Mäusen konnte eine höhere Empfänglichkeit von männlichen im Gegensatz zu weiblichen Tieren demonstriert werden (MURRAY *et al.*, 1982). Eine Erklärung für dieses wiederholt beobachtete Phänomen gibt es bislang nicht.

Im Hinblick auf die Überprüfung des Behandlungserfolges der Nagana kann festgehalten werden, dass die PCR dem direkten Erregernachweis 1) insbesondere bei der Untersuchung von trypanotoleranten Rindern und ihren Kreuzungsprodukten überlegen war und 2) dass die diagnostische Differenz zwischen den beiden Methoden nach der ISMM-Prophylaxe bei den Adulten größer als bei Jungtieren und 3) bei den weiblichen größer als bei männlichen Tieren war.

## 5.6 VOR- UND NACHTEILE DER MULTIPLEX-PCR

Mit der Multiplex-PCR sollte die Möglichkeit der kombinierten Anwendung der in der Simplex-PCR eingesetzten Primerpaare zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense savannah* überprüft werden.

Bei der Überprüfung der Spezifität der Multiplex-PCR trat ein unspezifisches Produkt von ca. 200 bp in der negativen Kontrollprobe mit Rinder-DNA auf, das auch bei den nachfolgend durchgeführten Versuchsansätzen mehrfach beobachtet werden konnte. Am häufigsten kam das unspezifische Produkt auch hier bei den negativen Kontrollproben mit Rinder-DNA vor, wo es zugleich auch am deutlichsten ausgeprägt war (Kap. 4.1). Bisweilen war es schlecht vom spezifischen 173 bp großen Produkt von *T. brucei* zu unterscheiden, insbesondere wenn die Lauffront bei der Elektrophorese schräg verlaufen war. Die gewählte Laufzeit der Elektrophorese war außerdem für eine genügende Auftrennung der Produkte nicht ganz ausreichend. Um eine Verbesserung der Auftrennung zu erreichen, müsste bei zukünftigen Analysen ein größeres Gel bei der Elektrophorese eingesetzt und ihre Laufzeit verlängert werden. Um die Richtigkeit der Ergebnisse garantieren zu können, müssten die spezifischen Produkte von *T. brucei* aber in jedem Fall durch eine nachgeschaltete Simplex-PCR oder DNA-Sondenhybridisierung der Amplifikationsprodukte verifiziert werden.

Weitere Optimierungsversuche der Multiplex-PCR könnten möglicherweise ganz zur Vermeidung des Auftretens des unspezifischen Produkts führen. Zur Beseitigung unspezifischer Produkte bei der Multiplex-PCR wurden folgende Lösungsvorschläge empfohlen (EDWARDS & GIBBS, 1994; HENEGARIU, 1997; SCHEINERT, 1997; SCHEINERT *et al.*, 1997): Eine graduelle Erhöhung der Annealing-Temperatur, eine Verringerung der Menge des Templates, eine Verringerung der Primerkonzentration, eine Verringerung der Enzymkonzentration, eine Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 3 - 4,5 mM bei gleichbleibender dNTP-Konzentration, der Einsatz von Adjuvantien (wie BSA oder Glycerol), eine Verringerung der PCR-Pufferkonzentration auf 0,7 - 0,9 x bei einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5 - 2 mM.

Eine Verringerung der Menge des Templates, würde für eine diagnostische Multiplex-PCR keinen Sinn machen, weil die Sensitivität der Methode darunter leiden würde. Deshalb ist diese Möglichkeit hier nicht empfehlenswert. Bei den übrigen Möglichkeiten müsste sukzessive getestet werden, ob und welche davon zur Problembeseitigung führen könnte(n).

Sollte sich der erwünschte Erfolg nicht einstellen, müsste das für die unspezifische Reaktion verantwortliche Primerpaar identifiziert und aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Dazu wäre jedes Primerpaar mit der Simplex-PCR bei einer niedrigeren Annealing-Temperatur als gewöhnlich, zu testen. Durch den Vergleich der dabei auftretenden unspezifischen Produkte mit dem bei der Multiplex-PCR entstandenen unspezifischen Produkt könnte das entsprechende Primerpaar so identifiziert werden.

