

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 TRYPANOSOMEN DER NUTZTIERE IN AFRIKA

#### 2.1.1 Allgemeines und Geschichtliches

Trypanosomen sind durch einzellige Blutparasiten des Genus *Trypanosoma* hervorgerufene Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier. In Afrika kommt eine Vielzahl pathogener Trypanosomenspezies verbreitet vor. Darunter befinden sich die Erreger der Schlafkrankheit und der Nagana der Nutztiere, welche von der Tsetsefliege übertragen werden. Etwa 50 Millionen Menschen (KUZOE, 1991) und 50 Millionen Rinder (FAO, 1994) stehen in den subhumiden und humiden Zonen Afrikas unter Infektionsrisiko. Die Trypanosomose gehört in den Endemiegebieten zu den schwerwiegendsten Hindernissen für die landwirtschaftliche Entwicklung.

Die Wortschöpfung „*Trypanosoma*“ wurde schon im Jahre 1843 durch den Ungarn Gruby zur Namensgebung von Hämoflagellaten bei Fröschen ins Leben gerufen; die pathogene Wirkung von Trypanosomen wurde jedoch erst 37 Jahre später (1880) erkannt. Griffith Evans identifizierte in Indien Trypanosomen als Verursacher der Surra bei Pferden und Kamelen (HOARE, 1972). Diese Entdeckung wurde zugleich der Ausgangspunkt aller nachfolgenden Forschungsarbeiten über Trypanosomen als Auslöser einer Reihe von Erkrankungen bei Mensch und Tier.

Die wohl wichtigste Entdeckung diesbezüglich wird David Bruce zugeschrieben, der in den Jahren 1894 - 1897 bewies, dass die in Südafrika verbreitete Nagana der Rinder durch Trypanosomen verursacht wird. Er demonstrierte darüber hinaus die Übertragung der Krankheit durch die Tsetsefliege (HOARE, 1972). Von Dutton wurden 1902 in Westafrika schließlich auch im menschlichen Organismus Trypanosomen als Verursacher der Schlafkrankheit entdeckt (HOARE, 1972).

#### 2.1.2 Epidemiologie der Nagana

Die durch Tsetsefliegen zyklisch übertragenen Trypanosomen der Nutztiere in Afrika sind allgemein als „Nagana“ bekannt. Dieser Name stammt ursprünglich von den Zulu Südafrikas, die schon vor der Aufklärung ihrer Ätiologie die Krankheit bei Rindern so bezeichneten (COOK, 1994).

Wildtiere, welche die natürlichen Wirte der Trypanosomen repräsentieren, bleiben für gewöhnlich symptomlos. Sie stellen für die domestizierten Nutztiere, welche bei Exposition hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten aufweisen, ein immenses Erregerreservoir dar. Bei den Hauswiederkäuern kommen akute, subakute und chronische Verlaufsformen vor. Die chronische Verlaufsform überwiegt in Endemiegebieten bei weitem und stellt als solche ein

Herdenproblem dar, welches sich in einer schlechten allgemeinen Kondition des gesamten Bestandes äußert. Anämien, Gewichtsverluste und zunehmende Schwäche, sowie Aborte und Fertilitätseinschränkungen prägen dabei das klinische Bild (SCHILLINGER, 1985; CONNOR, 1994).

Die Endemiegebiete werden von den Schnittflächen der Nutztierhaltungsgebiete mit den Habitaten der Tsetsefliegen repräsentiert, die sich auf einer Gesamtfläche von ca. 10 Millionen km<sup>2</sup> in 36 südlich der Sahara gelegenen afrikanischen Ländern erstrecken.

In diesen Gebieten ist die Nagana bis heute eine der verlustreichsten Erkrankungen für Nutztiere. Von den 50 Millionen Rindern, die dort dem Risiko der Trypanosomose ausgesetzt sind, befinden sich nur 10 Millionen inmitten des Verbreitungsgebietes der Tsetsefliege, während sich der Rest auf dessen Peripherie verteilt. Der größte Teil des insgesamt 165 Millionen Tiere umfassenden Rinderbestandes südlich der Sahara befindet sich jedoch in Gebieten gänzlich außerhalb der Tsetsehabitats (FAO, 1994). Diese werden zu einem großen Teil von der Sahelzone gebildet, wo die riesigen Viehbestände durch Überweidung zur Bodenerosion und Desertifikation beitragen (NEHR, 1991).

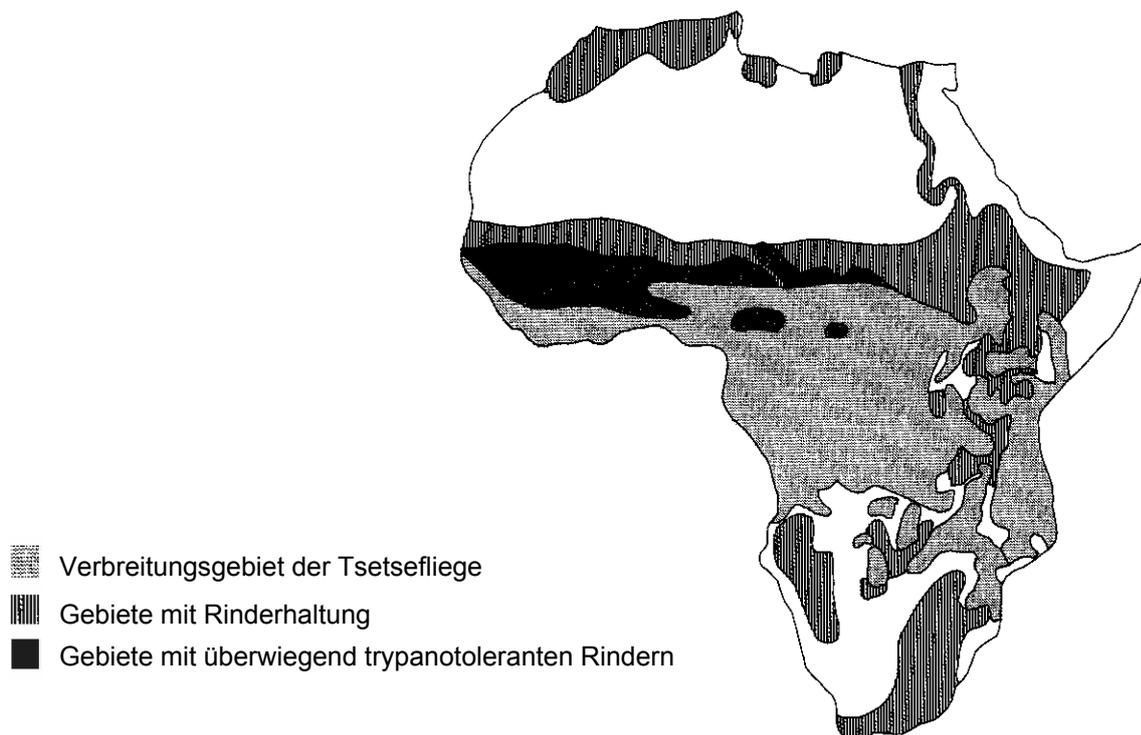


Abb. 2.1: Verbreitung der Tsetsefliege und Gebiete mit Rinderhaltung nach R. J. CONNOR, 1994

### 2.1.3 Ökonomische Auswirkungen der Nagana

Aufgrund seiner demographischen Entwicklung ist der afrikanische Kontinent mit der Notwendigkeit, einen schnell wachsenden Bedarf an landwirtschaftlichen Produkten decken zu müssen, konfrontiert. Gerade die Landstriche mit dem größten Potential zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität werden durch Einschränkungen oder gänzliche

Unmöglichkeit der Nutztierhaltung aufgrund der Nagana in ihrer Entwicklung gehemmt. Gegenwärtig werden hier schätzungsweise 35 Millionen Dosen Trypanozide jährlich bei Nutztieren angewandt (GEERTS & HOLMES, 1998).

Studien über die ökonomischen Auswirkungen der Trypanosomose auf die Tierproduktion in Afrika zeigten, dass in Rinderbeständen mit Vorkommen von Trypanosomose die Kalberaten bei trypanotoleranten Rinderrassen um 1 - 12% und bei empfänglichen Rassen um 11 - 20% reduziert sind. Die Kälbersterblichkeit ist bei trypanotoleranten Rassen um bis zu 10% und bei empfänglichen Rassen um 10 - 20% erhöht (SWALLOW, 1997). Bei empfänglichen Tieren wurden darüber hinaus dramatisch erhöhte Abortraten und lange Zwischenkalbezeiten festgestellt (D'ETEREN *et al.*, 1998). Die Milchproduktion ist im Schnitt um schätzungsweise 10 - 40% reduziert, während insgesamt etwa 5 - 30% weniger Rinder produziert werden (SWALLOW, 1997).

Etwa 80% der Zugkraft ist in der afrikanischen Landwirtschaft nicht mechanisiert. Die geschätzte Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität einer Familie im Besitz von Zugtieren beträgt ungefähr das 10-fache dessen, was allein durch Handarbeit erwirtschaftet werden kann (FAO, 1994). Die Arbeitsleistung der Zugtiere in den Herden, welche unter Trypanosomoserisiko stehen, ist um schätzungsweise 33% reduziert (SWALLOW, 1997). Werden die potentiellen Einbußen der Tierproduktion und der Ernteerträge zu den eingangs erwähnten (Kap. 1) direkten Verlusten addiert, entstehen geschätzte jährliche Verluste von 4 Billionen US\$ oder das Äquivalent eines Viertels der gesamten Tierproduktion im betroffenen Gebiet (FAO, 1994). Es ist absehbar, dass mit einem weiteren Anschwellen der Bevölkerung diese Verluste noch steigen werden. Die jährliche Wachstumsrate der Bevölkerung liegt in vielen afrikanischen Ländern höher, als das jährliche Wirtschaftswachstum. In den westafrikanischen Mitgliedstaaten der Franc-Zone nahm die Bevölkerung zwischen 1980 und 1994 beispielsweise um jährlich ca. 3% zu, während das Wirtschaftswachstum bei ca. 2% lag (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1995).

## **2.2 DIE ERREGER**

### **2.2.1 Morphologie der Trypanosomen**

Grundsätzlich sind alle Trypanosomen dem gemeinsamen Bauprinzip der Einzeller entsprechend von einer einfachen Zellmembran begrenzt, worunter sich ein stabiles Cytoskelett befindet. Eine Geißel ist allen Trypanosomenarten zueigen und zugleich für ihre Einordnung zu den Flagellaten verantwortlich. Sie entspringt dem sogenannten Basalapparat, durch welchen sie im Cytoplasma verankert ist. Mit der Zelloberfläche ist sie durch wenige Haftpunkte verbunden, wodurch lichtmikroskopisch der Anschein einer undulierenden Membran erweckt wird. Dem Basalkörper benachbart liegt der Kinetoplast, welcher das Hauptmerkmal der Vertreter der Ordnung Kinetoplastida ist. Er stellt das

Äquivalent des einzigen Mitochondrions im einzelligen Organismus dar. Ein oxydativer Stoffwechsel findet allerdings nur im Insektenvektor statt, wobei die Aminosäure Prolin den Hauptenergieträger darstellt. Die Blutstromformen dagegen gewinnen ihre Energie aus Glucose, welche anaerob bis zum Pyruvat abgebaut wird (MEHLHORN & PIEKARSKI, 1995). Die Blutstadien der Trypanosomen sind auf der Außenfläche der Zellmembran mit dem 10 - 15 nm dicken sogenannten „Surface Coat“ ausgestattet - einem Mantel aus Glykoproteinen, deren Typ häufig nach Zellteilung wechselt und welche deshalb als „Variant Surface Glycoproteins“ (VSG) bezeichnet werden. Abgesehen von den zahlreichen variablen Antigentypen, welche ein einzelner Parasit ausprägen kann, setzt sich jede Trypanosomenspezies aus einer unbekanntenen Zahl unterschiedlicher sogenannter Serodeme zusammen, welche jeweils ein unterschiedliches Repertoire von variablen Antigentypen (VATs) beherbergen (VICKERMANN & LUCKINS, 1969; VICKERMANN, 1985). Der Eigenschaft der Antigenvarianz sind die zahlreichen bis heute erfolglosen Versuche einer Vakzineentwicklung gegen die Trypanosomen zu verdanken. Sie bestimmt ebenfalls die charakteristischen Serien intermittierender Parasitämien im akut kranken Wirtstier, die von entsprechenden Fieberphasen begleitet werden.

## 2.2.2 Taxonomie der Trypanosomen

Einen kurzen Überblick über die Einordnung der Trypanosomen in das Tierreich bzw. das Unterreich der Einzeller gibt der Auszug aus der Systematik der Parasiten nach MEHLHORN & PIEKARSKI (1995) (Abb. 2.2).

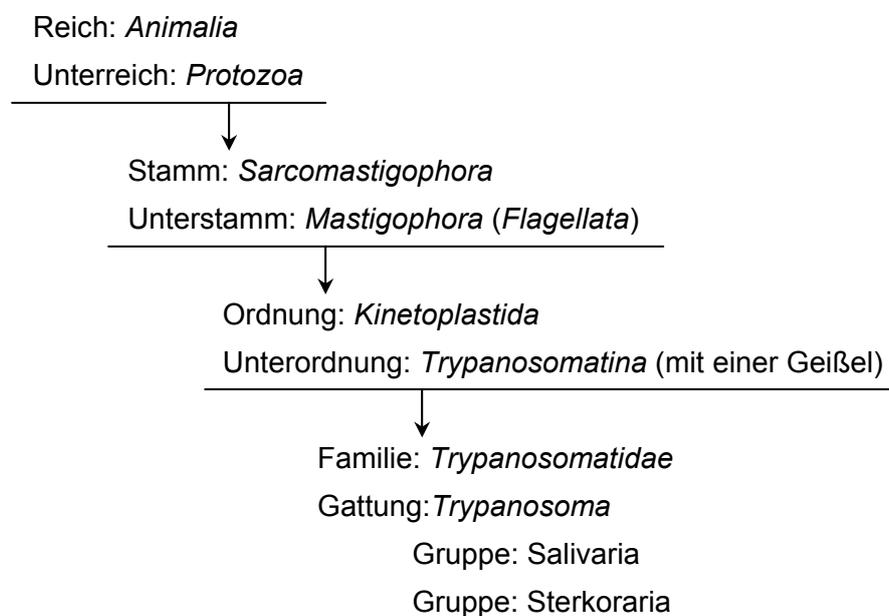


Abb. 2.2: Auszug aus der Systematik der Parasiten nach MEHLHORN & PIEKARSKI (1995)

Die Gattung *Trypanosoma* wurde nach ihrem Übertragungsmodus in zwei Gruppen, die Sterkoraria und die Salivaria, unterteilt (HOARE, 1972). Die Sterkoria vollenden ihren Lebenszyklus im Enddarm des Arthropodenvektors, von wo aus sie mit dem Kot auf den Säugetierwirt übertragen werden. Das Eindringen der Parasiten in den Wirtsorganismus erfolgt über Haut- oder Schleimhautläsionen. Unter den Sterkoraria befindet sich der Erreger der in Mittel- und Südamerika verbreiteten Chagas-Krankheit des Menschen, *T. cruzi*. Für den afrikanischen Kontinent hat die Gruppe der Sterkoraria keine Bedeutung.

Alle in Afrika verbreiteten tier- oder humanpathogenen Trypanosomenarten fallen unter die Gruppe der Salivaria (Abb. 2.3). Die Erreger der Nagana werden dabei drei verschiedenen Untergattungen zugeordnet, die sich aufgrund von Unterschieden in der Morphologie und im Bewegungsmuster differenzieren lassen (Tab. 2.1).

Gattung: *Trypanosoma* Gruby, 1843

Gruppe: Salivaria

Untergattung:

*Nannomonas* Hoare, 1964

Spezies: ***T. congolense* Broden, 1904**  
*T. simiae* Bruce, 1912  
*T. godfrey* (Erstbeschreibung durch MCNAMARA *et al.*, 1994)

*Duttonella* Chalmers, 1918

Spezies: ***T. vivax* Ziemann, 1905**

*Trypanozoon* Lühe, 1906

Spezies: *T. evansi* Steel, 1885

***T. brucei***

Subspezies: ***T. brucei brucei* Plimmer & Bradford, 1899**

*T. brucei gambiense* Dutton, 1902

*T. brucei rhodesiense* Stephens & Fantham, 1910

*T. equiperdum* Doflein, 1901

*Pycnomonas* Hoare, 1964

Spezies: *T. suis* Ochmann, 1905

Abb. 2.3: Auszug aus der Systematik der Trypanosomen nach HOARE (1972); die Erreger der Nagana sind fettgedruckt

Tab. 2.1: Differenzierung der Naganaerreger aufgrund morphologischer Merkmale und aufgrund ihres Bewegungsmusters

<b>Spezies</b>	<b><i>T. congolense</i></b>	<b><i>T. vivax</i></b>	<b><i>T. brucei</i></b>
Form und Größe	Monomorph 8 - 20 µm Kleinste Spezies	Monomorph 20 - 26 µm Erweitertes Hinterende	Polymorph, Schlanke Formen: 23 - 30 µm (mit spitz zulaufendem Ende), Kurzformen: 17 - 22 µm, Zwischenformen: 20 - 25 µm
Geißel	Ende der Geißel nicht frei	Ende der Geißel lang und frei	Langes, freies Ende bei schlanken Formen; Kein freies Ende bei Kurzformen
Undulierende Membran	Unscheinbar	Schwach entwickelt	Deutlich sichtbar
Kinetoplast	Subterminal, marginal	Groß, terminal	Subterminal, kleiner im Vergleich zu <i>T. vivax</i> und <i>T. congolense</i>
Bewegungsmuster	Lebhafte Bewegungen auf der Stelle, oft an Blutzellen angeheftet	Rasche Vorwärtsbewegung zwischen den Erythrozyten	Lebhafte Bewegungen auf der Stelle

Das Subgenus *Nannomonas* beinhaltet die drei Spezies *T. congolense*, *T. simiae* und *T. godfreyi*, die alle auf die Tsetsefliege zur Vollendung ihres Entwicklungszyklus angewiesen sind (Kap. 2.2.3). Während *T. congolense* den wichtigsten Naganaerreger darstellt, ist *T. simiae* nur für Schweine pathogen. Die beiden Spezies sind sich morphologisch sehr ähnlich und wurden lange Zeit aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathogenität für Schweine unterschieden (MAJIWA, 1989; MCNAMARA *et al.*, 1989). Die ebenfalls für Schweine pathogene Spezies *T. godfreyi* wurde erst 1994 beschrieben (MCNAMARA *et al.*, 1994; MASIGA *et al.*, 1996).

