

Aus dem Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**PCR UND DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG ZUR ÜBERPRÜFUNG
DES BEHANDLUNGSERFOLGES VON TRYPANOSOMEN-INFEKTIONEN BEI RINDERN
IN DER PROVINZ KÉNÉDOUGOU IN BURKINA FASO, WESTAFRIKA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Yvonne Gall
Tierärztin aus Heilbronn

Berlin 2002
Journal-Nr. 2659

Gedruckt mit der Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Mehlitz

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Staufenberg

Tag der Promotion: 06.12.2002

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	TRYPANOSOMOSEN DER NUTZTIERE IN AFRIKA	3
2.1.1	Allgemeines und Geschichtliches	3
2.1.2	Epidemiologie der Nagana	3
2.1.3	Ökonomische Auswirkungen der Nagana.....	4
2.2	DIE ERREGER	5
2.2.1	Morphologie der Trypanosomen.....	5
2.2.2	Taxonomie der Trypanosomen.....	6
2.2.3	Entwicklungszyklus der Trypanosomen.....	11
2.2.4	Genom der Trypanosomen.....	11
2.3	DIE VEKTOREN	13
2.3.1	Tsetsefliegen als Überträger der Nagana	13
2.4	DIAGNOSE	14
2.4.1	Parasitologische Untersuchung	14
2.4.1.1	Nativpräparat und gefärbter Blutausstrich	14
2.4.1.2	Hämatokrit-Zentrifugationstechnik (HCT)	15
2.4.1.3	Buffy-Coat Technik (BCT)	15
2.4.1.4	Miniatur-Anionenaustausch-Zentrifugations-Technik (m-AECT).....	15
2.4.1.5	Tierversuch	16
2.4.2	Immunologische Techniken.....	17
2.4.2.1	Antikörper-ELISA (Ak-ELISA).....	17
2.4.2.2	Antigen-ELISA (Ag-ELISA).....	18
2.4.3	Molekularbiologischer Nachweis	18
2.4.3.1	DNA-Sondenhybridisierung.....	18
2.4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.4.3.3	Kombination von PCR und DNA-Sondenhybridisierung	22
2.5	BEKÄMPFUNG DER TRYPANOSOMOSE – MÖGLICHKEITEN UND STRATEGIEN.....	23
2.5.1	Trypanotoleranz	23
2.5.2	Bekämpfung der Erreger	25
2.5.3	Bekämpfung der Vektoren.....	28
2.5.4	Integrierte Bekämpfung	29
2.6	CHEMORESISTENZ	30
2.6.1	Behandlungsversagen nach Chemotherapie.....	32
2.6.2	Angenommene Mechanismen der Chemoresistenz	33

2.6.3	Maßnahmen zur Vermeidung von Chemoresistenz	35
2.6.4	Maßnahmen bei Bestehen von Chemoresistenz	36
2.7	NACHWEIS DER CHEMORESISTENZ.....	37
2.7.1	Nachweis <i>in vivo</i>	37
2.7.1.1	Einsatz von Wiederkäuern	38
2.7.1.2	Einsatz von Mäusen.....	38
2.7.1.3	Einsatz von Tsetsefliegen (DIGIT).....	40
2.7.2	Nachweis <i>in vitro</i>	40
2.7.3	ISMM-ELISA	42
2.7.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.8	BURKINA FASO	45
2.8.1	Lage, Klima und Vegetation	45
2.8.2	Bedeutung der Rinderhaltung in Burkina Faso	47
2.8.3	Bedeutung der Trypanosomose für die Rinderproduktion.....	47
3	MATERIAL UND METHODEN.....	49
3.1	ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN.....	49
3.2	UNTERSUCHUNGSGEBIET	49
3.3	BESCHREIBUNG DES BMZ PROJEKTES.....	51
3.3.1	Ziele des BMZ-Projektes	51
3.3.2	Untersuchungsplan des BMZ-Projektes	52
3.3.3	Ergebnisse aus dem BMZ-Projekt.....	55
3.4	HERKUNFT DER BLUTPROBEN FÜR DIE PCR.....	58
3.5	AUSWAHL DER PROBEN FÜR DIE PCR	59
3.5.1	Simplex-PCR und DNA-Sondenhybridisierung	59
3.5.2	Multiplex-PCR und DNA-Sondenhybridisierung.....	61
3.6	BLUTPROBEN AUS EINEM NICHT-ENDEMIEGEBIET.....	62
3.7	TRYPANOSOMENREFERENZSTÄMME	63
3.8	UNTERSUCHUNGSMETHODEN	64
3.8.1	Gewinnung der <i>T. vivax</i> -Positivkontrolle.....	64
3.8.1.1	Versuchstiere	64
3.8.1.2	Parasitologische Untersuchung.....	64
3.8.1.3	Vermehrung von <i>T. vivax</i> in Mäusen	65
3.8.1.4	Isolierung der Trypanosomen aus Mäuseblut.....	65
3.8.2	Gewinnung der <i>T. brucei</i> - und <i>T. congolense</i> savannah-Positivkontrollen.....	66