Im Gegensatz zur hier gemachten Beobachtung wurden von MASIGA *et al.* (1992) und MAJIWA *et al.* (1994) keine unspezifischen Reaktionen bei einer Multiplex-PCR mit zwei Primerpaaren (TVW1/TVW2 zum Nachweis von *T. vivax* und TCS1/TCS2 zum Nachweis von *T. congolense savannah*) bzw. mit fünf Primerpaaren (ILO342/ILO342 zum Nachweis von *Trypanozoon*, ILO344/ILO345 zum Nachweis von *T. congolense savannah*, ILO336/ILO347 zum Nachweis von *T. simiae*, ILO893/ILO892 zum Nachweis von *T. congolense Tsavo* und ILO963/ILO968 zum Nachweis von *T. congolense Kilifi*) beschrieben. Dabei wurden andere Methoden zur DNA-Extraktion und andere PCR-Protokolle verwendet; ferner wurden zum Teil andere Primerpaare eingesetzt, womit auch teilweise andere Trypanosomenspezies nachgewiesen wurden. Dadurch sind Vergleiche und Rückschlüsse auf Ursachen in Verbindung mit dieser Arbeit nicht möglich.

Ein Problem bei der Multiplex-PCR wurde von MASIGA *et al.* (1992) ebenfalls in der mangelhaften Auftrennung mancher Amplifikationsprodukte bei der Elektrophorese gesehen. Die nicht eindeutig zuweisbaren Produkte wurden zur genauen Identifizierung mit spezifischen DNA-Sonden hybridisiert oder die Proben wurden erneut mit den einzelnen Primerpaaren analysiert. Bei diesen zwei experimentellen Studien wurde die Multiplex-PCR jeweils zur Analyse kleiner Probenzahlen eingesetzt; deshalb sind insgesamt nur begrenzte Vergleichsmöglichkeiten vorhanden. Einen breiten Einsatz der Multiplex-PCR zur Diagnose von Trypanosomeninfektionen gab es bislang nicht.

Ebenso, wie bei der Simplex-PCR lag die Nachweisgrenze für jedes Primerpaar bei 100 fg DNA/PCR-Ansatz - mit der Einschränkung, dass die DNA-Konzentrationen aller Trypanosomenspezies pro PCR-Ansatz dabei gleich sein mussten. Wurden den PCR-Ansätzen unterschiedliche DNA-Konzentrationen beigemischt, so wurde nur die DNA, die in einer höheren Konzentration vorhanden war, amplifiziert. Diese kompetitive Hemmung tritt bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der Targetsequenzen bei der Multiplex-PCR grundsätzlich auf. Sie kann durch verschiedene Maßnahmen, wie die Variation der Konzentrationsverhältnisse der Primerpaare, zwar minimiert aber nicht vollkommen beseitigt werden (HENEGARIU, 1997).

Mit der Multiplex-PCR wurden 53 Proben, welche zuvor mit der Simplex-PCR als Einfachinfektionen identifiziert worden waren, erneut analysiert - darunter zwei Infektionen mit *T. brucei*, 18 mit *T. vivax* und 33 mit *T. congolense savannah* (Kap. 4.7.1). Die Multiplex-PCR erzielte dabei eine vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Simplex-

PCR. Im Unterschied zur Simplex-PCR entstand bei der Multiplex-PCR bisweilen das oben genannte unspezifische Produkt von ca. 200 bp Länge. Durch die anschließende Hybridisierung der Amplifikationsprodukte mit den spezifischen DNA-Sonden wurden die Ergebnisse der Multiplex-PCR bestätigt. Das unspezifische Produkt erzeugte kein Hybridisierungssignal. Es konnte auf diese Weise sicher vom spezifischen Produkt von *T. brucei* abgegrenzt werden (Kap. 4.7.2).