Seit den achziger Jahren wurden mehr und mehr biochemische und molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung von Trypanosomen eingesetzt. Bei einer Untersuchung des Isoenzym-Profiles zahlreicher *T. congolense*-Isolate aus West- und Zentralafrika wurden aufgrund von Isoenzym-Unterschieden intraspeziespezifische Variationen bei dieser Spezies postuliert (YOUNG & GODFREY, 1983; GASHUMBA, 1986, GASHUMBA *et al.*, 1988).

Dabei wurde eine Einteilung in zwei *T. congolense*-Subtypen, den Savannah-Typ und den Forest-Typ vorgenommen. Mit der Entwicklung speziesspezifischer DNA-Sonden aus repetitiven Trypanosomen-DNA-Sequenzen wurden diese Subtypen bestätigt. Inzwischen wurden spezifische DNA-Sonden für vier *T. congolense*-Subtypen beschrieben. Die bislang bekannten Subtypen von *T. congolense* wurden als *T. congolense savannah*, *T. congolense forest*, *T. congolense Kilifi* und *T. congolense Tsavo* bezeichnet (MAJIWA *et al.*, 1986, 1993; GIBSON *et al.*, 1988; KNOWLES *et al.*, 1988, MCNAMARA *et al.*, 1994). Der Savannah-Typ ist dabei überwiegend in den Savannenzonen Ost- und Westafrikas, der Forest-Typ mehr in den humiden bewaldeten Landstrichen des Kontinents verbreitet. Der Kilifi-Typ wurde ursprünglich an der Ostküste Kenias identifiziert, später aber auch in Uganda gefunden; der Tsavo-Typ stammt ebenfalls aus Kenia. Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass sich die Subtypen von *T. congolense* in ihrer Pathogenität in Mäusen unterscheiden (BENGALY *et al.*, 2002).

Der zur Untergattung *Duttonella* gehörende Naganaerreger *T. vivax* ist außer in Afrika auch in Südamerika verbreitet. Diese Spezies wird sowohl zyklisch von der Tsetsefliege (Kap. 2.2.3), als auch mechanisch von Tabaniden und anderen Stechfliegen übertragen. Während in Südamerika ausschließlich die mechanische Übertragung vorkommt, hat in Afrika fast ausnahmslos die zyklische Übertragung Relevanz.

Die Untergattung *Trypanozoon* umfasst die meisten Spezies. Darunter befindet sich der Erreger der Dourine oder Beschälseuche der Equiden, *T. equiperdum*, welcher venerisch verbreitet wird und der Erreger der Surra, *T. evansi*, der ausschließlich mechanisch durch hämatophage Dipteren übertragen wird (MULLIGAN, 1970; HOARE, 1972). Die Verbreitungsgebiete von *T. equiperdum* und *T. evansi* beschränken sich nicht auf den afrikanischen Kontinent.

Die Spezies *T. brucei* kommt dagegen ausschließlich in Afrika vor und ist ganz auf die zyklische Übertragung mit der Tsetsefliege angewiesen (Kap. 2.2.3). Sie enthält die humanpathogenen Subspezies *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense*, die sich morphologisch weder voneinander, noch vom Naganaerreger *T. brucei brucei* unterscheiden. Für die Differenzierung der human- und tierpathogenen Subspezies wurde deshalb der sogenannte Blut-Inkubations-Infektivitäts-Test (BIIT) entwickelt, mit dem sie aufgrund ihres Verhaltens gegenüber Humanserum (resistent oder sensibel) recht zuverlässig identifiziert werden können (RICKMAN & ROBSON, 1970). Weil Rinder ein wichtiges Erregerreservoir für die Rhodesiense-Schlafkrankheit bilden können, ist diese Abgrenzung besonders wichtig. Als Naganaerreger stellt *T. brucei brucei* die am wenigsten pathogene Subspezies für Rinder dar. Im Folgenden wird sie der Einfachheit halber nur noch als *T. brucei* bezeichnet, wenn von der Nagana gesprochen wird.

Abb. 2. 4: Polymorphe Blutstromformen von *Trypanosoma brucei*\*

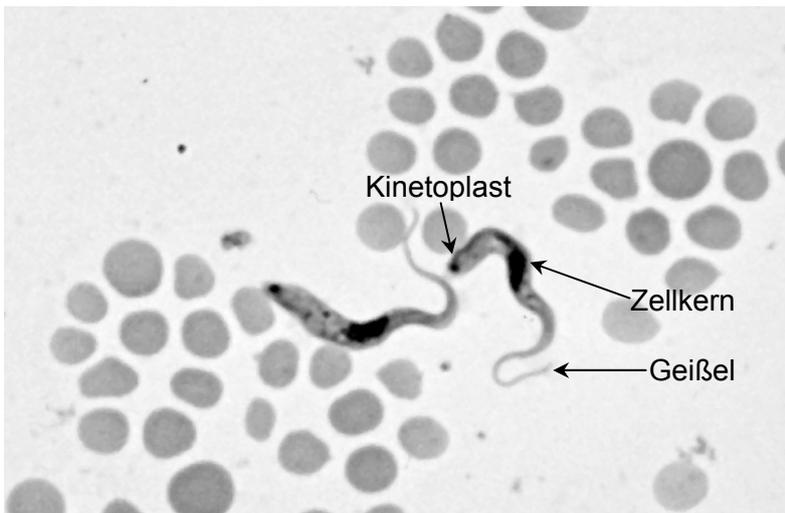
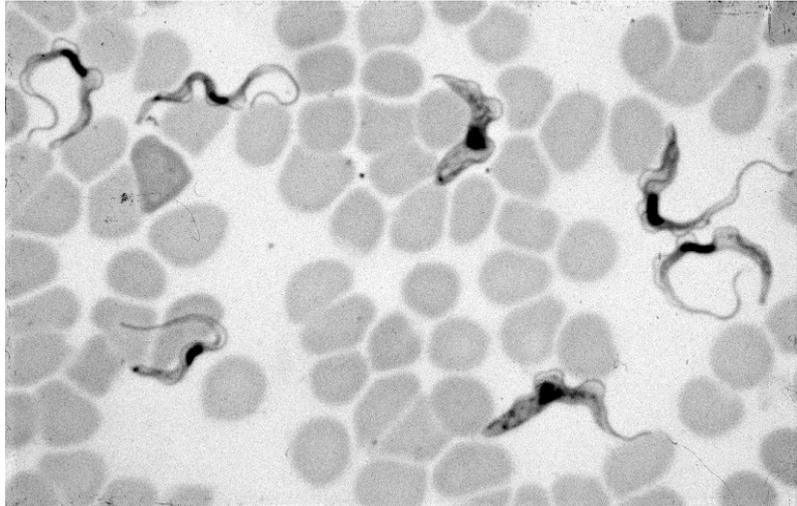
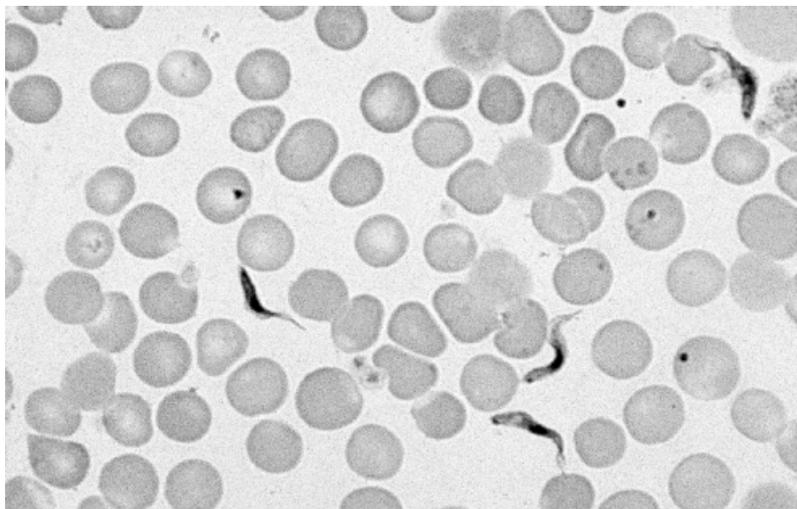


Abb. 2. 5: Blutstromformen von *Trypanosoma vivax* \*

Abb. 2. 6: Blutstromformen von *Trypanosoma congolense*\*



\*Die Abbildungen. 2.4 - 2.6 stammen aus dem Archiv des Instituts für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit

### 2.2.3 Entwicklungszyklus der Trypanosomen

Die Entwicklungszyklen der Naganaerreger in der Tsetsefliege verlaufen an sich untereinander ähnlich: Die infektiösen trypomastigoten Blutstromformen werden bei der Blutmahlzeit von Tsetsefliegen aufgenommen. *T. brucei* und *T. congolense* gelangen mit dem Blut in den Mitteldarm der Tsetsefliege. Von dort aus wandern die Parasiten in den endoperitrophischen Raum aus, wo sie sich unter Verlust des „Surface coat“ in nicht-infektiöse prozyklische Formen transformieren. Nach einer Phase der Vermehrung durch binäre Teilung treten sie in den ektoperitrophischen Raum über, von wo aus sie über den Proventrikulus und Ösophagus in den Mundbereich gelangen. Die prozyklischen Formen von *T. brucei* wandern bis in die Speicheldrüsen, wo sie sich zu Epimastigoten umwandeln und anheften, um sich hiernach in metazyklische infektiöse Formen zu transformieren. *T. congolense* vollzieht den Gestaltwandel zur metazyklischen infektiösen Form im Labrum im Mundbereich der Tsetsefliege.

Bei *T. vivax* ist der gesamte Entwicklungszyklus auf das Labrum beschränkt und benötigt mit 5 - 13 Tagen die kürzeste Zeitspanne (GARDINER, 1989). *T. brucei* und *T. congolense* benötigen zur Vollendung ihres Zyklus 17 - 45 Tage bzw. 7 - 40 Tage (NANTULYA *et al.*, 1978; CONNOR, 1994).

Die infektiösen metazyklischen Formen werden mit dem Stich der Tsetsefliege auf das Wirtstier übertragen, wobei sich an der Einstichstelle eine ödematöse Schwellung bilden kann. In diesem sogenannten Schanker findet innerhalb der ersten 10 - 12 Tage p.i. eine erste Vermehrung der Erreger statt, bevor sie via Lymphstrom in den Blutkreislauf gelangen (AKOL & MURRAY, 1982; SCHILLINGER, 1985). Im Blut sind die ersten Trypanosomen 13 - 16 Tage nach dem Stich der infizierten Tsetsefliege nachweisbar (CONNOR, 1994). Dort vermehren sie sich wiederum durch binäre Teilung.

Bei den Blutstromformen findet ebenfalls ein Formenwandel der vermehrungsfähigen für Tsetsefliegen nicht infektiösen in nicht vermehrungsfähige infektiöse Stadien statt (VICKERMANN, 1985). Dieser Formenwandel ist bei *T. brucei* zugleich mit einer Veränderung der Gestalt von schlanken über intermediäre zu gedrungenen Formen verbunden.

### 2.2.4 Genom der Trypanosomen

Das Genom der Trypanosomen setzt sich aus einem diploiden nukleären Genom und einem mitochondrialen oder kinetoplastischen Genom (kDNA) zusammen.

#### Nukleäre DNA

Weil die Chromosomen der Trypanosomen während des Zellzyklus nicht kondensieren, ist ihre lichtmikroskopische Charakterisierung unmöglich (VICKERMANN & PRESTON, 1970; MYLER, 1993). Die Karyotypisierung gelang erst mit der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese, wobei

die Chromosomen in einem periodisch richtungswechselnden elektrischen Feld aufgetrennt werden (SCHWARTZ & CANTOR, 1984). Danach lassen sich drei Kategorien von Chromosomen aus linearer DNA unterscheiden:

1. Minichromosomen mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 150 Kilobasen (kb), wovon im Genom der afrikanischen Trypanosomen eine variable Anzahl vorhanden ist (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984). Während die Arten der Untergattung *Trypanozoon* und *T. congolense* ca. 100 - 120 Minichromosomen enthalten, ist bei *T. vivax* gar keines vorhanden (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984, GIBSON & BORST, 1986). Sie dienen als potentielles Reservoir für VSG codierende Gene. Abgesehen davon ist ihre Funktion unbekannt.
2. Intermediäre Chromosomen mit einem Molekulargewicht zwischen 150 und 700 kb, wovon im Trypanosomengenom ebenfalls eine variable Anzahl vorkommt. Dabei kommen auch innerhalb einer Spezies erhebliche Variationen vor (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984). Die Funktion der intermediären Chromosomen ist weitgehend unbekannt.
3. Große Chromosomen, wovon im Genom von *T. brucei* etwa 16 - 20 in Form homologer Paare existieren, mit einem Molekulargewicht von etwa 0,7 - 6 Mb (GOTTESDIENER *et al.*, 1990). Die großen Chromosomen enthalten die sogenannten „House keeping genes“.

#### Kinetoplasten-DNA

Die DNA des Kinetoplasten entspricht der mitochondrialen DNA. Sie beinhaltet 10 - 20% der gesamten Trypanosomen-DNA (MYLER, 1993) und setzt sich aus zwei Typen zirkulärer DNA-Moleküle zusammen:

1. „DNA-Maxicircles“ mit einem Molekulargewicht zwischen 20 - 40 kb, wovon etwa 50 Kopien vorhanden sind. Die Maxicircles enthalten eine Reihe von Genen, welche auch im mitochondrialen Genom anderer Organismen vorkommen und für verschiedene rRNA-Moleküle und Enzyme der Atmungskette codieren.
2. „DNA-Minicircles“ mit einem Molekulargewicht zwischen 0,5 und 2,5 kb, wovon 5000 - 10.000 Kopien enthalten sind. Während die Größe der Minicircles zwischen den Spezies variiert, ist sie innerhalb einer Spezies konstant (MYLER, 1993). Die Minicircles enthalten Gene, welche für die gRNA (guideRNA) codieren, die für das Editieren von rRNA der Maxicircles benötigt werden. Sie bestehen jeweils aus einer größeren nicht konservierten und einer kleinen konservierten Region, welche bei allen Minicircles einer Spezies gleich ist. Diese variiert wiederum in Größe und Anzahl der vorhandenen Kopien zwischen den verschiedenen Spezies.

## 2.3 DIE VEKTOREN

### 2.3.1 Tsetsefliegen als Überträger der Nagana

Tsetsefliegen sind obligat hämatophage Dipteren des Genus *Glossina*, deren Vorkommen gänzlich auf den afrikanischen Kontinent beschränkt ist. Ihren morphologischen Merkmalen und Habitatpräferenzen entsprechend wurden die 22 Tsetsefliegenarten, welche 33 Unterarten beinhalten, in drei Gruppen unterteilt:

1. Die Fusca-Gruppe (Subgenus *Austenina*), deren Vorkommen auf den Regenwald beschränkt ist.
2. Die Palpalis-Gruppe (Subgenus *Nemorhina*), deren Vertreter im Regenwald und in Galeriewäldern entlang von Flussläufen verbreitet sind.
3. Die Morsitans-Gruppe (Subgenus *Glossina*), deren Vertreter in der Baumsavanne zu finden sind, wo sie in der Regenzeit weit verbreitet vorkommen, während sie sich in der Trockenzeit in die Nähe permanenter Wasserläufe zurückziehen.

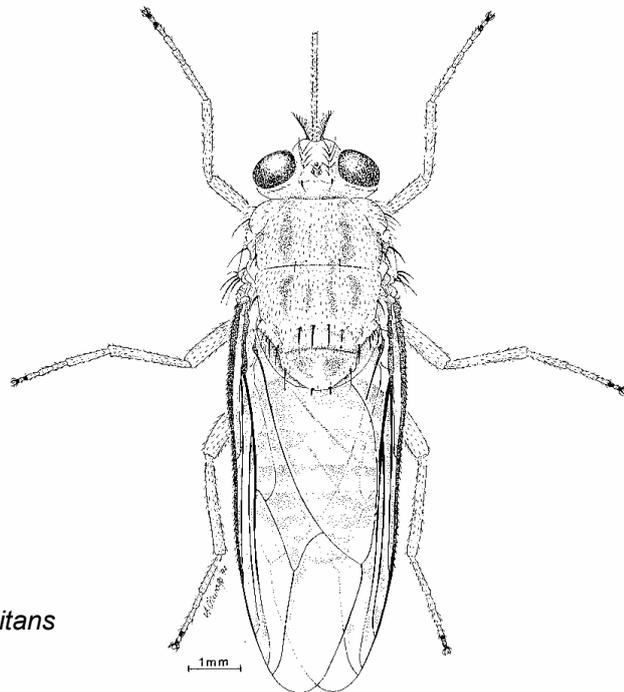


Abb. 2. 7: Dorsale Ansicht von *Glossina morsitans*

Die Vermehrungsrate der larviparen Tsetsefliegen ist insgesamt gering. Die teneralen Fliegen werden i.d.R. kurz nach dem Schlupf noch vor Aufnahme der ersten Blutmahlzeit einmalig begattet (WHO, 1988). Eine weibliche Fliege produziert etwa alle zehn Tage eine Larve, welche sich nach einem 25 - 60 Tage dauernden Nymphenstadium zum Imago entwickelt. Der Entwicklungszyklus variiert dabei in Abhängigkeit von der Temperatur. Die durchschnittliche Lebensdauer unterliegt ebenfalls saisonalen und speziesbedingten Schwankungen mit einem Maximum während der Regenzeit und einem Minimum während der heißen Trockenzeit. Bei weiblichen Fliegen liegt sie zwischen 50 und 160 Tagen und bei männlichen Fliegen zwischen 29 und 48 Tagen (WHO, 1988). Einmal mit Trypanosomen

infiziert, bleiben Tsetsefliegen ihr Leben lang Überträger. Die Vektorkapazität der Tsetsefliegen hängt dabei im wesentlichen von drei Faktoren ab (CHALLIER, 1973b):

1. Der Fähigkeit, sich bei einer Blutmahlzeit an einem Wirtstier zu infizieren.
2. Der Fähigkeit, eine Infektion zu entwickeln.
3. Der Fähigkeit, die infektiösen Trypanosomen auf ein Wirtstier zu übertragen.