3.8.3	DNA-Extraktion	67
3.8.3.1	DNA-Extraktion der Trypanosomen-Referenzstämme.....	67
3.8.3.2	DNA-Extraktion der Blutproben	68
3.8.4	PCR	68
3.8.4.1	Simplex-PCR / Herstellung des PCR-Ansatzes	68
3.8.4.2	Multiplex-PCR	69
3.8.4.3	Kontrollen bei der Durchführung der PCR	71
3.8.4.4	Überprüfung der analytischen Spezifität der PCR	71
3.8.4.5	Überprüfung der analytischen Sensitivität der PCR.....	71
3.8.4.6	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen.....	72
3.8.4.7	Nachweis der PCR-Produkte	72
3.8.4.8	Auswertung der PCR-Ergebnisse.....	73
3.8.4.9	Präparative PCR zur Gewinnung der spezifischen DNA-Sonden	73
3.8.5	DNA-Sondenhybridisierung	75
3.8.5.1	Aufreinigung der Sonden-DNA	75
3.8.5.2	Messung der DNA-Konzentration.....	75
3.8.5.3	Markierung der DNA-Sonden	76
3.8.5.4	Vorbereitung der Slot-Blot-Apparatur und Blotting.....	76
3.8.5.5	Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion.....	77
3.8.5.6	Filmbelichtung und -entwicklung	78
3.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	78
4	ERGEBNISSE.....	80
4.1	ANALYTISCHE SPEZIFITÄT DER PCR.....	80
4.2	ANALYTISCHE SENSITIVITÄT DER PCR.....	82
4.3	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR	84
4.3.1	Betrachtung der gesamten PCR-Stichprobe.....	84
4.3.1.1	Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung	84
4.3.1.2	Schätzung der PCR-Prävalenz.....	85
4.3.1.3	Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung	86
4.3.1.4	Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung	88
4.3.1.5	Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung.....	88
4.3.2	Betrachtung der Ergebnisse auf Dorfebene.....	89
4.3.2.1	Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung	89
4.3.2.2	Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung	90
4.3.2.3	Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung	91
4.3.2.4	Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung.....	92

4.3.3	Verteilung der Trypanosomenspezies	94
4.3.3.1	Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung	94
4.3.3.2	Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung	97
4.3.3.3	Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung	97
4.3.3.4	Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Trypanozidbehandlung	97
4.3.4	Übereinstimmung in der Speziesdiagnostik	98
4.4	DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG DER PCR-PRODUKTE	100
4.4.1	Proben von Rindern vor der ISMM-Behandlung	100
4.4.2	Proben von Rindern 14 Tage nach der ISMM-Behandlung	100
4.4.3	Proben von Rindern 14 Tage nach der DIM-Behandlung	100
4.5	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR MIT DER INOKULATION VON MÄUSEN	101
4.6	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR ANHAND WEITERER PARAMETER	105
4.6.1	Betrachtung der mittleren Hämatokritwerte	105
4.6.2	Betrachtung der Rasseverteilung	108
4.6.3	Betrachtung der Altersgruppen	109
4.6.4	Betrachtung der Geschlechtsverteilung	110
4.7	ERGEBNISSE DER MULTIPLEX-PCR UND DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG	111
4.7.1	Proben mit Einfachinfektionen	111
4.7.2	DNA-Sondenhybridisierung der PCR-Produkte	113
4.7.3	Proben mit Mischinfektionen	114
4.7.4	DNA-Sondenhybridisierung der PCR-Produkte	116
5	DISKUSSION	117
5.1	ANALYTISCHE SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT DER SIMPLEX-PCR	117
5.2	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR	118
5.2.1	Besprechung der Ergebnisse der gesamten Stichprobe	118
5.2.2	Besprechung der Ergebnisse auf Dorfebene	125
5.2.3	Besprechung der Ergebnisse der Speziesdiagnostik	127
5.3	ERGEBNISSE DER DNA-SONDENHYBRIDISIERUNG	129
5.4	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR MIT DER MÄUSEINOKULATION	130
5.5	VERGLEICH VON BCT UND SIMPLEX-PCR ANHAND WEITERER PARAMETER	131
5.5.1	Mittlerer Hämatokrit	131
5.5.2	Einfluss der Rasse	133
5.5.3	Einfluss des Alters	134
5.5.4	Einfluss des Geschlechtes	135