Bei der Analyse der 32 mit der Simplex-PCR als Mischinfektionen identifizierten Proben mit der Multiplex-PCR waren wiederum alle Proben positiv. Im Unterschied zur Simplex-PCR wurden mit der Multiplex-PCR aber nur bei etwa der Hälfte der Proben (53,1%) ebenfalls Mischinfektionen identifiziert (Kap. 4.7.3). Auch hierbei entstand mehrfach das unspezifische Produkt von ca. 200 bp Länge. Die anschließende DNA-Sondenhybridisierung der Amplifikationsprodukte bestätigte exakt die PCR-Ergebnisse. Das unspezifische Produkt erzeugte wiederum kein Hybridisierungssignal (Kap. 4.7.4).

Nachdem alle mit der Simplex-PCR diagnostizierten Einfachinfektionen bei der Wiederholung mit der Multiplex-PCR bestätigt wurden und alle Mischinfektionen zumindest positiv reagierten, wird davon ausgegangen, dass die Sensitivität der Multiplex-PCR ausreichen würde, um bei einem breiteren Einsatz dasselbe Erregerspektrum zu identifizieren wie mit der Simplex-PCR. Das ist ferner wahrscheinlich, weil Einfachinfektionen bei Feldstudien generell überwiegen, während der Anteil der Mischinfektionen eher gering ist. Nach der Trypanozidbehandlung waren die Mischinfektionen bei dieser Untersuchung fast vollständig verschwunden. Für einen zukünftigen Einsatz bei Feldstudien sollte die Methode dennoch optimiert werden, um die Amplifikation unspezifischer DNA-Produkte zu vermeiden und die kompetitive Hemmung der Reaktion beim Vorliegen von Mischinfektionen zu minimieren.

## 5.7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Simplex-PCR in Verbindung mit der DNA-Sondenhybridisierung eine geeignete Methode für die Identifikation trypanozid-resistenter *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen bei natürlich infizierten Rindern mit einem kontrollierten Behandlungsregime ist. Die gegenüber dem direkten Erregernachweis höhere analytische Sensitivität der PCR führte bei den hier analysierten Proben zum Nachweis von 114% mehr PCR- als BCT-positiven Tieren 14 Tage nach der ISMM-Prophylaxe bzw. 320% mehr PCR- als BCT-positiven Tieren 14 Tage nach der zusätzlichen DIM-Behandlung.

Um einen erfolgreichen Nachweis trypanozidresistenter Trypanosomeninfektionen mit der Simplex-PCR zu gewährleisten, müssen allerdings folgende Bedingungen erfüllt sein:

Die Wahl der Primerpaare muss auf die regional vorkommenden Trypanosomenspezies abgestimmt sein. Die parasitologische Untersuchung kann hierfür als Entscheidungsbasis dienen. Mit der Bestätigung der parasitologisch positiven Tiere durch die PCR kann gleich-

zeitig die richtige Wahl der Primerpaare überprüft werden. Wie vorausgehende Feldstudien und die vorliegende Arbeit gezeigt haben, konnten stets >92% der parasitologisch positiven Tiere mit der PCR bestätigt werden (SOLANO *et al.*, 1999; CLAUSEN *et al.*, 1998, 2001).

Die korrekte Trypanozidbehandlung der Tiere muss sichergestellt sein, um ein Behandlungsversagen aufgrund von Anwendungsfehlern der Medikamente sicher ausschließen zu können (Kap. 2.6.1). Im Idealfall wäre die PCR mit dem ISMM-ELISA zu kombinieren. Damit könnten ISMM-resistente Trypanosomeninfektionen ohne die Garantie einer vorausgehenden korrekten Trypanozidbehandlung von einem Anwendungsfehler-bedingten oder durch Einkapselung des intramuskulären ISMM-Depots bedingten Behandlungsversagen abgegrenzt werden (Kap. 2.5.2). Diese Möglichkeit würde sich auch für den kombinierten Einsatz mit einem DIM-ELISA anbieten.