Ferner bestehen Unterschiede zwischen den verschiedenen Glossinenspezies hinsichtlich ihrer Vektorkapazität.

## **2.4 DIAGNOSE**

Die sensitive und spezifische Diagnostik von Trypanosomeninfektionen ist eine Voraussetzung für den Erfolg von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen bei Mensch und Tier. Das gilt gleichermaßen für die Durchführung von epidemiologischen Studien sowie großflächig geplanten Kontrollprogrammen inklusive ihrer anschließenden Überwachung.

Der Nachweis von Trypanosomen im Blut oder Liquor cerebrospinalis (bei der Schlafkrankheit) des Wirtes erfolgt entweder durch den direkten Erregernachweis mit parasitologischen Techniken oder mittels indirekten immunologischen oder molekularbiologischen Methoden (Nachweis von Trypanosomenantigenen bzw. Wirtstierantikörpern oder Trypanosomen-DNA). Der Erregernachweis in Tsetsefliegen erfolgt ebenfalls entweder direkt nach Dissektion der Fliegen durch Mikroskopie der Fliegenorgane (Mitteldarm, Speicheldrüsen und Proboscis) (MULLIGAN, 1970) oder indirekt mittels DNA-Techniken.

### **2.4.1 Parasitologische Untersuchung**

#### **2.4.1.1 Nativpräparat und gefärbter Blutaussstrich**

In Nativpräparaten und luftgetrockneten Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen (8 x Okular; 40 x Objektiv) gelingt der Nachweis nur bei hohen Erregerkonzentrationen von mindestens  $10^4$  Trypanosomen/ml Blut (WHO, 1986). Dadurch ist die Nachweismöglichkeit auf Wirtstiere mit hochgradiger Parasitämie beschränkt.

Die in Endemiegebieten überwiegend vorkommenden chronischen Infektionen gehen jedoch zumeist mit niedrigen Parasitämien der Wirtstiere einher. Mit der Entwicklung verschiedener Anreicherungsverfahren für Trypanosomen wurden hierbei bedeutende Fortschritte in der Diagnostik erzielt.

### 2.4.1.2 Hämatokrit-Zentrifugationstechnik (HCT)

Die Hämatokrit-Zentrifugationstechnik ist ein von WOO (1969) entwickeltes Anreicherungsverfahren, welches später von WALKER (1972) und MEHLITZ (1978) verbessert wurde. Das zu untersuchende Blut (ca. 30 µl) wird dabei in zu einem Drittel mit Walker-Lösung gefüllte Hämatokritkapillaren gesaugt und anschließend zentrifugiert (Kap. 3.8.1.2). Dabei findet eine Anreicherung der Parasiten an der Grenze zwischen Plasma- und Blutzellschicht am oberen Rand des Buffy-coat statt. In diesem Bereich werden die Kapillaren unter dem Mikroskop nach Trypanosomen durchmustert.

Diese Vorgehensweise ermöglicht eine im Vergleich zum Nativpräparat viel sensitivere Diagnose von Trypanosomen im Blut, wobei die Nachweisgrenze bei ca.  $5 \times 10^2$  Trypanosomen/ml Blut liegt (WOO, 1971; PARIS *et al.*, 1982; WHO, 1986). WOO (1970) wies mit der HCT Infektionen mit *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* in künstlich infizierten Rindern sechs bis zehn Tage vor ihrem ersten Erscheinen im Nativpräparat nach.

### 2.4.1.3 Buffy-Coat Technik (BCT)

Bei der Buffy-coat Technik nach MURRAY *et al.* (1977) werden die Trypanosomen wie bei der HCT durch Zentrifugation des Blutes in Hämatokritkapillaren am oberen Rand des Buffy-coat konzentriert. Im Gegensatz zur HCT werden die Kapillaren im Anschluss an die Zentrifugation etwa 1 mm unterhalb des Buffy-coat im oberen Bereich der Erythrozytensäule geschnitten und der gesamte Buffy-coat inklusive des Plasmas auf Objektträger gebracht (MURRAY *et al.*, 1977). Nach dem Vermischen des Buffy-coat mit dem Plasma und dem Abdecken des Präparates wird es im Dunkelfeld mikroskopisch untersucht. Die Betrachtung im Dunkelfeld bewirkt eine bessere Sichtbarmachung der Zellen und Parasiten durch Fluoreszenz. MURRAY *et al.* (1977) fanden mit dieser Methode im Vergleich zum dicken Blutfilm 50% mehr positive Fälle. Aufgrund der guten mikroskopischen Beurteilungsmöglichkeit der Morphologie und Motilität der Trypanosomen kann die Speziesdiagnostik außerdem mit relativ hoher Genauigkeit durchgeführt werden.

### 2.4.1.4 Miniatur-Anionenaustausch-Zentrifugations-Technik (m-AECT)

Die Miniatur-Anionenaustausch-Zentrifugations-Technik (m-AECT) wurde von LANHAM & GODFREY (1970) entwickelt und später mehrfach modifiziert (MEHLITZ, 1978; LUMSDEN *et al.* 1979; SACHS, 1984).

Das Prinzip der Technik basiert auf der Trennung der Trypanosomen von den korpuskulären Blutbestandteilen mit Hilfe einer Anionenaustauschsäule aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenladungen von Trypanosomen und Blutkörperchen (LANHAM & GODFREY, 1970; LANHAM *et al.*, 1972) (Kap. 3.8.1.4). Wegen ihrer guten Eignung zur Diagnose von *T. brucei*

wird die Methode insbesondere zum Nachweis der menschlichen Schlafkrankheit angewendet (LUMSDEN *et al.*, 1979, GASHUMBA *et al.*, 1983). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 Trypanosomen/ml Blut (KANMOGNE *et al.*, 1996; WHO, 1986).

Von MEHLITZ (1986) wurde die Überlegenheit der m-AECT im Vergleich zur HCT beim Nachweis von mit *T. brucei* infizierten Blutproben von Schweinen und Wildtieren in Westafrika demonstriert. Dabei wurden mit der HCT 53,8% und mit der m-AECT 74% der Infektionen nachgewiesen. Der im Rahmen dieser Studie ebenfalls durchgeführte Tierversuch war mit 95,4% am empfindlichsten.

#### **2.4.1.5 Tierversuch**

Der Tierversuch stellt eine weitere Möglichkeit der Parasitenanreicherung dar. Die Trypanosomen vermehren sich nach der Inokulation von infektiösem Blut in empfänglichen Labornagern. Theoretisch wäre also ein lebender Trypanosom für den Nachweis ausreichend. Die Methode ist für den Nachweis von *T. brucei* geeignet, weil die Infektion von Labornagern (insb. Vielzitzenmäuse, *Mastomys natalensis*) mit dieser Trypanosomenspezies im allgemeinen gut gelingt (MEHLITZ, 1978). Für *T. congolense* und *T. vivax* trifft dies nicht zu: Nur ein Teil der Infektionen mit *T. congolense* geht in Labornagern an; die Infektion mit *T. vivax* gelingt in der Regel nicht (PARIS *et al.*, 1982).

Demzufolge wird bei der Inokulation von Feldisolaten in Labornager das Wachstum bestimmter Trypanosomenspezies aufgrund der Wirtstierpräferenz entweder begünstigt oder unterdrückt. Darüber hinaus wachsen bestimmte Populationen innerhalb einer Trypanosomenspezies aufgrund ihrer unterschiedlichen Virulenz selektiv. Aufgrund dieser unerwünschten Selektion bestimmter Trypanosomenpopulationen im Versuchstier ist das Untersuchungsergebnis aus der Inokulation möglicherweise nicht repräsentativ für die Ausgangspopulationen im Wirtstier.

In einer Studie von NYEKO *et al.* (1990) wurden bei 47 Trypanosomenisolaten, die entsprechend den Ergebnissen der DNA-Sondenhybridisierung überwiegend von Rindern und Tsetsefliegen mit Mischinfektionen stammten, nach der Inokulation in Labornager ausschließlich Einfachinfektionen diagnostiziert. Die Isolate waren dabei einmalig oder öfter in Mäusen oder Ratten passagiert worden. Durch mehrfache Passagen von Trypanosomenisolaten in Labornagern wird die Homogenität von Trypanosomenisolaten noch gefördert.

## 2.4.2 Immunologische Techniken

Hierunter fallen die Techniken, womit spezifische Antikörper der Wirtstiere gegen Trypanosomenantigene (IFAT, Ak-ELISA) oder Trypanosomenantigene *per se* (Ag-ELISA) nachgewiesen werden. Vorteilhaft bei diesen Methoden ist die Möglichkeit, eine große Probenzahl gleichzeitig, schnell und vergleichsweise kostengünstig analysieren zu können.

### 2.4.2.1 Antikörper-ELISA (Ak-ELISA)

Beim Ak-ELISA werden erregerspezifische Antikörper an auf Mikrotiterplatten immobilisiertes standardisiertes Antigen gebunden. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mit einem enzymmarkierten tierartsspezifischen Immunglobulin-Antiserum (Konjugat) nachgewiesen. Die Intensität der Enzymreaktion verläuft in einem bestimmten Bereich linear zur Menge der gebildeten Immunkomplexe. In diesem Bereich wird die Enzymreaktion-vermittelte Farbveränderung photometrisch bestimmt (STAAK *et al.*, 2000).

Von LUCKINS wurde 1977 ein Ak-ELISA zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* beschrieben. Aufgrund von interspezifischen Kreuzreaktionen lässt der Test keine sichere Speziesdifferenzierung zu. Laut einem Vergleich standardisierter Ak-ELISAs für *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* sind die homologen Reaktionen allerdings stärker als die heterologen. Eine bessere Identifikation der Trypanosomenspezies kann unter Berücksichtigung des Reaktionsausmaßes erreicht werden (DESQUESNES *et al.*, 2001).

Generell sind mit dem Ak-ELISA aktuelle von überstandenen Infektionen nicht unterscheidbar, weil die erregerspezifischen Antikörper nach überstandenen Infektionen noch einige Monate im Blut des Wirtstieres persistieren (WILSON, 1991; MATTIOLI *et al.*, 2001). Der Test kann demnach nur eine allgemeine Auskunft über die Prävalenz in der jeweiligen Untersuchungsherde oder über das Trypanosomoserisiko im jeweiligen Untersuchungsgebiet geben. Aussagen über den aktuellen Infektionsstatus von Einzeltieren sind damit nicht möglich.

Der Ak-ELISA hat sich bei seroepidemiologischen Untersuchungen bewährt (LUCKINS & MEHLITZ, 1978). Zwischen den BCT-Ergebnissen und den Ergebnissen verschiedener ELISA-Systeme wurde eine positive Korrelation festgestellt (JONGEJAN *et al.*, 1988). In der Regel liegen die Seroprävalenzen erheblich höher als die parasitologisch ermittelten Prävalenzen.

Im Rahmen eines internationalen koordinierten Forschungsprogrammes (FAO/IAEA), 1995 - 2000, wurden vier standardisierte Ak-ELISAs in 15 diagnostischen Labors in Afrika und Europa mit zufriedenstellender Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität getestet (REBESKI *et al.*, 2000, REBESKI *et al.*, 2001). EISLER *et al.* (2000) wiesen in diesem Zusammenhang ebenfalls auf den Nutzen des Ak-ELISA bei epidemiologischen Erhebungen sowie beim Monitoring von Kontrollprogrammen hin.

### **2.4.2.2 Antigen-ELISA (Ag-ELISA)**

Der Antigen-ELISA funktioniert dem Prinzip nach wie der Ak-ELISA. Im Unterschied dazu werden beim Ag-ELISA Anti-Trypanosomen-Antikörper an Mikrotiterplatten gebunden, womit dann Trypanosomenantigene im Serum nachgewiesen werden können. Verschiedene Tests zur Diagnose von *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* wurden entwickelt und getestet (NANTULYA *et al.*, 1987; NANTULYA und LINDQUIST, 1989; NANTULYA *et al.*, 1992). Sie basieren auf monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Trypanosomenantigene dieser drei Spezies. Ihr erfolgreicher Einsatz bei unterschiedlichen experimentellen (MASAKE *et al.*, 1995) und epidemiologischen Studien wurde von mehreren Autoren beschrieben (NANTULYA *et al.*, 1992; TRAIL *et al.*, 1992; BENGALY *et al.*, 1995).

Im Gegensatz dazu ergab eine Untersuchung von REBESKI *et al.* (1999), dass der Ag-ELISA ungeeignet zum zuverlässigen Antigen-Nachweis sei. Im Rahmen des oben genannten FAO/IAEA- Forschungsprogrammes wurden ebenfalls die Ag-ELISAs für *T. vivax* und *T. congolense* getestet und aufgrund des hohen Anteils falsch negativer sowie falsch positiver Proben als unzuverlässig eingestuft. Nach erfolglosen Bemühungen den Test zu verbessern, wurde er aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse bezüglich seiner Spezifität und Sensitivität abgelehnt und der Ak-ELISA für künftige Untersuchungen empfohlen (EISLER *et al.*, 1998; EISLER *et al.* 2000; REBESKI *et al.*, 2000).

### **2.4.3 Molekularbiologischer Nachweis**

Die Entwicklung der rekombinanten DNA Techniken eröffnete seit den 80er Jahren neue Wege bei der Identifizierung und Charakterisierung von Trypanosomen. Mittels DNA-Sonden wurde eine exakte Speziesdiagnostik - bei *T. congolense* bis zur Ebene von Subtypen - möglich (Kap. 2.2.2). Auf diese Weise konnte erstmalig auch eine exakte Speziesdifferenzierung bei Untersuchungsmaterial von Tsetsefliegen stattfinden (KUKLA *et al.*, 1987; GIBSON *et al.*, 1988; MCNAMARA *et al.*, 1989; MAJIWA 1989). Vorteilhaft ist - wie bei der ELISA-Technik - die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben gleichzeitig analysieren zu können. Die Früherkennung von Trypanosomeninfektionen wurde durch die PCR aufgrund ihrer höheren analytischen Sensitivität weiter verbessert.

#### **2.4.3.1 DNA-Sondenhybridisierung**

Der Trypanosomennachweis erfolgt bei dieser Methode durch die Hybridisierung spezifischer DNA-Sonden an eine bestimmte Zielsequenz auf der Parasiten-DNA. Der Nachweis der Hybridisierung wird durch ein an die DNA-Sonden gekoppeltes Markersystem vermittelt.

Die zu untersuchenden Proben werden an eine feste Phase (z. B. eine Nylonmembran) immobilisiert und denaturiert; die DNA-Sonden werden mit einem Marker versehen. Die

früher gebräuchlichen radioaktiven Markersysteme für Sonden wurden inzwischen weitgehend durch nicht-radioaktive Systeme ersetzt. Der Gebrauch ersterer bedingt stets räumliche Restriktionen und macht besondere Sicherheitsmaßnahmen erforderlich (WILSON, 1991). Die gegenwärtig meistverwendeten nicht-radioaktiven Markersysteme beinhalten ein Hapten (i.d.R. Biotin oder Digoxigenin), welches an die Sonde gebunden wird. Die Detektion der Sondenhybridisierung erfolgt durch die Bindung eines enzymgekoppelten Proteins oder Antikörpers (Avidin/Streptavidin bzw. Anti-Digoxigenin-AK) an das Hapten der Sonde bzw. durch die anschließende Reaktion des gekoppelten Enzyms mit einem geeigneten Substrat (WILSON, 1991). Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase und die Alkalische Phosphatase, welche in Abhängigkeit vom zugesetzten Substrat mit Chemilumineszenz oder einem Farbumschlag reagieren. Während von den chromogenen Substraten eine geringere Sensitivität gegenüber den radioaktiven Systemen berichtet wurde, wird sie von den Chemilumineszenz-Bildnern erreicht oder sogar übertroffen (WILSON, 1991).

Die DNA-Sonden zum Nachweis von Trypanosomen wurden nach dem Restriktionsenzymverdau gereinigter totaler Trypanosomen-DNA mit nachfolgendem Southern Blot unter den entstandenen DNA-Stücken identifiziert (OLE-MOIYOI, 1987). Durch die Auswahl von vielfach im Parasitengenom vorhandenen Zielsequenzen kann die diagnostische Sensitivität der Methode gesteigert werden. Repetitive DNA-Sequenzen im Genom von Trypanosomen der Salivaria-Gruppe wurden von SLOOF *et al.* (1983), MASSAMBA & WILLIAMS (1984), KIMMEL *et al.* (1987), KUKLA *et al.* (1987), OLE-MOIYOI (1987), DICKIN & GIBSON (1989) und ARTAMA *et al.* (1992) beschrieben. Individuelle repetitive Sequenzen können 1 - 10% der totalen genomischen DNA bei Parasiten ausmachen (WILSON, 1991). Sie sind bei den Trypanosomen überwiegend auf den Minichromosomen lokalisiert (GIBSON *et al.*, 1988). Nach SLOOF (1983) beträgt der Anteil repetitiver Sequenzen 12% in der nukleären DNA bei *T. brucei* und 9% bei *T. cruzi*.

Die Nachweisgrenze von Trypanosomen mit radioaktiven DNA-Sonden liegt zwischen 10 Trypanosomen/Spot (KUKLA *et al.*, 1987) und 100 Trypanosomen/Spot ( $\cong$  10 pg DNA) (GIBSON *et al.* 1988; MASIGA *et al.* 1992).

MASSAMBA & WILLIAMS (1984) beschrieben erstmals einen Test zur Unterscheidung von *T. brucei* von anderen Trypanosomenspezies mit DNA-Sonden aus cDNA, genomischer DNA und Restriktionsfragmenten genomischer DNA. KUKLA *et al.* (1987) wendeten die Technik zum Nachweis von *T. brucei*, *T. vivax* und zweier *T. congolense* Subtypen in experimentell infizierten Tsetsefliegen an. Die Klassifikation von Trypanosomen im Vektor basierte vor der Entwicklung der DNA-Techniken auf der traditionellen parasitologischen Methode. Dabei gilt die unterschiedliche Lokalisation der Trypanosomen in den Fliegenorganen als Entscheidungskriterium (MULLIGAN, 1970; HOARE, 1972). Neben der relativ hohen Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Speziesdifferenzierung ist die Erkennung von

Mischinfektionen mit dieser Methode nicht möglich. NYEKO *et al.* (1990), MORLAIS *et al.* (1998), MAJIWA & OTIENO (1990) und MCNAMARA *et al.* (1989) setzten erfolgreich DNA-Sonden zur Identifizierung von Mischinfektionen bei Tsetsefliegen ein.