5.6	VOR- UND NACHTEILE DER MULTIPLEX-PCR	136
5.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	138
6	ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY - RESUME.....	141
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	147
8	ANHANG	171
8.1	VERWENDETES ARBEITSMATERIAL	171
8.1.1	Primer	171
8.1.2	Kommerziell erhältliche Test-„Kits“	174
8.1.3	Chemikalien, Reagentien und Enzyme.....	174
8.1.4	Rezepte der Puffer und Lösungen.....	175
8.1.4.1	DNA-Extraktion nach Higuchi.....	175
8.1.4.2	PCR	176
8.1.4.3	Elektrophorese.....	176
8.1.4.4	Blotting.....	177
8.1.4.5	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	177
8.1.4.6	Trypanosomenanzucht und -isolierung aus Mäuseblut.....	178
8.1.5	Geräte	179
8.1.6	Laborkleinmaterial und Verbrauchsmaterial.....	180
	DANKSAGUNG	182
	CURRICULUM VITAE.....	183
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	184

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Mehltz ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die kritische, wie konstruktive Durchsicht der Arbeit bedanken. Mein ganz besonderer großer Dank gilt Herrn Dr. P.-H. Clausen für die jederzeit und vierlerorts gewährte engagierte Beratung, viele anregende Gespräche und die wertvolle Hilfestellung und Unterstützung sowohl bei der Einführung in das Thema, als auch während der Durchführung der Arbeit und beim Abfassen und der Durchsicht des Manuskripts.

Für die Unterstützung bei der Datenauswertung stets in Verbindung mit geduldigen Erklärungen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. M. Greiner. Mein Dank gilt ferner Frau Dr. G. Arndt für ihre kompetente Beratung.

Ein ganz, ganz dickes Dankeschön möchte ich Frau A. Wiemann aussprechen, die mich nicht nur ins PCR-Labor einweihte, sondern mir allzeit aufmunternd mit Rat und Tat zur Seite stand und die moralische Unterstützung nie vermissen ließ. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn U. Tietjen für die Einführung in die parasitologische Trypanosomendiagnostik und die Hilfestellung bei der Mäuseinokulation bedanken.

Herrn Dr. S.M. Touré, dem Direktor des CIRDES in Bobo Dioulasso, danke ich für die freundliche Aufnahme und die uneingeschränkte Nutzungsmöglichkeit der Laborräume am CIRDES. Für die Starthilfe in Bobo und die weitere Unterstützung, die mir zur erfolgreichen Durchführung der Arbeiten verhalf, möchte ich Herrn Dr. B. Bauer, Herrn Dr. I. Sidibé, Herrn L. Djiry und meiner Kollegin Frau T. Woitag herzlich danken.

Allen anderen Kollegen und dem technischen Personal des CIRDES möchte ich mich außerdem für das gute Arbeitsklima im Labor und die vielfältig gewährte Hilfe bei allen technischen und erdenklichen anderen Schwierigkeiten bedanken.

Meinen Kollegen in Berlin sowie allen Mitarbeitern des Instituts danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit, die stets freundlich gewährte Hilfestellung und die nette Atmosphäre - sowohl während, als auch außerhalb der Arbeitszeiten.

Frau Dr. S. Wagner und Frau Dr. M. Rinder möchte ich ein ganz großes Dankeschön für die Durchsicht der Arbeit aussprechen.

Und schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre dauerhafte Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichte, ganz herzlich bedanken.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit mit einem Promotionsstipendium. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau D. Spoden für ihre freundliche Betreuung während des Stipendiums. Dem BMZ sei außerdem für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Kéné Dougou und der Sachmittel für diese Arbeit gedankt.

CURRICULUM VITAE

Name:	Yvonne Gall
Geburtsdatum:	12.08.1969
Geburtsort:	Heilbronn a. N.
Schulbildung:	Grundschule in Wildberg von 1975 - 1979 Andrae-Gymnasium in Herrenberg von 1979 - 1988
Berufsausbildung:	Praktikum und Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Schwarzwald-Tierklinik in Neubulach von 1988 - 1991
Praktikum vor Studienbeginn:	Praktikum in der Werbeagentur Daub in Stuttgart während der ersten Jahreshälfte 1992
Studium:	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin: 1992 - 1998
Tag der Approbation:	17.07.1998
Promotion:	Seit Juli 1998 als Doktorandin am Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität, Berlin
Stipendium:	Durchführung der praktischen Arbeiten für die Dissertation am CIRDES (Centre International de Recherche-Developement pour l'Eleavage en Zone Subhumide) in Bobo Dioulasso, Burkina Faso, von April 1999 bis September 2000 mit Hilfe eines Promotionsstipendiums des DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst)
Berufsausübung:	Vom 15.09.2001 bis 15.02.2001 als angestellte Tierärztin beim Veterinäramt Donaueschingen im Schwarzwald-Baar-Kreis Seit dem 15.05.2002 als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, München

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die erwähnten Hilfsmittel verwendet habe.