Die Bestätigung der PCR-Ergebnisse muss entweder im Doppelansatz oder durch DNA-Sondenhybridisierung der Amplifikationsprodukte erfolgen. Die letzte Möglichkeit bietet den Vorteil, dass die Sensitivität der PCR noch bis zu ca. 6 - 11% gesteigert werden kann (Kap. 4.4). Die Entwicklung einer PCR mit einer internen Funktionskontrolle zu diesem Zweck würde hingegen einen enormen zeitlichen und ökonomischen Vorteil mit sich bringen (EDINGLOH *et al.*, 1999).

Die Standardisierung der PCR-Protokolle (für ausgewählte Primerpaare) und ihre Evaluierung sollte angestrebt werden, um eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen Regionen zu ermöglichen. Diese Maßnahme müsste die Standardisierung und Evaluierung eines geeigneten Protokolls für die DNA-Extraktion einschließen.

Beim Nachweis von Behandlungsversagen von *T. brucei*-Infektionen mit der PCR müsste die Medikamentenempfindlichkeit im Tierversuch mit Mäusen überprüft werden. *T. brucei* hat die Tendenz, in das ZNS auszuwandern und kann auf diese Weise der Trypanozidwirkung entgehen, weil die Trypanozide für Rinder die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Die Eignung der PCR zur Überprüfung trypanozidresistenter *T. brucei*-Infektionen ist dadurch eingeschränkt.

Die Multiplex-PCR sollte optimiert werden, um die Amplifikation unspezifischer DNA-Produkte zu vermeiden und die kompetitive Hemmung der Reaktion beim Vorliegen von Mischinfektionen zu minimieren. Mit der Multiplex-PCR könnten die Materialkosten erheblich gesenkt und die Arbeitszeit bedeutend verkürzt werden.

Als weitere Methoden, mit denen die Feststellung von Trypanozidresistenzen durch Untersuchung eines größeren Probenumfangs natürlich infizierter Rinder möglich ist, stehen gegenwärtig der Single-dose Test für Mäuse (Kap. 2.7.1.2) und der ISMM-ELISA (Kap. 2.7.3) zur Verfügung (ICPTV, 2000).

Das vereinfachte standardisierte Versuchsprotokoll des Single-dose Test für Mäuse lässt im Vergleich zu den klassischen Versuchsprotokollen die schnellere Untersuchung einer größeren Anzahl von Trypanosomenisolaten zu. Es wurde für *T. congolense* und *T. brucei* zur Erhebung der Resistenzsituation in unterschiedlichen Regionen entwickelt (EISLER *et al.*, 2001). Für den Resistenznachweis von *T. brucei* ist er möglicherweise besser geeignet als die PCR, während er für *T. congolense* erheblich weniger sensitiv sein dürfte und für *T. vivax* nicht geeignet ist.

Der ISMM-ELISA wurde in Verbindung mit parasitologischen Diagnostikmethoden zum Nachweis von Resistenzen gegen ISMM vorgeschlagen (ICPTV, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die Resistenzen mit der parasitologischen Methode im Vergleich zur PCR mancherorts nicht erkannt wurden. Wie oben erwähnt, wäre der ISMM-ELISA in Verbindung mit der PCR ein idealer Nachweis. Der Nachteil der Methode besteht in ihrer bisherigen Beschränkung auf den Nachweis von ISMM-Resistenzen. Ähnliche Tests für DIM und Homidium müssen erst noch entwickelt werden.

Als potentielle zukünftige Nachweismethode für chemoresistente Trypanosomen wurde ferner der DIGIT (Kap. 2.7.1.3) aufgelistet (ICPTV, 2000). Diese Methode ist allerdings vom Vorhandensein einer Tsetsefliegenzucht abhängig. Ein großer Vorteil wäre jedoch ihre Eignung für alle Trypanosomenspezies. Über die Sensitivität der Methode bei Feldinfektionen ist noch nichts bekannt.

Allen genannten Methoden ist leider der Nachteil gemein, dass sie aufgrund ihrer relativ hohen Kosten in den betroffenen Ländern nur mit externer Hilfe - wie beispielsweise im Rahmen des hier vorgestellten BMZ-Projektes - oder im günstigsten Fall mit regierungsseitiger Unterstützung durchgeführt werden könnten.