Die Erkennung von Mischinfektionen im Blut von Säugetierwirten gestaltet sich mit parasitologischen Methoden ähnlich schwierig, wie bei Tsetsefliegen: Die charakteristisch fluktuierenden Parasitämien führen hierbei zur Diagnose der zum Zeitpunkt der Blutentnahme am höchsten konzentrierten Trypanosomenspezies, während die in der niedrigen Phase der Parasitämiewelle befindlichen Spezies meistens unerkannt bleiben. NYEKO *et al.* (1990) wiesen mit speziesspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden Mischinfektionen bei natürlich infizierten Rindern in Uganda nach, welche mit der HCT überwiegend als Einfachinfektionen eingestuft worden waren.

Über den Einsatz von DNA-Sonden zur Diagnose von natürlich infizierten Nutztieren existieren ansonsten kaum Berichte. Nach der Einführung der PCR in die Trypanosomen-diagnostik wurden DNA-Sonden jedoch mehrfach zur Verifizierung der PCR-Produkte und zur Steigerung der Sensitivität der PCR eingesetzt (Kap. 2.4.3.3).

#### **2.4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der PCR werden bestimmte DNA-Fragmente von üblicherweise ca. 100 - 400 bp mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Primern und einer thermostabilen DNA Polymerase aus einer unspezifischen Masse an DNA (oder RNA) *in vitro* amplifiziert. Die Primer, welche aus einer definierten Sequenz von ca. 20 - 40 bp Länge bestehen, binden spezifisch an ihre komplementäre Sequenz auf der Ziel-DNA. Sie bilden jeweils den Ausgangspunkt für die Verlängerung des DNA-Fragmentes durch die Polymerase. Die Fähigkeit zur exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz macht die PCR zu einer herausragend sensitiven und spezifischen Diagnostikmethode. Beim Trypanosomennachweis dienen in der Regel multipel repetitive Sequenzen der nukleären Trypanosomen-DNA als Zielsequenz (MOSER *et al.*, 1989; MASIGA *et al.*, 1992, 1996; MAJIWA *et al.*, 1994; MASAKE *et al.*, 1997).

Bislang wurden Primerpaare für den Nachweis der Trypanosomen der *Trypanozoon*-Gruppe (MOSER *et al.* 1989) sowie für den Nachweis von *T. brucei rhodesiense* (WELBURN *et al.*, 2001; RADWANSKA *et al.*, 2001), *T. vivax* (MASAKE *et al.*, 1997; CLAUSEN *et al.*, 1998), *T. simiae* (MAJIWA & OTIENO, 1990; MAJIWA *et al.*, 1993), *T. congolense savannah* (MOSER *et al.*, 1989), *T. congolense forest* (MASIGA *et al.*, 1992), *T. congolense Kilifi* (MASIGA *et al.*, 1992), *T. congolense Tsavo* (MAJIWA *et al.*, 1993) und *T. godfreyi* (MASIGA *et al.*, 1996) entwickelt.

Die human- und tierpathogenen Spezies der *Trypanozoon*-Gruppe (*T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* bzw. *T. brucei brucei*, *T. evansi* und *T. equiperdum*) konnten mit den verfügbaren Primern lange Zeit nicht voneinander unterschieden werden. Kürzlich

stellten WELBURN *et al.* (2001) und Radwanska *et al.* (2001) Primerpaare (entwickelt aus dem Humanserumresistenz-assoziierten Gen) zum spezifischen Nachweis von *T. brucei rhodesiense* vor.

Innerhalb der *Nannomonas*-Gruppe können drei anerkannte Spezies (*T. simiae*, *T. congolense* und *T. godfreyi*) mit unterschiedlichen spezifischen Primern differenziert werden. Bei *T. congolense* selbst ist die Unterscheidung von bislang vier Subtypen (Savannah, forest, Kenya Coast/Kilifi und Tsavo) möglich bzw. diagnostisch erforderlich.

Beim Test der analytischen Spezifität der PCR mit den beschriebenen Primerpaaren beobachtete keiner der Untersucher unspezifische Reaktionen. Als Nachweisgrenze wurde für die meisten Primerpaare zwischen 0,1 - 0,01 pg Trypanosomen-DNA/PCR-Ansatz angegeben (MOSER *et al.*, 1989; KATAKURA *et al.*, 1997; MASIGA *et al.*, 1992). CLAUSEN *et al.* (1999) konnten noch 1 fg gereinigter DNA von *T. brucei* nachweisen. Die PCR übertrifft damit die analytische Sensitivität der DNA-Sondenhybridisierung um den Faktor 10 - 100 (Kap. 2.4.3.1).

Bei einem Methodenvergleich zwischen PCR, BCT und Ag-ELISA mit Blutproben künstlich mit *T. vivax* infizierter Rinder reagierten im Verlauf der Untersuchungen insgesamt 75% der Blutproben positiv mit der PCR, während die Ergebnisse des Ag-ELISA und der BCT mit 55% bzw. 42% positiven Proben deutlich darunter lagen (MASAKE *et al.*, 1997).

Versuche mit künstlich infizierten Tieren wurden auch zur Bestimmung des frühest möglichen Diagnosezeitpunktes mit der PCR (MOSER *et al.*, 1989; CLAUSEN *et al.*, 1999) und zur Bestimmung der Verbleibdauer der Trypanosomen-DNA im Wirtstierblut nach der Therapie mit Trypanoziden durchgeführt. MOSER *et al.* (1989) konnten in einem Experiment mit Mäusen (Infektion mit jeweils 1500 *T. b. gambiense*) Trypanosomen-DNA frühestens zwei Tage p.i. und dann bis zum sechsten Tag in Folge nachweisen. Der parasitologische Nachweis (wet smear) gelang dagegen nur einmalig am vierten Tag nach der Inokulation. Weitere Versuche mit höheren Infektionsdosen bei Mäusen erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Mit der parasitologischen Technik waren die Parasiten meistens nur auf der Höhe des Parasitämie-Peaks nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Intensität der Banden bei der PCR am stärksten. Bei künstlich mit *T. brucei* infizierten Rindern wurden bereits am ersten Tag p.i. PCR-Signale sichtbar, während der Nachweis mit der HCT und m-AECT nicht vor dem fünften Tag p.i. gelang (CLAUSEN *et al.*, 1999).

MASIGA *et al.* (1992) testeten die PCR an künstlich infizierten Fliegen. *T. brucei*, *T. vivax* und *T. congolense* savannah waren dabei in Speicheldrüsen-, Proboscis- und Mitteldarmproben der Fliegen nachweisbar. Bei diesen Experimenten wurde auch die Kombination der Primerpaare für *T. vivax* und *T. congolense* savannah in einem gemeinsamen Reaktionsansatz (Multiplex-PCR) zum Nachweis von Mischinfektionen erfolgreich getestet. MAJIWA *et al.* (1994) führten eine Multiplex-PCR mit fünf Primerpaaren pro Reaktionsansatz mit bekannten Proben von Mischinfektionen bei Tsetsefliegen durch. Bei jeder Reaktion wurden die

erwarteten DNA-Fragmente synthetisiert, deren Identität mit spezifischen DNA-Sonden bestätigt wurde.

Ein weiteres Bestreben, die arbeits- und kostenintensive Probenanalyse durch mehrere PCR-Läufe mit verschiedenen Primerpaaren zu vermeiden, führte zur Entwicklung der sogenannten „Pan-Tryp-Primer“. Sie sollen die gleichzeitige Diagnose und Differenzierung aller bekannten pathogenen Trypanosomenspezies ermöglichen. Die Primer (KIN 1/2) amplifizieren eine *Kinetoplastida*-spezifische Zielsequenz - den „Internal transcribed spacer 1“, welcher auf der rDNA lokalisiert ist (DESQUESNES *et al.*, 2001). Tatsächlich gelang mit diesem Primerpaar der Nachweis aller pathogenen Trypanosomenspezies. Insgesamt ist die Sensitivität gegenüber der Simplex-PCR mit „klassischen“ Primerpaaren aber herabgesetzt; insbesondere der Nachweis von *T. vivax* gelingt schlechter.

Epidemiologische Studien mit Einsatz der PCR wurden bereits in mehreren afrikanischen Ländern, darunter Burkina Faso (REIFENBERG *et al.*, 1997; LEFRANCOIS *et al.*, 1998, 1999; DE LA ROCQUE, S. *et al.*, 1998; SOLANO *et al.*, 1995, 1996, 1999), die Côte d'Ivoire (MC NAMARA *et al.*, 1995), Kamerun (KANMOGNE *et al.*, 1996; MORLAIS *et al.*, 1998), Uganda und Kenia (MAJIWA *et al.*, 1994) und Tansania (MUGITTU *et al.*, 2001) durchgeführt. Die PCR erbrachte bei Verdachtsfällen von Nagana bei parasitologisch negativen, aber Ag-ELISA-positiven Rindern in Uganda und Kenia (MAJIWA *et al.*, 1994) sowie bei Verdachtsfällen von Schlafkrankheit bei parasitologisch negativen, aber im CATT-Test positiven Menschen in Kamerun (KANMOGNE *et al.*, 1996) und bei Verdachtsfällen von Beschälseuche bei parasitologisch negativen, aber Ak-ELISA-positiven Pferden in Äthiopien (CLAUSEN *et al.*, 1999) den sicheren Nachweis von Trypanosomeninfektionen.

#### **2.4.3.3 Kombination von PCR und DNA-Sondenhybridisierung**

Die Kombination von PCR und DNA-Sondenhybridisierung in der Diagnostik stellt eine sinnvolle Ergänzung der beiden Methoden dar. Die PCR wird als sensitivere Methode zur Probenanalyse eingesetzt, während die Identität der PCR-Produkte durch nachfolgende Hybridisierung mit speziesspezifischen DNA-Sonden zuverlässig bestätigt werden kann.

MAJIWA *et al.* (1994) charakterisierten Trypanosomen in natürlich infizierten Tsetsefliegen mit Hilfe von DNA-Sonden und der PCR. Bei der Sondenhybridisierung ergaben 28 von 71 parasitologisch positiven Proben kein Signal. Nach der PCR derselben Proben mit anschließender Sondenhybridisierung der PCR-Amplifikate waren nur noch sechs Proben nicht identifizierbar.

Bei epidemiologischen Studien in Kenia, Uganda und Tansania wurden positive PCR-Ergebnisse parasitologisch negativer Rinder mit DNA-Sonden bestätigt (MAJIWA *et al.*, 1994; MUGITTU *et al.*, 2001). Von MOSER *et al.* (1989) wurde darüber hinaus eine 100-fache Steigerungsmöglichkeit der Sensitivität der PCR durch Sondenhybridisierung der

Amplifikationsprodukte vermutet. In experimentellen Untersuchungen mit Verdünnungsreihen von Lysaten ganzer Trypanosomen fanden MASIGA *et al.* (1992) diese Vermutung aber nicht bestätigt. Die Hybridisierung der PCR-Produkte mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden führte zu keiner signifikanten Steigerung der Sensitivität. Durch einen der PCR vorausgehenden Restriktionsenzymverdau der Proben mit anschließender Sondenhybridisierung der Amplifikationsprodukte ließ sich die Sensitivität allerdings um den Faktor 100 steigern. Die Nachweisgrenze verbesserte sich dadurch von 1 Trypanosom/PCR-Ansatz auf 0,01 Trypanosom/PCR-Ansatz.

## **2.5 BEKÄMPFUNG DER TRYPANOSOMOSE – MÖGLICHKEITEN UND STRATEGIEN**

Die Vielfalt der Bekämpfungsmöglichkeiten der Trypanosomose kann grundsätzlich auf drei Strategien reduziert werden:

1. Den Einsatz trypanotoleranter Rinderrassen
2. Die Bekämpfung der Tsetsefliege als Vektor
3. Die Bekämpfung der Trypanosomen im Wirtstier

### **2.5.1 Trypanotoleranz**

Definiert wurde die Trypanotoleranz als relative Fähigkeit eines Tieres, die Entwicklung der Parasiten zu kontrollieren und ihre pathologischen Effekte zu begrenzen (MURRAY *et al.*, 1982).

Im allgemeinen wird der Begriff sowohl zur Beschreibung von Wildtierspezies, welche sich Trypanosomeninfektionen gegenüber hochresistent verhalten, angewandt, als auch, um das eben genannte Phänomen zu beschreiben, welches bei manchen Nutzierrassen im Vergleich zu anderen Rassen bei gleichem Trypanosomoserisiko zu geringeren Morbiditäts- und Mortalitätsraten führt (DOLAN, 1987). Trypanotolerante Rassen bleiben dabei trotz des Trypanosomoserisikos generell auch ohne Trypanozideinsatz produktiv. Nachdem die Anämie den hauptsächlichen pathogenen Effekt der Nagana darstellt, dient der Hämatokritwert neben der Parasitämie als Hauptindikator für die Trypanotoleranz. Er zeigt eine starke Korrelation zur Körperkondition und Leistungsfähigkeit der Tiere (MURRAY *et al.*, 1990).

Die ersten Berichte über Trypanotoleranz in West- und Ostafrika gab es bereits 1906 bzw. 1913 (DOLAN, 1987). Experimentell wurden bislang nur drei Rinderrassen als trypanotolerante Rassen bestätigt: Das N'Dama, ein langhorniges buckellooses Rind aus Westafrika, das West African Shorthorn, ein kurzhorniges buckellooses Rind aus Westafrika und das Orma Boran, ein Buckelrind aus Ostafrika. Die Nutzung trypanotoleranter Rassen ist in 19 Ländern der feuchtesten Regionen West- und Zentralafrikas bis zum heutigen Tag eine wichtige Option zur Erhaltung der Tierproduktion. In elf Ländern wurden trypanotolerante

Rinder - zumeist N'Dama - in die Gebiete mit dem höchsten Trypanosomoserisiko eingeführt (D'ETEREN *et al.*, 1998).

Die Annahme, trypanotolerante Rinder seien aufgrund ihres kleinen Wuchses weniger produktiv, ist weitverbreitet. Studien des International Livestock Centre for Africa haben jedoch bewiesen, dass N'Dama und Baoulé bei hohem Trypanosomoserisiko ebenso produktiv sind, wie Zebus, die unter permanenter Chemoprophylaxe gehalten werden (D'ETEREN *et al.*, 1998). Insgesamt wird mit steigendem Nagarisiko jedoch auch bei trypanotoleranten Rassen die Produktivität beeinträchtigt (TRAIL *et al.*, 1994). Unterstützende Trypanozidbehandlungen können bei diesen Rindern dann ebenfalls notwendig werden (DIALL *et al.*, 1992). Außerdem vermögen Stressfaktoren wie Überlastung, Krankheit, Trächtigkeit, Geburt und Laktation, die genetisch verankerte Eigenschaft der Trypanotoleranz zu destabilisieren.

Die Abwesenheit verlässlicher genetischer Marker für die Resistenz oder Empfänglichkeit gegenüber Trypanosomen stellt ein Problem für Zuchtprogramme bei der Selektion auf Trypanotoleranz dar - sowohl innerhalb von Rassen, als auch bei Kreuzungszuchten. Während eine allgemeine Relation zwischen dem Grad der Parasitämie und der Schwere der Anämie existiert, scheint es bei der Trypanotoleranz für jede Komponente (die Kontrolle der Parasiten und die Linderung der Anämie) bestimmte Mechanismen zu geben, welche unabhängig voneinander operieren (MURRAY *et al.*, 1990). Diese Mechanismen und ihre genetische Kontrolle zu verstehen, war eines der Forschungsziele in den vergangenen 20 Jahren. Daraus erhoffte man sich die Identifikation von genetischen Markern für die Zuchtselektion, sowie die Möglichkeit zum Gentransfer in empfängliche Rinder bzw. zur Optimierung der Eigenschaft bei trypanotoleranten Rassen. Bislang ist die Aufklärung der Trypanotoleranzmechanismen nicht gelungen, wenngleich mehrere wahrscheinlich maßgeblich beteiligte Faktoren identifiziert wurden (D'ETEREN *et al.*, 1998). So spielen quantitative Unterschiede zwischen trypanotoleranten und empfänglichen Rindern bei der Produktion spezifischer IgGs, welche sich während Reinfektionen noch zu vergrößern scheinen, vermutlich eine wichtige Rolle (AKOL *et al.*, 1986). Die Sekundäre Immunantwort ruft bei trypanotoleranten N'Dama eine effizientere anamnestiche Reaktion gegenüber den VATs hervor (PALING *et al.*, 1991). Die überlegene humorale Antwort ist möglicherweise auch an der Neutralisierung pathogener Stoffwechselprodukte der Parasiten verantwortlich. Neben der besseren Fähigkeit zum Aufbau einer spezifischen humoralen Abwehr, wurden bei trypanotoleranten Rassen auch höhere Komplementspiegel während Trypanosomeninfektionen gefunden, als bei empfänglichen Zebus (AUTHIE & POBEL, 1990). Nachdem der Komplementfaktor C3 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der protektiven Immunität spielt, entstehen daraus vermutlich wichtige Konsequenzen für die Kontrollmechanismen von Infektion und Morbidität. Die Existenz weiterer Faktoren, für welche es bislang noch keine gesicherten Anhaltspunkte gibt, ist wahrscheinlich.

Zur besseren Ausnutzung der Trypanotoleranz sind außer dem Verständnis der Mechanismen, ihre Charakterisierung unter Feldbedingungen und ihre Messbarkeit erforderlich. Ein Trypanotoleranztest basierend auf Hämatokritwerten und Parasitämiedaten wurde von TRAIL *et al.* (1990, 1994) zur Identifizierung von geeigneten Tieren für Zuchtprogramme beschrieben.

### 2.5.2 Bekämpfung der Erreger

Die in den betroffenen Gebieten weltweit am meisten angewandte Methode zur Bekämpfung der Trypanosomose besteht im Einsatz von Trypanoziden. Die Chemotherapie der Nagana beim Wiederkäuer in Afrika stützt sich generell auf die Salze dreier Wirkstoffe: Diminazen, Homidium, und Isometamidium (ANENE *et al.*, 2001). Für die Therapie und Prophylaxe von *T. evansi*-Infektionen bei Pferden, Kamelen und Büffeln werden außerdem Quinapyramin, Suramin und Melarsomine eingesetzt (PEREGRINE, 1994).

Diminazen ist gegenwärtig das am häufigsten eingesetzte Therapeutikum und Isometamidium das am häufigsten eingesetzte Prophylaktikum. Nachfolgend sollen die bei Wiederkäuern zur Bekämpfung der Nagana angewandten Wirkstoffe näher beschrieben werden:

#### Homidiumbromid oder -chlorid

Homidium gehört zur Gruppe der Phenanthridine. Es wird als Homidiumchlorid unter dem Handelsnamen Novidium<sup>®</sup> und als Homidiumbromid unter dem Handelsnamen Ethidium<sup>®</sup> zur i.m. Behandlung von *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen bei Rindern, kleinen Wiederkäuern und Schweinen vertrieben. Beide Salze sollen bei einer Dosierung von 1,0 mg/kg KGW dieselbe therapeutische Wirkung entfalten. Bei Rindern unter Feldbedingungen wurde eine prophylaktische Aktivität zwischen 2 und 19 Wochen in Abhängigkeit vom Infektionsdruck beschrieben. Generell scheint die Wirkstoffsensibilität der Parasiten sowie der herrschende Infektionsdruck die Prophylaxezeitdauer zu bestimmen (DOLAN *et al.*, 1992). Nichtsdestotrotz wurde Homidium in der Vergangenheit hauptsächlich zu kurativen Zwecken verabreicht. Seinem extensiven Einsatz in den 60er und 70er Jahren folgte zwischenzeitlich ein starker Abschwung verursacht durch verbreitet auftretende Resistenzen (KINABO, 1993).

#### Isometamidiumchlorid

Isometamidium, ein aromatisches Phenanthridin Amidin, ist im Wesentlichen ein Hybridmolekül bestehend aus Homidium und einem Teil des nachfolgend beschriebenen Diminazen-Moleküls. Der Wirkstoff ist zur i.m. Therapie und Prophylaxe von *T. congolense*-, *T. vivax*-, *T. brucei*- und *T. evansi*-Infektionen bei Rindern, kleinen Wiederkäuern, Equiden und Kamelen als Samorin<sup>®</sup> oder Trypamidium<sup>®</sup> erhältlich. Die vom Hersteller empfohlene

therapeutische Dosis liegt zwischen 0,25 - 0,5 mg/kg KGW, während für eine 10 - 12 wochenlange Prophylaxe 0,5 - 1,0 mg/kg KGW empfohlen werden. Die bei einer Dosierung von 1,0 mg/kg KGW bei Rindern beobachtete prophylaktische Wirksamkeit bewegte sich zwischen 2 und 22 Wochen. Diese zeitliche Varianz scheint nach PEREGRINE *et al.* (1991) hauptsächlich von der Sensibilität der Trypanosomen dem Wirkstoff gegenüber, determiniert zu sein. KINABO (1993) schreibt sie eher den großen Schwankungen in der Bioverfügbarkeit zu, welche durch Gewebsalterationen an der Injektionsstelle entstehen können (siehe unten).

Der wichtigste angenommene Wirkungsmechanismus der Phenanthridine besteht in der Blockade der Nukleinsäuresynthese durch Interkalation zwischen die benachbarten Basenpaare der DNA-Doppelhelix. Weiterhin sollen die DNA- und RNA-Polymerase inhibiert und fälschlicherweise Nukleinsäurevorläufer in DNA- und RNA-Moleküle eingebaut werden. Eine Beteiligung am Effekt wird ferner durch die Alteration verschiedener biochemischer Vorgänge angenommen, wie der Glycoprotein-Biosynthese, dem Lipid- und ATP-Metabolismus und dem Membrantransport (KINABO, 1993) sowie einer selektiven Spaltung der kDNA-Topoisomerase im Kinetoplasten der Trypanosomen (GEERTS & HOLMES, 1998). In welchem Maß diese Ziele getroffen werden bzw. welchen Anteil sie am Gesamteffekt der Wirkstoffe haben, ist noch unbekannt. Die Existenz eines ganz anderen bislang unentdeckten Wirkungsmechanismus schließt KINABO (1993) ebenfalls nicht aus.

ISMM und Homidium sind kurze Zeit nach i.m. Applikation im Plasma nachweisbar, wo sie ihre maximale Konzentration nach etwa einer Stunde erreichen. Dem folgt wiederum ein sehr schneller Abfall auf ganz niedrige Konzentrationen. Trotz des schnellen Erscheinens im Plasma ist die Bioverfügbarkeit - besonders beim ISMM - sehr gering. Das trägt zur Depotwirkung des an der Injektionsstelle gebundenen Wirkstoffs bei, von wo er nur langsam freigesetzt wird. Vom Plasma aus verteilt sich ISMM schnell in die unterschiedlichen Körpergewebe. Es gibt Anzeichen dafür, dass es in höheren Konzentrationen eher in den Geweben, als im Plasma akkumuliert (KINABO, 1993). Über den Metabolismus ist noch wenig bekannt. Die Ausscheidung des untransformierten ISMM, sowie der angenommenen Metaboliten, erfolgt hauptsächlich bilär. Ähnliches wurde auch für Homidium beschrieben (KINABO, 1993).

Eine gravierende Nebenwirkung der Phenanthridine - insbesondere des ISMM - besteht in der lokalen Gewebsschädigung, welche diese an der Injektionsstelle verursachen. Abgesehen von der direkten Schmerzauslösung und der Gewebsschädigung, kann die Wirkstoffabsorption auf eine nicht vorhersehbare Weise beeinträchtigt und der Effekt dadurch möglicherweise reduziert werden (KINABO, 1993). Akute Toxizitätserscheinungen, die möglicherweise auf einer Blockade der Cholinesterase beruhen, wurden nach ISMM-Applikation bei Hunden, Rindern, Kamelen, Ziegen und insbesondere bei Schweinen beobachtet.

### Diminazenaceturat

Diminazen ist ein aromatisches Diamidin, welches unter den Handelsnamen Berenil<sup>®</sup>, Veriben<sup>®</sup> und Ganaseg<sup>®</sup> zur i.m. Behandlung von Trypanosomen- und Babesieninfektionen bei Rindern, kleinen Wiederkäuern, Pferden und Hunden auf dem Markt ist. Der Einsatz von Diminazen ist bei den beiden letztgenannten Tierarten durch den geringen therapeutischen Index eingeschränkt. Aufgrund seiner hohen Toxizität für Kamele sollte es bei dieser Tierart überhaupt nicht angewandt werden.

Zur Behandlung sensibler *T. congolense*- und *T. vivax*-Infektionen ist eine Applikation von 3,5 mg/kg KGW ausreichend, während die Eliminierung von *T. brucei*-Infektionen eine höhere Dosierung (bis zu 7,0 mg/kg KGW) erfordert. Dank der bisher vergleichsweise geringen Resistenzentwicklung bzw. der erhaltenen Wirksamkeit in Regionen, wo andere Substanzen aus dem genannten Grund bereits versagt haben, ist Diminazen das gegenwärtig populärste Therapeutikum von Trypanosomeninfektionen (PEREGRINE & MAMMAN, 1993; PEREGRINE, 1994).

Im Gegensatz zu den Phenanthridinen blockiert Diminazen die Nukleinsäuresynthese nicht durch Interkalation, sondern durch elektrostatische und durch Wasserstoffbrücken vermittelte Bindungen an Stellen der kDNA, die reich an Adenin-Thymin-Basenpaarungen sind (PEREGRINE & MAMMAN, 1993). Einen Anteil an diesem Effekt wird auch der Inhibierung der mitochondrialen Typ II Topoisomerase zugeschrieben (PEREGRINE & MAMMAN, 1993). Als weitere Komponenten im Wirkungsmechanismus sind außerdem die Hemmung der Synthese biogener Amine sowie die Hemmung der aeroben Glykolyse beschrieben (Frey & Löscher, 1996).

Maximale Plasmaspiegel werden bereits 15 - 45 Minuten nach der Applikation von Diminazen erreicht. Die Elimination erfolgt schnell und verläuft biphasisch beim Rind und triphasisch beim kleinen Wiederkäuer (PEREGRINE & MAMMAN, 1993). Während für das Schaf eine terminale Halbwertszeit von 13 Stunden angegeben wird, ist für das Rind eine initiale Halbwertszeit von 2 Stunden und eine terminale Halbwertszeit von 188 Stunden beschrieben (Frey & Löscher, 1996). Die Ausscheidung erfolgt größtenteils renal.

Als Intoxikationserscheinungen wurden bei experimenteller Überdosierung von Kamelen und Hunden insbesondere schwere Störungen des Magen-Darm-Traktes, des Respirationstraktes, des Bewegungsapparates und des Nervensystems beobachtet (PEREGRINE & MAMMAN, 1993).

### Quinapyraminsulphat oder -chlorid

Quinapyramin, ein Quinolin Pyrimidin, war früher auch zur Anwendung beim Rind auf dem Markt, wurde 1976 aber wegen Resistenz- und Toxizitätsproblemen für diesen Zweck zurückgezogen. 1984 wurde es zum Einsatz bei Kamelen und Pferden wieder eingeführt (GEERTS & HOLMES, 1998).

### 2.5.3 Bekämpfung der Vektoren

Die Bekämpfung der Tsetsefliege zur Kontrolle der Trypanosomose wird seit Jahrzehnten mit wechselnden Methoden und wechselndem Erfolg durchgeführt. Die Bemühungen reichten in der Vergangenheit von der Ausrottung ganzer Wildtierbestände und großflächigen Veränderungen der Vegetation, um die natürlichen Wirte und Habitate zu vernichten, bis hin zu groß angelegten Sprühaktionen von Insektiziden am Boden und aus der Luft. Die zuerst genannten Methoden sind inzwischen aus Gründen des Arten- und Umweltschutzes obsolet. Auch die Versprühung von Insektiziden aus der Luft wurde zwischenzeitlich stark eingeschränkt (FELDMANN & HENDRICH, 1998). Die momentan verfügbaren und aus Sicht des Umweltschutzes vertretbaren Methoden der Tsetsekontrolle bestehen im Einsatz insektizid-getränkter Fallen und Tücher (gegebenenfalls zusätzlich mit Geruchsattraktanzien versehen) und insektizidbehandelter Rinder sowie der Sterile Insekten Technik (SIT).

Insektizidbehandelte Tücher und Fallen stellen in den meisten Situationen eine effiziente und ausreichend spezifische Methode dar, um die Tsetsepopulationen zu dezimieren (CHALLIER & LAVEISSIÈRE, 1973, FELDMANN & HENDRICH, 1998). Bei verschiedenen Bekämpfungsaktionen in Westafrika gelang es, die Tsetsepopulationen innerhalb von 3 - 6 Monaten um über 90% zu reduzieren (BAUER & SNOW, 1998). Die Nachhaltigkeit solcher Maßnahmen hängt allerdings entscheidend von der Partizipation der ländlichen Bevölkerung ab - insbesondere nach der Beendigung extern organisierter Hilfsprogramme. Bei vergangenen derartigen Kampagnen wich der anfängliche Enthusiasmus der lokalen Bevölkerung, sobald die externe Unterstützung beendet war (BARRETT & OKALI, 1998). Während generell eine relativ geringe Bereitschaft seitens der Tierbesitzer zur Beisteuerung privater finanzieller Mittel für Fliegenfallen und Targets als sogenanntes „public good“ besteht, ist die Akzeptanz bei Maßnahmen am Tier erheblich größer. Die Rinder können nach Behandlung mit Insektiziden als lebende Köder (life bait technique) eingesetzt werden. Sie werden dafür zumeist mit Pyrethroiden besprüht, gedipt oder im pour-on-Verfahren behandelt (BAUER *et al.*, 1992). Auf diese Weise kann ebenso eine rasche Zurückdrängung der Nagana in den behandelten Herden stattfinden (THOMPSON, 1991; BAUER *et al.*, 1995; LEAK *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1993). Der Effekt insektizidbehandelter Rinder ist abhängig von der Anzahl behandelter Tiere, dem Ausmaß ihrer Bewegung in den Tsetse-infestierten Gebieten und der Wirtspräferenz der vorkommenden Glossinenarten. Er wird durch geringe Rinderdichten und ungleichmäßig verteilte bzw. stationär gehaltene Herden eingeschränkt (BAUER & SNOW, 1998).

Resistenzen gegen die gebräuchlichen synthetischen Pyrethroide sind bei Tsetsefliegen bislang nicht bekannt geworden. Vermutlich werden die von einigen anderen Dipteren bekannten Pyrethroidresistenzen langfristig aber auch von Tsetsefliegen entwickelt werden. Deshalb obliegt es insbesondere den an der Tsetse- und Trypanosomosekontrolle

teilhabenden internationalen Organisationen, auf einen verantwortungsvollen Insektizideinsatz hinzuwirken (FELDMANN & HENDRICH, 1998).

Der Gedanke an die Eradikation der Tsetsefliege vom afrikanischen Kontinent mit Hilfe strahlensterilisierter Männchen feierte mit der Errichtung des PATTEC-Programmes (Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign) ein Comeback (OAU, 2001). Das Programm sieht eine Tsetseeradikation vor, die von unabhängig voneinander liegenden isolierten Prioritätsgebieten, welche vor Reinvasion sicher sein sollen, ausgehen und so lange fortschreiten soll, bis schließlich alle Tsetsefliegen ausgerottet sind.

Lokal begrenzte Eradikationsprogramme in der Vergangenheit zeigten, dass die SIT-Technik durchaus erfolgreich eingesetzt werden kann (WILLIAMSON *et al.*, 1983; CUISANCE *et al.*, 1986; TAKKEN *et al.*, 1986). Der logistische Aufwand und die Kosten für solche Programme sind allerdings immens; zudem wird der langfristige Effekt durch die Reinvasion von Tsetsefliegen in die Bekämpfungsgebiete bedroht (BUDD, 1999). In diesem Zusammenhang stellt die erfolgreiche Ausrottungskampagne auf der Insel Zansibar eine beispielhafte Ausnahme dar (DWINGER *et al.*, 2000).

#### **2.5.4 Integrierte Bekämpfung**

Unter integrierter Bekämpfung ist die kombinierte Anwendung verschiedener Methoden aus dem verfügbaren Arsenal gegen die Trypanosomose, insbesondere der Tsetsebekämpfung und der Chemotherapie, zu verstehen (BAUER *et al.*, 1999). Bei bestehenden Kreuzresistenzen in einer Region stellt die integrierte Bekämpfung die einzige der Situation angemessene Vorgehensweise überhaupt dar; bei Bestehen einfacher Resistenzen kann sie einer Verschlimmerung der Situation entgegenwirken (DOLAN *et al.*, 1992, LEAK *et al.*, 1996). In Gebieten mit sensitiven Trypanosomenpopulationen kann die Entstehung von Resistenzen durch integrierte Kontrollmaßnahmen dagegen hinausgezögert oder sogar vermieden werden (GEERTS & HOLMES, 1998). Allgemein übertrifft die Nachhaltigkeit integrierter Bekämpfungsprogramme die von einfachen Kontrollstrategien (PEREGRINE, 1994). Jedoch scheitern auch die Maßnahmen des integrierten Tsetse- und Trypanosomose-Managements häufig an der nachlassenden Partizipation der Tierhalter nach ihrer Implementierung (BARRETT & OKALI, 1998).

## 2.6 CHEMORESISTENZ

In den afrikanischen Ländern südlich der Sahara, sowie in großen Teilen Asiens und Südamerikas war die Anwendung von Trypanoziden über längere Zeit effektiv und generell erschwinglich. Inzwischen mehrt sich die Zahl der Berichte über chemoresistente Trypanosomeninfektionen. Unter Chemoresistenz wird allgemein der Sensibilitätsverlust eines Erregers gegenüber einem Medikament, auf das er bislang in der empfohlenen Wirkstoffkonzentration empfindlich reagierte, verstanden.

Die trypanoziden Substanzen Isometamidium, Diminazen und Homidium sind nunmehr über 40 Jahre in Afrika zur Bekämpfung der Nagana in Gebrauch. Diminazen und Homidium wurden in den 50er Jahren für den Feldeinsatz eingeführt; ISMM kam 1961 hinzu (ANENE et al., 2001).



**Abb. 2.8:** Afrikanische Länder mit Berichten von einfachen (hellgrau) und multiplen (dunkelgrau) Trypanozidresistenzen (Auflistung der nummerierten Länder in Tabelle 2.2 auf der folgenden Seite)

Wie zuvor schon von antimikrobiellen Substanzen, Anthelmintika und Insektiziden berichtet wurde, hat auch der dauerhafte Einsatz der Trypanozide etwa zehn Jahre nach ihrer Markteinführung zur Entwicklung von Resistenzen geführt (PEREGRINE, 1994; GEERTS & HOLMES, 1998).

Inzwischen liegen aus 13 afrikanischen Ländern südlich der Sahara Berichte über Trypanozidresistenzen vor, wovon in acht Ländern Kreuzresistenzen beobachtet wurden (Abb. 2.8; Tab.2.2). Unbekannt ist derzeit noch, ob die Anzahl der Resistenzberichte einzig durch die Verschlimmerung der Resistenzlage oder zusätzlich durch ein wachsendes wissenschaftliches Interesse an diesem Phänomen im Steigen begriffen ist (GEERTS & HOLMES, 1998).

Tab. 2.2: Länder mit Berichten von einfachen und multiplen Trypanozidresistenzen

Einfache Trypanozidresistenz		Multiple Trypanozidresistenz	
Land	Referenz	Land	Referenz
6) Sambia	SINYANGWE <i>et al.</i> , 2001	1) Äthiopien	SCOTT & PEGRAM, 1974; CODIJA <i>et al.</i> , 1993; MULUGETA <i>et al.</i> , 1997; AFEWERK <i>et al.</i> , 2000
9) Tansania	MBWAMBO <i>et al.</i> , 1988	2) Burkina Faso	CLAUSEN <i>et al.</i> , 1992 ; MOLOO & KUTUZA, 1990; AUTHIE, 1984
10) Tschad	GRABER, 1968	3) Elfenbeinküste	KÜPPER & WOLTERS, 1983
		4) Kenya	SCHÖNEFELD <i>et al.</i> , 1987; RÖTTCHER & SCHILLINGER, 1985
11) Uganda	MWAMBU & MAYENDE, 1971	5) Nigeria	ILEMOBADE & BUYS, 1970; JOSHUA, 1988; KALU, 1995
		7) Somalia	AINANSHE <i>et al.</i> , 1992
13) Zimbabwe	LEWIS & THOMSON, 1974; JOSHUA <i>et al.</i> , 1995	8) Sudan	MOHAMED-AHMED <i>et al.</i> , 1992
		12) Zentralafrikanische Republik	FINELLE & YVORE, 1962

### 2.6.1 Behandlungsversagen nach Chemotherapie

Das Erscheinen neuer Trypanozide auf dem Markt ist in der nahen Zukunft sehr unwahrscheinlich. Die Erhaltung der Effektivität vorhandener Wirkstoffe ist deshalb von essentieller Bedeutung (SCHILLINGER, 1985; GEERTS & HOLMES, 1998). In diesem Sinne haben die Ursachenforschung nach den Wirksamkeitsverlusten (SCHILLINGER, 1985) und die Implementierung integrierter Kontrollstrategien bei der Trypanosomosebekämpfung (GEERTS & HOLMES, 1998) oberste Priorität.

Über die ökonomischen Auswirkungen der Trypanozidresistenz auf die Tierproduktion existieren bislang kaum Studien. Es wird jedoch angenommen, dass die Auswirkungen auf das Überleben und die Produktivität der Tiere erheblich sind (GEERTS & HOLMES, 1998). Das Versagen von Trypanozidbehandlungen kann auf eine Vielfalt möglicher Ursachen zurückgeführt werden. Die Aufklärung der Ursache(n) ist die Voraussetzung für ihre Beseitigung. Geeigneten Verfahren zur Erkennung chemoresistenter Trypanosomen kommt deshalb große Bedeutung zu.

SCHILLINGER (1985) unterteilte die Ursachen für Wirksamkeitsverluste von Trypanoziden in 1) Anwendungsfehler und 2) vom Anwender nicht unmittelbar zu beeinflussende Ursachen.

#### 1) Anwendungsfehler, die zu Wirkungsverlusten von Trypanoziden führen:

- Fehlerhafte Lagerung (Überlagerung, Lagerung bei falscher Temperatur, etc.)
- Fehlerhafte Zubereitung (z.B. zu hohe Verdünnung oder unzureichende Auflösung des Medikaments)
- Fehlerhafte Applikation (z.B. unvollständige Applikation der Injektionslösung, falsche Injektionsstelle)

#### 2) Vom Anwender nicht beeinflussbare Ursachen für Wirkungsverluste von Trypanoziden:

- Arzneimittelresistenz der Trypanosomen: durch vorausgehende Trypanozidexposition, insbesondere durch Anwendung subkurativer Dosierungen induzierte Trypanozidresistenz (Kap. 2.6.2).
- Arzneimitteltoleranz der Trypanosomen: Phänomen der „natürlichen“ Unempfindlichkeit von Trypanosomenspezies oder Trypanosomenpopulationen gegenüber einem bestimmten Chemotherapeutikum, welches ohne eine vorherige Trypanozidexposition besteht.
- Extravaskuläre Ansiedlung von Trypanosomen im Wirtstierorganismus: Einige Trypanosomenarten, insbesondere Vertreter der *Trypanozoon*-Gruppe, haben die Fähigkeit, andere Organsysteme - allen voran das Zentralnervensystem - zu invadieren. Dort

kann kein ausreichender Trypanozidspiegel aufgebaut werden, weil die Wirkstoffe die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können.

- Herabgesetzter Immunstatus des Wirtstieres: Die trypanozide Wirkung der Chemotherapeutika wird u.a. von der Immunitätslage des Wirtes beeinflusst. Zusätzlicher Parasitenbefall und mangelhafte Fütterung schränken beispielsweise die Immunkompetenz der infizierten Tiere ein und beeinträchtigen so den Behandlungserfolg.
- Einkapselung des intramuskulären Trypanoziddepots: Infolge der i.m. Injektion von ISMM entstehen in Abhängigkeit von der Dosierung mehr oder weniger starke Gewebereizungen und -nekrosen, um welche eine Bindegewebskapsel gebildet wird. Die Einkapselung des Arzneimitteldepots verhindert ab einem gewissen Stadium die Freigabe von ISMM und damit die prophylaktische Umsetzung der gesamten injizierten Trypanoziddosis (Kap. 2.5.2).

### 2.6.2 Angenommene Mechanismen der Chemoresistenz

Das Verständnis der Resistenzmechanismen von Trypanosomen ist insbesondere zur Identifizierung neuer Angriffspunkte potentieller trypanozider Wirkstoffe bzw. zur Entwicklung neuer chemotherapeutischer Strategien erstrebenswert. Vermutlich könnten aus solchen Erkenntnissen aber auch weitergehende Hinweise zur Vermeidung von Chemoresistenzen gewonnen werden.

Grundsätzlich kann Chemoresistenz durch die natürliche Selektion resistenter Erreger ohne vorausgehende Medikamentenexposition (=“Trypanotoleranz“ nach SCHILLINGER, 1985; Kap. 2.6.1), infolge des Selektionsdrucks aufgrund von Medikamentenexposition, durch die Ausbildung von Kreuzresistenzen oder durch Mutagenese entstehen (ANENE *et al.*, 2001). Es gibt keine konkreten Beweise, welche die Einordnung des Phänomens bei Trypanosomen eher zu den durch Adaptation erworbenen Eigenschaften, als zu den natürlich vorhandenen Eigenschaften zuließen. Nichtsdestotrotz konnte bei sensitiven Trypanosomen-Klonen durch wiederholte Unterdosierung von Medikamenten und Passagierung Chemoresistenz experimentell ausgelöst werden (FOLKERS, 1966; NYEKO *et al.*, 1989).

Erworbene Chemoresistenz kann auf drei möglichen genetischen Veränderungen basieren: 1) Mutationen oder Amplifikationen spezifischer Gene, welche direkt in protektive Funktionen involviert sind; 2) Mutationen von Genen zur Regulation der Stressantwort, welche mit einer veränderten Expression zahlreicher Proteine einhergehen und 3) Gentransfer (GEERTS & HOLMES, 1998). Das Resultat daraus besteht in einer Veränderung der Wirkstoffkonzentration am Zielort, einer Veränderung des Angriffspunktes selbst, oder beidem (ANENE *et al.*, 2001).

Eine geringere Wirkstoffakkumulation in chemoresistenten Trypanosomenklonen im Vergleich zu sensitiven Klonen wurde experimentell mit verschiedenen Medikamenten nach-

gewiesen (DAMPER & PATTON, 1976; FROMMEL & BALBER, 1987; SUTHERLAND & HOLMES, 1993). Die Aufnahme von ISMM in die Trypanosomen erfolgt nach SUTHERLAND *et al.* (1992) rezeptorvermittelt durch ein spezifisches energieabhängiges Transportsystem auf der Zelloberfläche. Bei resistenten *T. b. brucei*- und *T. b. rhodesiense*-Klonen wurde im Vergleich zu sensitiven Klonen eine geringere Akkumulation von Ethidiumbromid und mehreren Diamidinen beobachtet (FROMMEL & BALBER, 1987). Bei resistenten *T. congolense*-Klonen war die Akkumulation von ISMM im Kinetoplasten gegenüber sensitiven Populationen ebenfalls reduziert (SUTHERLAND *et al.*, 1991). Als Ursache dafür wird eine Alteration des spezifischen Rezeptors auf der Zelloberfläche, welche einen verminderten Influx bewirkt, angenommen. Außerdem wird eine Steigerung der Efflux-Rate vermutet (SUTHERLAND *et al.*, 1992). Studien der ISMM-Aufnahme in An- bzw. Abwesenheit von Metabolismus-Inhibitoren und einer Reihe von Modulatoren der Kalziumkonzentration gaben einen indirekten Hinweis auf die Beteiligung eines energieabhängigen Efflux-Mechanismus an der Reduzierung der Trypanozidakkumulation (SUTHERLAND *et al.*, 1991). Unklarheit besteht bisher darüber, ob dieses Phänomen einer veränderten Anzahl von ISMM-Carrierproteinen in der Plasmamembran oder einer Verschiebung der Influx/Efflux-Ratio zuzuschreiben ist. Gegenüber den Homidiumsalzen werden ähnliche Mechanismen vermutet (GEERTS & HOLMES, 1998).

Ein rezeptorvermittelter, energieabhängiger Aufnahmemechanismus, wie für ISMM beschrieben, wurde zuvor auch schon für DIM vermutet (DAMPER & PATTON, 1976). Die Existenz mindestens zweier Nukleosid-Transporter zur Aufnahme von Adenosin aus dem Wirtstierorganismus wurde bei Blutstromformen von *T. brucei* nachgewiesen (CARTER & FAIRLAMB, 1993). Der trypanolytische Effekt von Melarsenoxid *in vitro* konnte mit Zugaben von Adenin, Adenosin und Dipyridamol durch kompetitive Hemmung inhibiert werden. Bei Melarsen-sensitiven Trypanosomen wurden außerdem zwei Transporter mit hoher Affinität zu Adenosin, P1 und P2, unterschieden, deren Adenosinaufnahme mit Inosin und Adenin dosisabhängig saturierbar inhibiert werden konnte (CARTER & FAIRLAMB, 1993, DE KONING & JARVIS, 1999). Die Beteiligung dieser Transporter an der Trypanozidaufnahme bzw. ihrer Veränderung bei Trypanozidresistenz wurde in mehreren Studien demonstriert. Der Verlust oder die Veränderung des P2-Transporters war für die Resistenz von *T. brucei* gegenüber Melaminophenylarsen-Verbindungen und Diminazen verantwortlich (CARTER & FAIRLAMB, 1993; CARTER *et al.*, 1995; BARRETT & FAIRLAMB, 1999). Bei einem DIM-resistenten *T. equiperdum* Klon (BARRETT *et al.*, 1995) und einem Cymelarsan-resistenten *T. evansi* Klon wurden ebenfalls Alterationen des Adenosin-Transporters vom P2-Typ beschrieben.

Trotz der beschriebenen Beobachtungen fehlt immer noch das genaue molekulare Verständnis der Resistenzmechanismen. Möglicherweise existieren über die bisherigen Erkenntnisse hinaus auch noch ganz andere Mechanismen (GEERTS & HOLMES, 1998).

### 2.6.3 Maßnahmen zur Vermeidung von Chemoresistenz

Lange Zeit galten der alternierende Einsatz des „Sanative pair“ (DIM und ISMM oder Homidium) und die Vermeidung der Exposition von Trypanosomen gegenüber subtherapeutischen Wirkstoffkonzentrationen als wichtigste Leitlinien zur Vermeidung bzw. Verzögerung der Resistenzentwicklung (GEERTS & HOLMES, 1998). ISMM und DIM waren nach dem Bekanntwerden der Induktion von Kreuzresistenzen durch Quinapyramin wegen ihrer geringen Anfälligkeit, Kreuzresistenzen zu entwickeln, als das „Sanative pair“ bezeichnet worden (PEREGRINE *et al.*, 1994).

Basierend auf dem aktuellen Erkenntnisstand schlagen GEERTS & HOLMES (1998) die nachfolgenden Maßnahmen zur Vermeidung von Chemoresistenz bei Trypanosomen vor:

#### 1) Reduzierung der Anzahl der Trypanozidbehandlungen durch Einsatz integrierter Kontrollmaßnahmen:

Der effektivste Ansatz, die Entstehung von Resistenzen gegen Trypanozide zu verzögern, besteht in der Reduzierung des Selektionsdrucks auf die Parasiten durch den Medikamenteneinsatz (GEERTS & HOLMES, 1998). Massenbehandlungen in kurzen Zeitintervallen sollten deshalb vermieden werden. Besonders in Gebieten mit hohem Parasitendruck sollten integrierte Kontrollmaßnahmen, welche die Vektorbekämpfung mit einbeziehen, durchgeführt werden. Die Haltung trypanotoleranter Rassen stellt eine weitere Anpassungsmaßnahme in Regionen mit hohem Trypanosomoserisiko dar.

#### 2) Korrekte Medikamentendosierung

Die Unterdosierung von Medikamenten ist ein häufig auftretender Fehler, welcher zur Resistenzentwicklung beiträgt. Subtherapeutische Wirkstoffkonzentrationen bewirken einen starken Selektionsdruck auf resistente Parasitenklone (GEERTS & HOLMES, 1998). Eine falsche Schätzung des Tiergewichtes oder der Einsatz von Medikamenten mit reduzierter Wirkung können Ursachen für eine Unterdosierung sein. Eine bewusste zu starke Verdünnung löslicher pulverförmiger Medikamente zur vermeintlichen Ersparnis seitens der Anwender ist ein weiterer Grund. Die Entwicklung verbesserter Formulierungen der existierenden Trypanozide könnte voraussichtlich einen Beitrag leisten, die Verabreichung subtherapeutischer Wirkstoffkonzentrationen zu begrenzen (KAGERUKA *et al.*, 1996; GEERTS & HOLMES, 1998).

Bei der Anwendung von Medikamenten mit langer Halbwertszeit und langsamer Elimination stellen sich automatisch subtherapeutische Wirkstoffkonzentrationen ein. Dieses Problem tritt bei der Gabe von ISMM auf, welches lange Zeit im System persistiert. Im Gegensatz dazu wurde DIM wegen seiner schnellen Elimination aus dem System lange Zeit als einziges Trypanozid betrachtet, wogegen Trypanosomen nicht leicht im Stande sind, Resistenzen zu

entwickeln (ANENE *et al.*, 2001). Nach dem Auftreten DIM-resistenter Feldisolat und Laborstämme konnte sich diese Annahme aber nicht länger halten (ANENE *et al.*, 2001).

### 3) Vermeidung der Medikamentenexposition der gesamten Parasitenpopulation

Die Massenbehandlung mit Trypanoziden ist eine übliche Vorgehensweise zur Prophylaxe und Therapie von Rinderbeständen. Dabei wird ein großer Anteil der gesamten Trypanosomenpopulation eines Gebietes dem applizierten Wirkstoff ausgesetzt. Die Folge davon ist wiederum ein hoher Selektionsdruck auf die Parasiten. Für Trypanozide sind diesbezüglich zwar keine Daten verfügbar; bei anderen Medikamenten wurde jedoch eine Beschleunigung der Resistenzentwicklung durch Massenexposition beobachtet. Aus diesem Grund sollten Behandlungen möglichst immer auf Einzeltiere mit klinischen Symptomen beschränkt bleiben (GEERTS & HOLMES, 1998).

### 4) Behandlungsverbot von Rindern mit Quinapyramin

Der Einsatz des Wirkstoffes Quinapyramin ist beim Rind kontraindiziert und sollte unbedingt vermieden werden. Quinapyramin wurde wegen sich schnell entwickelnder Resistenzen für die Anwendung bei Rindern vom Markt genommen (GEERTS & HOLMES, 1998; ANENE *et al.*, 2001). Zur Behandlung von Pferden und Kamelen ist die Substanz noch immer erhältlich. Einem falschen Einsatz bei Rindern muss deshalb Vorschub geleistet werden.

## **2.6.4 Maßnahmen bei Bestehen von Chemoresistenz**

Bei schon bestehender Resistenz gegen einen Wirkstoff des „Sanative pair“ ist der Einsatz des anderen Wirkstoffes weiterhin möglich. Um weitere Resistenzentwicklungen zu vermeiden, sollte das zweite Medikament jedoch mit besonderer Vorsicht eingesetzt werden; d.h. in Kombination mit Tsetsebekämpfungsmaßnahmen zur Reduzierung der Behandlungsfrequenz und -zahl (GEERTS & HOLMES, 1998).

Bei einer bestehenden Resistenz sollte die Medikamentendosierung nicht erhöht werden, wenngleich eine hochdosierte Behandlung nach SUTHERLAND *et al.* (1991) die beste Möglichkeit bietet, Infektionen mit hochgradig resistenten Trypanosomen zu eliminieren. Aufgrund des zunehmenden Selektionsdruckes steigt der Resistenzgrad der Parasiten trotz temporärer Erfolge auf längere Sicht dennoch an (GEERTS & HOLMES, 1998). Darüber hinaus ist eine Dosiserhöhung der Trypanozide aufgrund ihres geringen therapeutischen Index ohnehin nur begrenzt möglich.

DOWLER *et al.* (1989) erzielten Behandlungserfolge ISMM-resistenter Infektionen durch i.v. Applikation von ISMM. Dem widersprechen Untersuchungen von SUTHERLAND *et al.* (1991), wobei der Behandlungseffekt bei experimentell mit hochresistenten *T. congolense*-Klonen infizierten Rindern durch i.v. Applikation nicht gesteigert werden konnte.

Bei Vorkommen multipler Resistenzen wird die Trypanozidbehandlung zunehmend uneffektiv. Ist dieses Stadium erreicht, wird eine Intervention auf Stufe der Vektorbekämpfung notwendig. Multipel resistente Trypanosomeninfektionen in Äthiopien konnten durch eine Tsetsebekämpfungssaktion mit insektizidgetränkten Targets und der ausschließlichen Behandlung klinisch erkrankter Tiere mit DIM unter Kontrolle gebracht werden (PEREGRINE *et al.*, 1994). Einen ähnlichen Erfolg erzielte ein Deltametrin-Dipping-Programm bei Rindern in Tansania (FOX *et al.*, 1993).

## **2.7 NACHWEIS DER CHEMORESISTENZ**

Der Nachweis chemoresistenter Trypanosomenpopulationen erfolgt durch die Demonstration ihrer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber den empfohlenen, normalerweise wirksamen Trypanozidkonzentrationen. Die bislang zu diesem Zweck entwickelten und eingesetzten Methoden sind zumeist zielgerichtete Modifikationen der oben vorgestellten Diagnostikmethoden (Kap. 2.4). Darunter befindet sich gegenwärtig noch kein idealer Test. Viele der Methoden sind teuer, bei den meisten mangelt es zudem bislang an standardisierten Protokollen, die einen räumlichen und zeitlichen Datenvergleich zuließen (GEERTS & HOLMES, 1998). Einen Vorstoß in diese Richtung haben EISLER *et al.* (2001) kürzlich mit der Vorstellung von standardisierten Tierversuchsprotokollen zur Diagnose trypanozidresistenter Infektionen bei Rindern unternommen.

PEREGRINE (1994) betonte die Dringlichkeit der Entwicklung geeigneter Untersuchungsverfahren im Hinblick auf die Erhaltung der Effektivität der vorhandenen Trypanozide. Die Therapie- und Prophylaxeregime sollten zweckmäßigerweise auf Grundlage des jeweiligen Sensibilitäts-Phänotyps der vorhandenen Trypanosomenpopulationen errichtet werden.

### **2.7.1 Nachweis *in vivo***

Der Tierversuch ist eine klassische und noch immer weit verbreitete Methode zur Ermittlung chemoresistenter Krankheitserreger, gleichwohl er aus verschiedenen Gründen keine Idealösung darstellt. Aus tierschutzrechtlichen und ethischen Gründen verbietet sich der Einsatz von Versuchstieren *de facto* von selbst. Für Tierexperimente muss ferner ein hoher Zeit- und Kostenaufwand kalkuliert werden. Der Kauf und die Haltung von Versuchstieren sind besonders aufwendig, wenn Wiederkäuer als Versuchstiere eingesetzt werden. Die Beobachtungszeiträume während der Studien sind hierbei ebenfalls am längsten. Sie liegen für Wiederkäuer ca. bei 100 Tagen, während sie für Mäuse ca. 60 Tage betragen.

### 2.7.1.1 Einsatz von Wiederkäuern

In der Vergangenheit wurde die Chemoresistenz vieler Trypanosomenisolate in Wiederkäuern (Rinder, Schafe, Ziegen) charakterisiert. Trypanosomen vermehren sich problemlos in diesen Wirtstieren; die derartig gewonnenen Erkenntnisse sind außerdem direkt auf Feldbedingungen übertragbar (PEREGRINE, 1994).

In der Regel wird eine Gruppe von Rindern oder kleinen Wiederkäuern mit dem zu untersuchenden Isolat infiziert und nach dem Auftreten einer Parasitämie mit unterschiedlichen Trypanoziddosierungen behandelt. Für die Bestimmung der effektiven Dosis (ED = effective dose), welche das Verschwinden der Parasiten aus der Zirkulation bewirkt, sowie der kurativen Dosis (CD = curative dose), welche eine permanente Heilung bewirkt, werden die Tiere über eine längere Zeitperiode (bis zu 100 Tagen) beobachtet (GEERTS & HOLMES, 1998). Um das Risiko einer Reinfektion während des Untersuchungszeitraumes auszuschließen, muss die Unterbringung der Tiere währenddessen in fliegensicheren Stallungen erfolgen.

Die Zeitspanne zwischen der Behandlung der Versuchstiere und der Beobachtung resistenter Trypanosomenpopulationen gilt als Indikator für den Grad der Resistenz. Je kürzer diese Zeitspanne, desto höher wird der Grad der Resistenz eingestuft (GEERTS & HOLMES, 1998). Der Test ist prinzipiell auf alle Trypanosomenspezies, inklusive *T. vivax*, anwendbar.

Von EISLER *et al.* (2001) wurde ein standardisiertes Testprotokoll zur Bestimmung der Effektivität empfohlener kurativer Trypanoziddosierungen mit Kälbern als Versuchstieren beschrieben. Es ist insbesondere zur weitergehenden Untersuchung individueller Trypanosomenisolate nach deren vorausgehender Untersuchung in Labornagern gedacht, weil die Übertragung von mit Labornagern gewonnen Untersuchungsergebnissen auf Rinder nur begrenzt möglich ist (Kap. 2.7.1.2).

### 2.7.1.2 Einsatz von Mäusen

Die Möglichkeit zur Massenhaltung von Labortieren, ihre kürzere Generationsdauer und die generell billigeren Haltungskosten bewirken eine enorme Reduzierung des Kosten- und Zeitaufwandes gegenüber den Versuchsanordnungen mit Wiederkäuern. In vielen Studien werden deshalb alternativ zu Wiederkäuern empfängliche Labornager als Versuchstiere eingesetzt.

Wie schon bei der Diagnostik im Tierversuch (Kap. 2.4.1.5) erwähnt, wachsen jedoch nicht alle Feldisolate in Labornagern (HAWKING, 1963; PEREGRINE, 1994). *T. vivax*-Isolate und die Mehrheit der *T. congolense*-Isolate können deshalb auf diese Weise gar nicht untersucht werden. Bei der Inokulation von Feldproben mit Mischinfektionen werden bestimmte Trypanosomenspezies in ihrem Wachstum begünstigt, während andere zugrunde gehen;

innerhalb der Trypanosomenspezies werden wiederum bestimmte Populationen selektiert. NYEKO *et al.* (1989) beobachteten insbesondere bei schnellen Passagen in Labortieren eine Selektion schnell wachsender dafür aber weniger resistenter Populationen. Daraus folgt möglicherweise eine Verfälschung der Resultate beim Test auf Trypanozidresistenz oder sogar ein Nichterkennen resistenter Trypanosomenpopulationen.

Allgemein besteht zwischen Wiederkäuern und Mäusen eine gute Korrelation der Daten zur Medikamentensensitivität. Wegen der großen metabolischen Unterschiede müssen bei Mäusen aber höhere Dosierungen (normalerweise die 10fache Dosierung der Wiederkäuerdosierung) eingesetzt werden, um vergleichbare Resultate zu erzielen. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf die Situation im Wiederkäuer ist dadurch unmöglich.

Die Bestimmung des Resistenzgrades bei einer großen Anzahl Isolate ist sehr arbeitsaufwendig. Nach der Vermehrung des zu untersuchenden Isolates in einer Maus werden Gruppen von 5 - 6 Mäusen inokuliert. Bei Erreichen des ersten Parasitämiepeaks werden alle Gruppen bis auf eine Kontrollgruppe mit unterschiedlichen Dosierungen behandelt. Bei dieser Vorgehensweise können ED50- und ED95-Werte (die effektive Dosis, welche ein temporäres Verschwinden der Parasiten in 50 bzw. 95% der Fälle bewirkt), sowie CD50- und CD95-Werte (die kurative Dosis, welche eine dauerhafte Heilung bei 50 bzw. 95% der Tiere bewirkt) berechnet werden (GEERTS & HOLMES, 1998).

Eine weitere Testmöglichkeit, welche *in vivo* und *in vitro* Techniken kombiniert, ist der von KAMINSKY *et al.* (1990) entwickelte Drug Incubation Infectivity Test (DIIT). Dieser Test ist aus dem oben erklärten Grund wiederum auf die Untersuchung von *T. brucei*- und - mit Einschränkungen - *T. congolense*-Isolaten beschränkt. Er ist zur Bestimmung der Isometamidium- und Diminazen-Empfindlichkeit von Trypanosomen geeignet. Die Isolate werden dabei über einen definierten Zeitraum gruppenweise in Kulturmedium mit verschiedenen Trypanozidkonzentrationen inkubiert. Im Anschluss werden sie den Mäusen inokuliert, welche während eines 30-tägigen Beobachtungszeitraums auf Parasitämien kontrolliert werden (KAMINSKY *et al.*, 1990).

Zur Charakterisierung der Resistenzsituation in unterschiedlichen Regionen und zum Vergleich von Resistenzsituationen sowohl in geographischer, als auch in zeitlicher Hinsicht, wurde von EISLER *et al.* (2001) ein vereinfachtes standardisiertes Versuchsprotokoll (Single-dose Test) entwickelt. Dieses lässt im Gegensatz zu den anderen Versuchsanordnungen die Untersuchung einer Vielzahl von Trypanosomenisolaten zu, während es keine detaillierte Information über einzelne Isolate zulässt. Jedes zu testende Trypanozid wird den Mäusen nur in einer bestimmten Dosierung (Single-dose) verabreicht, weshalb pro Trypanozid auch nur eine Behandlungsgruppe mit 5 - 6 Mäusen infiziert wird.

### 2.7.1.3 Einsatz von Tsetsefliegen (DIGIT)

Der Drug Incubation Glossina Infectivity Test (DIGIT) wurde in Anlehnung an den DIIT für Mäuse entwickelt (CLAUSEN *et al.*, 1999). Dieser Test ist für die Untersuchung aller Trypanosomenspezies geeignet und kann zur Bestimmung der Isometamidium- und Diminazen-Empfindlichkeit von Trypanosomen eingesetzt werden. Er wurde bisher allerdings nur experimentell getestet und nicht an Feldisolaten erprobt. Den Tsetsefliegen wird dabei infektiöses Blut von experimentell mit sensiblen und resistenten Trypanosomenisolaten infizierter Ziegen angeboten, das zuvor für mehrere Stunden in unterschiedlichen Trypanozidkonzentrationen inkubiert wurde. Zwanzig Tage nach der Blutmahlzeit werden die Tsetsefliegen seziert und mikroskopisch auf Trypanosomen untersucht.

Im Experiment entwickelten die Tsetsefliegen der Kontrollgruppen, die mit infiziertem nicht trypanozidbehandeltem Blut gefüttert worden waren, und die Gruppe, die das Blut mit den trypanozidresistenten Erregern nach der Inkubation in Trypanoziden erhalten hatte, Infektionsraten zwischen 13,6 und 42,2%. Die Gruppe, die das Blut mit den sensiblen Erregern nach der Inkubation in Trypanoziden erhalten hatte, entwickelte dagegen keine Infektion (CLAUSEN *et al.*, 1999).

### 2.7.2 Nachweis *in vitro*

*In vitro*-Studien bieten gegenüber Untersuchungen *in vivo* den Vorteil, dass eine größere Anzahl Isolate gleichzeitig charakterisiert werden kann.

Die Kultivierung von Trypanosomen kann grundsätzlich mit metazyklischen (Blutstromformen) oder prozyklischen (Fliegenformen) Trypanosomen durchgeführt werden. Prozyklische Trypanosomen sind zwar einfacher zu kultivieren als metazyklische, zum Nachweis von Chemoresistenzen aber ungeeignet (KAMINSKY & BRUN, 1993). Sie kommen natürlicherweise nie mit Trypanoziden in Kontakt und unterscheiden sich auch in ihrem Stoffwechsel von den metazyklischen Formen.

Für *T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax* sowie für weitere Trypanosomenspezies (HIRUMI *et al.*, 1977; HILL & HIRUMI, 1983; HIRUMI & HIRUMI, 1984; BRUN & MOLOO, 1982) wurden metazyklische Kultursysteme mit Feederlayer aus Fibroblasten- oder Epithelzelllinien von Säugetieren etabliert. Diese Kultursysteme wurden auch für die Bestimmung der Trypanozidempfindlichkeit von Trypanosomenisolaten sowie der Wirkung neuer Trypanozide eingesetzt (KAMINSKY *et al.*, 1989, 1990, 1993). Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Blutstromformen korrelieren dabei gut mit den Beobachtungen im Feld. GRAY *et al.* (1993) beobachteten bei *T. congolense*-Isolaten *in vitro* und *in vivo* (bei Rindern) ein konstantes Verhältnis der Sensitivität gegenüber DIM, Homidium und ISMM. Bei den bisher entwickelten vereinfachten Tests mit axenischen (zellfreien) Kulturen wurde die Korrelation mit den Felddaten noch nicht ausreichend untersucht.

Von den verschiedenen *in vitro*-Testsystemen benötigen die meisten ein kontinuierliches Trypanosomenwachstum. Dafür sind präadaptierte Stämme erforderlich, deren Herstellung 40 - 50 Tage dauert. Die lange Adaptationsperiode der Trypanosomen an die Kulturbedingungen begünstigt die Selektion von Populationen aus dem Ursprungsisolat (KAMINSKY *et al.*, 1990). Inwieweit die Sensitivität eines Isolats durch den Selektionsdruck beeinflusst wird, ist bislang noch ungeklärt (KAMINSKY & BRUN, 1993).

Nicht mit diesem Nachteil behaftet sind zwei Testsysteme, welche ohne kontinuierliches Wachstum der Trypanosomen auskommen: Dazu gehört der oben (Kap. 2.7.1.2) erwähnte Drug Incubation Infectivity Test (DIIT), der auf der Infektiosität der Trypanosomen für Mäuse nach ihrer vorausgehenden Inkubation mit Trypanoziden *in vitro* basiert. Er ist auf Trypanosomenspezies beschränkt, die für Mäuse infektiös sind. Der <sup>3</sup>H-Hypoxanthine Incorporation Assay (HIA) beruht dagegen auf der Messung von radioaktiv markiertem Hypoxanthin, welches von den Trypanosomen nach ihrer Inkubation in unterschiedlichen Trypanozidverdünnungsstufen aufgenommen wurde (BRUN & KUNZ, 1989). Mit diesem sensitiven indirekten Testsystem wurden bislang Isolate von *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. congolense* und *T. evansi* charakterisiert.

Die übrigen Testsysteme benötigen kontinuierlich wachsende präadaptierte Trypanosomenstämme. Die Einteilung in sensitive und resistente Populationen basiert beim indirekten Nachweis stets auf messbaren Veränderungen bestimmter Vitalitätsparameter der Trypanosomen aufgrund der Trypanozidbehandlung. Beim photometrischen Test nach ZINSSTAG *et al.* (1991) wird beispielsweise der Farbumschlag des Kulturmediums aufgrund einer pH-Wertänderung, die auf der Anhäufung von Stoffwechselprodukten basiert, gemessen. Beim Fluoreszenz-Test nach OBEXER *et al.* (1995) wird den Trypanosomenkulturen nach ihrer Inkubation in Trypanozidverdünnungsreihen ein Fluoreszenz-Markermolekül zugesetzt, welches von intakten Trypanosomen enzymatisch geschnitten wird. Die Aktivitäten von Trypanozid-behandelten und -unbehandelten Kulturen werden zur Beurteilung der Resistenzsituation jeweils miteinander verglichen.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Auswertung beim Growth Inhibition Assay (GIA) und beim Long-term In Vitro Viability Assay (LtVA) direkt durch die Auszählung der Trypanosomen. Die Trypanosomenkulturen werden beim GIA für 24 oder 48 Stunden in unterschiedlichen Trypanozidverdünnungsstufen inkubiert. Danach lässt sich aus der Trypanosomenkonzentration die Effektive Dosis bzw. die Minimale Effektive Konzentration berechnen (KAMINSKY & BRUN, 1993). Dieser Test ist zwar schnell und ohne großen Extrageräteaufwand zu bewerkstelligen; eine Expositionszeit von 24 Stunden ist zur vollen Wirkungsentfaltung mancher Trypanozide aber möglicherweise zu kurz. Der LtVA beansprucht wesentlich längere Zeit, wodurch auch Wechsel des Kulturmediums nötig werden. Zur Resistenzbeurteilung werden dabei täglich Wachstum und Morphologie der Trypanosomen *in vitro* beurteilt (KAMINSKY *et al.*, 1989; ZWEYGARTH *et al.*, 1991b; KAMINSKY & BRUN, 1993).

Alle genannten Testsysteme wurden mehrheitlich zur Untersuchung bekannter, an Kulturbedingungen adaptierter Trypanosomenpopulationen eingesetzt. Von PELLMANN (1999) wurde die DIM-Empfindlichkeit von *T. brucei*-Feldisolaten mit zwei unterschiedlichen *in vitro* Systemen (HIA und LtVA) analysiert. Als Hauptproblem erwies sich neben dem aufwendigen Testaufbau die Interpretation der gewonnenen Daten. Bei vielen untersuchten Feldisolaten lagen die Untersuchungswerte genau zwischen den Referenzwerten der sensitiven und resistenten Referenzstämme, sodass ihre Beurteilung unmöglich war (PELLMANN, 1999). Bei einer weiteren Studie zur Bestimmung der ISMM-Empfindlichkeit von *T. brucei*-Feldisolaten gelang mit dem LtVA eine eindeutige Beurteilung, während anhand des HIA selbst die resistenten und sensitiven Referenzstämme nicht unterschieden werden konnten (SCHEER, 2001).

### **2.7.3 ISMM-ELISA**

Ein quantitativer ISMM-ELISA zur Bestimmung der ISMM-Serumkonzentration wurde zum indirekten Nachweis chemoresistenter Trypanosomen in Kombination mit einem diagnostischen Test entwickelt. Die Untersuchung einer sehr großen Probenzahl ist damit innerhalb kurzer Zeit möglich (EISLER *et al.*, 1993). Außerdem ist der Test gegenüber den bisher vorgestellten Nachweismethoden weniger zeit- und kostenaufwendig. KINABO (1993) begrüßte die Entwicklung des ISMM-ELISA insbesondere aufgrund des bislang mangelnden Einblicks in die Verteilungskinetik der trypanoziden Wirkstoffe.

Bei der Untersuchung künstlich und natürlich infizierter Rinder mit dem ISMM-ELISA wurden in Verbindung mit einer sensitiven parasitologischen Untersuchungsmethode bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt (EISLER *et al.*, 1993). Der Test erlaubt eine spezifische und sensitive (bis in den Subnanogrammbereich) Bestimmung der ISMM-Serumkonzentrationen. Die Verfolgung des Serumspiegels über die gesamte Behandlungsperiode wird dadurch gewährleistet und die Erkennung von beeinflussenden Faktoren ermöglicht. Auf die Existenz resistenter Trypanosomen wird bei einer Diagnose von Trypanosomeninfektionen bei einer ISMM-Konzentration von  $>0,4$  ng/ml geschlossen. Dieser Wert wurde anhand experimentell infizierter Rinder mit Trypanosomenisolaten unterschiedlicher Resistenzgrade bestimmt. Je höher der ISMM-Serumspiegel, bei welchem noch Parasiten diagnostiziert werden, desto höher wird der Grad ihrer Resistenz mit dem ISMM-ELISA eingestuft (EISLER *et al.*, 1997). Nach intramuskulärer Applikation von ISMM wurden allerdings große individuelle Variationen der ISMM-Serumspiegel festgestellt (EISLER, 1996). Interessanterweise sinken die Wirkstoffkonzentrationen bei den mit resistenten Trypanosomen infizierten Rindern schneller, als bei den Rindern, welche mit sensitiven Trypanosomen infiziert wurden (EISLER *et al.*, 1994).

Gegenwärtig können mit dem Test noch keine Aussagen bezüglich der Resistenz beim Einzeltier getroffen werden; auf Herdenbasis ist aber eine tendenzielle Bestimmung der

Resistenzsituation möglich. Bislang fehlt es noch an Massenuntersuchungen zur Beurteilung von Trypanozidresistenzen, sowie an Untersuchungen der Korrelation von ISMM-Serumkonzentrationen und dem Infektionsschutz vor Trypanosomen.

#### 2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ist die PCR zur frühen Erkennung von Behandlungserfolgen bzw. -versagen der Nagana nach Prophylaxe oder Therapie geeignet. Eine korrekte Diagnose resistenter Trypanosomen setzt allerdings eine korrekte Behandlung der Tiere (Trypanoziddosierung und -applikation) voraus.

Bei einem experimentell mit *T. evansi* infizierten Kalb in Thailand gelang der parasitologische Nachweis von Trypanosomen vom vierten bis zum sechsten Tag p.i. und noch einmal am zehnten Tag p.i., während die PCR vom zweiten Tag an positiv war. Zwölf Stunden nach der DIM-Behandlung des Kalbes am 15 Tage p.i., verschwanden die PCR-Signale ganz (WUYTS *et al.*, 1994). Bei Mäusen, die mit dem infizierten Kälberblut inokuliert worden waren, verschwanden die PCR-Signale sechs bis zwölf Stunden nach der DIM-Gabe. Hierbei konnte der mikroskopische Nachweis von Trypanosomen bis zu drei Stunden nach der Behandlung geführt werden (WUYTS *et al.*, 1994).

Eine Studie mit vier experimentell mit *T. brucei* infizierten Rindern in Uganda demonstrierte die Überlegenheit der PCR über die HCT und m-AECT bei der Diagnose von Behandlungsversagen nach der Therapie mit DIM (CLAUSEN *et al.*, 1999). Die täglich nach der Behandlung entnommenen Blutproben wurden mit den drei genannten Methoden untersucht. Keine der Proben war mit der HCT bzw. m-AECT positiv. Bei zwei der vier therapierten Rinder verschwanden die PCR-Signale drei bzw. vier Tage nach der Behandlung einhergehend mit einer deutlichen Verbesserung des Gesundheitszustandes. Bei den beiden anderen Rindern zeigten mehrere der Blutproben nach der Behandlung ein positives PCR-Ergebnis einhergehend mit einer klinischen Verschlechterung mit ZNS-Symptomatik, welche schließlich zum Tod der Tiere führte. Alle positiven PCR-Ergebnisse wurden mit spezifischen DNA-Sonden bestätigt; darüber hinaus reagierten mehrere der PCR-negativen Proben positiv bei der Hybridisierung.

Die zwei Fälle von Behandlungsversagen waren hier wahrscheinlich auf die ZNS-Beteiligung der Erkrankung zurückzuführen. Die in das ZNS ausgewanderten Trypanosomen sind für das DIM, welches die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, unerreichbar. Nach dem Abfall der Wirkstoffkonzentration im Blut wird das Gefäßsystem erneut besiedelt (CLAUSEN *et al.*, 1999).

In einer nachfolgenden Studie wurde die PCR zur Überprüfung des Behandlungserfolges natürlich infizierter Rinder mit ISMM eingesetzt (CLAUSEN *et al.*, 2001). Vor der ISMM-Behandlung (1mg/kg KGW) von 486 Rindern aus 50 zufällig ausgewählten Milchbetrieben

um Kampala, Uganda, betrug die Trypanosomen-Prävalenz 18,9% mit der HCT und/oder mAECT. Bei der mit der PCR untersuchten Stichprobe (181) waren 34,8% der Proben positiv. Bei den Folgeuntersuchungen im ersten, zweiten und dritten Monat nach der ISMM-Behandlung war die mit der HCT und/oder mAECT ermittelte Prävalenz auf 0,4% bzw. 0,7% bzw. 3,2% gesunken. Die PCR bestätigte die parasitologischen Ergebnisse - keine der aparasitämischen Blutproben war PCR-positiv. Die ersten positiven PCR-Ergebnisse tauchten erst nach Ablauf von drei Monaten nach der Behandlung auf. Diese Ergebnisse spiegeln eine hohe ISMM-Sensitivität der Trypanosomenpopulationen im Untersuchungsgebiet wieder, was auch in zusätzlichen *in vivo*- und *in vitro*-Tests zur Chemoresistenz Bestätigung fand (CLAUSEN *et al.*, 2001).

Eine weitere Studie zur Überprüfung des Therapieerfolges mit der PCR wurde mit experimentell infizierten Schafen (mit *T. congolense* savannah, *T. congolense* forest und *T. vivax*) in Burkina Faso durchgeführt (BENGALY *et al.*, 2001). Dabei wurden die PCR-Ergebnisse mit den Ergebnissen eines AK-ELISA und der BCT verglichen. Ein bis zwei Tage nach der Behandlung der Schafe mit DIM verschwanden die PCR-Signale einhergehend mit einem Abfall der AK-Spiegel und einer Erhöhung des Hämatokritwertes. Während mit der PCR nach 19 Tagen Behandlungsversagen bei einem der Tiere diagnostiziert wurde, waren mit der BCT erst 42 Tage später bei diesem Tier Parasiten identifizierbar. Bei diesem Tier war es auch zu keinem Abfall des AK-Spiegels gekommen. Im Verlauf war zweimal eine Parasitämie mit der BCT feststellbar, wogegen mit der PCR mehrfach positive Ergebnisse erzielt wurden. BENGALY *et al.* (2001) schlugen vor, die PCR in Kombination mit dem AK-ELISA zum Monitoring von Kontrollprogrammen mit Trypanozideinsatz zu nutzen.

Abgesehen von der Studie in Uganda, wo die PCR zur Überprüfung des Behandlungserfolges mit ISMM in einem Gebiet mit sensitiven Trypanosomenpopulationen eingesetzt worden war, existieren bislang keine weiteren Felduntersuchungen. In der vorliegenden Dissertation wurden Proben von natürlich infizierten Rindern aus einem Endemiegebiet in Burkina Faso mit Auftreten von Chemoresistenzen analysiert.

## 2.8 BURKINA FASO

Burkina Faso ist ein in der Sahelzone Westafrikas gelegenes Land mit französischer Kolonialvergangenheit, welches 1960 die Unabhängigkeit erlangte. Bis 1984 trug die heutige Republik den Namen Obervolta.

Bei der dritten Volkszählung in Burkina Faso im Jahr 1996 wurden 10.469.747 Landes-einwohner gezählt. Die Schätzung für das Jahr 2000 beläuft sich ausgehend von einer gleichbleibenden Wachstumsrate auf etwa 12 Millionen Menschen (JEUNE AFRIQUE, 1998). Die Population des Landes setzt sich aus zahlreichen ethnischen Gruppen zusammen (ca. 50% Mossi, 10% Fulbe/Peulh, je 5-8% Mandé, Dagara-Lobi, Bobo-Bwamu, Senoufo, Gourmantché u.a., 3% Tuareg), wovon 40-65% Anhänger von Naturreligionen sind, während sich 25-50% zum Islam und 10-15% zum Christentum bekennen (MUNZINGER ARCHIV, 1997). Mit einem Jahres-Pro-Kopf-Einkommen von ca. 230 US\$ (1995) zählt Burkina Faso zu den Least Developed Countries und rangiert gegenwärtig auf Stelle 172 der 174 betroffenen Länder (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1995; COUNTRYWATCH, 2002). Das Wirtschaftsleben des Landes wird in hohem Maße durch Subsistenzwirtschaft bestritten. Mehr als 80% der Bevölkerung leben von der Land- und Forstwirtschaft und der Fischerei. Diese Aktivitäten machen allerdings nur etwa 40% des Bruttoinlandsprodukts aus (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1995). Lebendvieh, sowie Häute und Felle, sind neben Baumwolle und Gold die wichtigsten Exporterzeugnisse des Landes. Trotz der weitgehend gesicherten Selbstversorgung besteht unter anderem Abhängigkeit von Nahrungsmittelimporten und Nahrungsmittelhilfen. Die Ernährungssicherung und die Erhöhung des Lebensstandards der bäuerlichen Bevölkerung gehören zu erklärten Zielen der Agrarpolitik des Landes (NAGALO, 1997). Der Verfolgung dieser Ziele stehen wachsende Umweltprobleme, wie Desertifikation, Überweidung, Raubbau am Wald und Bodenerosion, entgegen. Außerdem ist die Ausschöpfung des Bodens mit einer Nutzbarkeit der Landfläche von 13% als Acker- und 22% als Weideland limitiert (MUNZINGER ARCHIV, 1997).

### 2.8.1 Lage, Klima und Vegetation

Das westafrikanische Binnenland Burkina Faso grenzt im Westen und Norden an Mali und im Nordosten an den Niger, während die Grenzen im Südosten und Süden gemeinsam mit dem Benin, Togo, Ghana und der Côte d'Ivoire verlaufen. Die Landesfläche von 274.000 km<sup>2</sup> erstreckt sich zwischen 9° 40' und 15° nördlicher Breite und 5° 50' westlicher und 2° 40' östlicher Länge; die durchschnittliche Höhenlage liegt zwischen 200 m und 500 m über dem Meeresspiegel (MUNZINGER ARCHIV, 1997).

Das Klima wechselt saisonal zwischen Regen- und Trockenzeit, wobei die Trockenzeit in nördlicher Richtung zunehmend länger anhält.

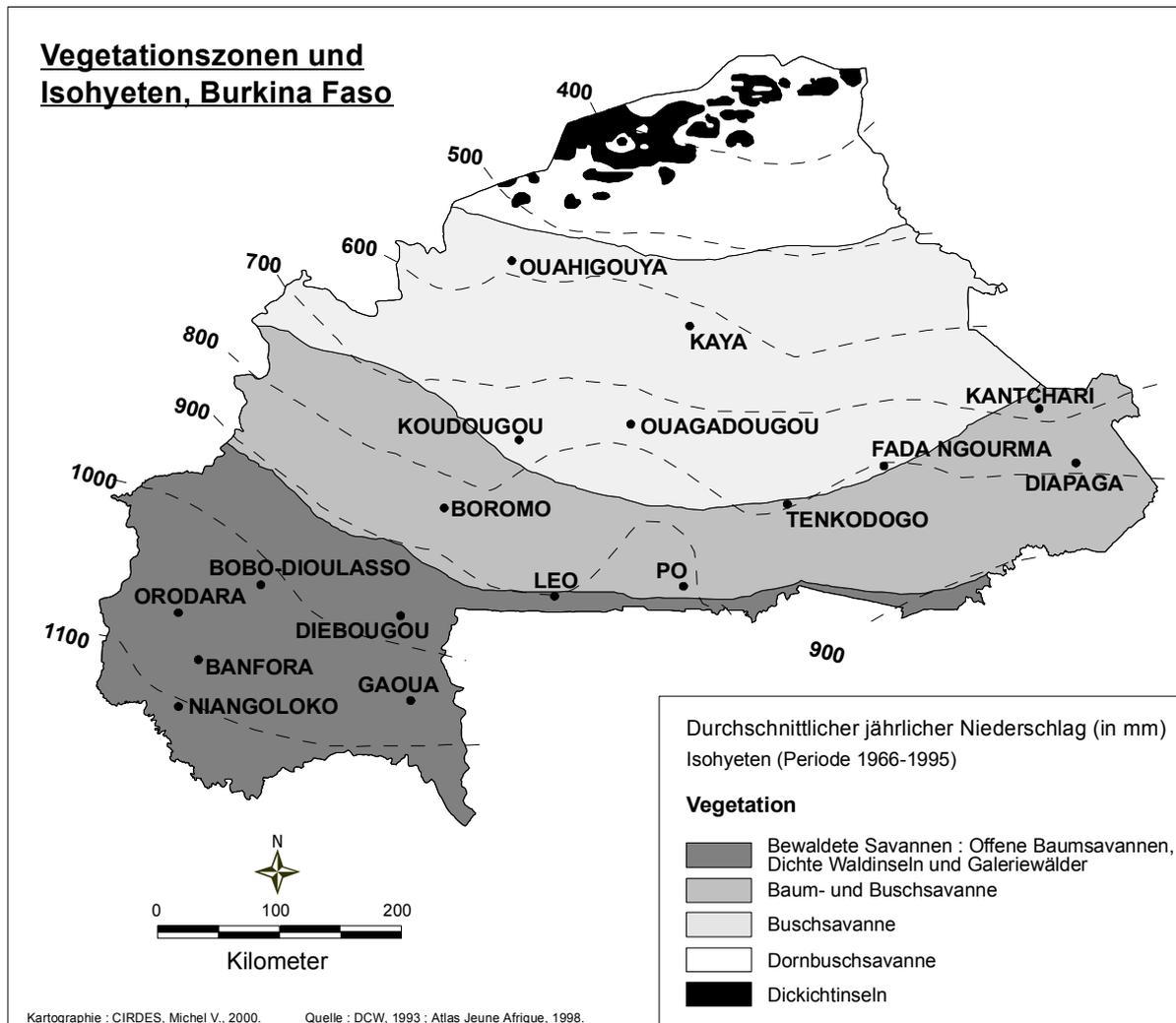


Abb. 2.5: Vegetationszonen und Isohyeten in Burkina Faso

Aufgrund dieser klimatischen Bedingungen sind in Burkina Faso drei Vegetationszonen ausgeprägt: Im Norden die Sahelzone, welche teilweise in Halbwüsten übergeht, mit über 260 Tagen jährlicher Trockenzeit und Niederschlägen von 400 - 500 mm. Hier dominiert die Dornstrauchsavanne, die durch überwiegend kleinwüchsige Bäume und dornige zumeist spärlich beblätterte Büsche charakterisiert ist. In der Landesmitte befindet sich die nördliche Sudanzone und im Südwesten und Süden die südliche Sudanzone mit jeweils sieben Monaten Trockenzeit und ca. 850 mm bzw. 1000 - 1300 mm jährlichen Niederschlägen (MUNZINGER ARCHIV, 1997; JEUNE AFRIQUE, 1998). Im Vergleich zur Sahelzone ist die Vegetationsdecke der nördlichen Sudanzone dichter und wird von einem heterogenen Muster aus offenen Savannen und Baum- oder Buschsavannen gebildet. In der südlichen Sudanzone fördert der höhere Regenfall das Wachstum von Hölzern, deren Dichte, Artenreichtum und Höhe wesentlich größer ist, als in den beiden nördlicheren Zonen. Die meisten Pflanzenspezies der nördlichen Sudanzone werden hier ebenfalls gefunden,

während die im Sahel vorkommenden kaum noch anzutreffen sind. Charakteristisch für diese Zone sind offenes Baumland, bewaldete Savannen, Galeriewälder entlang von Flussläufen und schließlich einige dichte Waldinseln.

### **2.8.2 Bedeutung der Rinderhaltung in Burkina Faso**

Die Gesamtzahl der Rinder in Burkina Faso lag nach einer Schätzung aus dem Jahr 1994 bei 4.261.000 (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1995). Die Milch- und Rindfleischproduktion betrugen zu dieser Zeit 125.000 bzw. 40.000 Tonnen. Ferner wurden 6.583 Tonnen Rinderhäute verarbeitet.

Burkina Faso ist Erzeugerland und Transitland für die Vermarktung von Lebendvieh. Rund 14% des Exports (JEUNE AFRIQUE, 1996) basiert alleine auf dem Handel mit Rindern (10,2% lebende Tiere und Fleisch, 3,7% Leder und Häute). Die traditionellen Viehzüchter werden überwiegend im Norden des Landes angetroffen, wo auch die meiste Transhumanz betrieben wird. Die Hauptabsatzmärkte für Rinder liegen in den südlichen Küstenländern Côte d'Ivoire, Ghana, Togo und Benin.

Die kaum mechanisierte Landwirtschaft ist fast vollständig auf tierische Zugkraft angewiesen. Die meisten der sesshaften Ackerbauern sind in den semiariden und subhumiden Gebieten im Süden und Südwesten des Landes angesiedelt, wo auch die meisten Zugtiere gehalten werden.

### **2.8.3 Bedeutung der Trypanosomose für die Rinderproduktion**

Drei Unterarten der 22 bekannten Tsetsefliegenarten kommen in Burkina Faso vor: Die zur Morsitans-Gruppe gehörende Subspezies *Glossina morsitans submorsitans* Newstead (1910) und die beiden zur Palpalis-Gruppe gehörenden Subspezies *Glossina palpalis gambiensis* Vanderplank (1949) und *G. tachinoides* Westwood (1850). Sie sind vornehmlich in den niederschlagsreichen Gebieten im Süden und Südwesten des Landes verbreitet. Die Nagana stellt dort ein besonders hohes Risiko für die ortsansässige Rinderhaltung dar. Dennoch wurde die Umsiedlung von Pastoralisten aus den nördlichen von Dürre bedrohten Gebieten in diese fruchtbaren Regionen in den vergangenen 10-15 Jahren regierungsseitig gefördert. Derzeit stehen etwa 2,7 Millionen Rinder oder 63% des nationalen Rinderbestandes unter Trypanosomoserisiko (KAMUANGA *et al.*, 2001). Betroffen sind darüber hinaus die durchziehenden Herden aus dem Norden des Landes, sowie aus Mali und dem Niger, auf ihrem Weg zu den Absatzmärkten in die Küstenländer. In Burkina Faso betragen die gegenwärtigen Ausgaben der Viehhalter für Trypanozide 70 bis 75% der jährlichen Ausgaben für Tierarzneimittel (OUÉDRAOGO, 2001). Mit dem nachweislichen lokalen Auftreten von Trypanozidresistenzen (Banankeledaga 1984 und Samorogouan 1984,

1992) hat das Ausmaß des Trypanosomoseproblems noch eine zusätzliche Dimension gewonnen (AUTHIE, 1984; CLAUSEN *et al.*, 1992).

In mehreren landwirtschaftlichen Fördergebieten, wie Satiri (1986 - 1995), Samorogouan (1989 - 1995), Padema (1993 - 1998) und Sissili (1993 - 1997) wurden unter Leitung des Centre de Recherche-Developpement sur l'Elevage en Zone Subhumide (CIRDES), Bobo Dioulasso, und aktiver Beteiligung der Tierhalter Programme zur integrierten Tsetse- und Trypanosomosebekämpfung (Kap. 2.5.4) durchgeführt, um die Tierproduktion zu sichern (BAUER *et al.*, 1992, 1995, 1999, KAMUANGA *et al.*, 2001, KAMUANGA, 2001). Die Rinderpopulation umfasste pro Gebiet ca. 8.000 bis 30.000 Tiere. Zebus nahmen dabei den insgesamt höchsten Rasseanteil in den Herden ein. Die Trypanosomoseprävalenzen in den betroffenen Gebieten betrug vor der Bekämpfung zwischen 18 und 78%. Unter diesen Umständen war keine ertragreiche Viehzucht mehr möglich; die Rinderverluste in Satiri und Sissili erreichten bis zu 70% bzw. 85% (BAUER *et al.*, 1999, KAMUANGA *et al.*, 2001). Nach Durchführung der Kontrollprogramme, welche i.d.R. aus Tsetsebekämpfungsmaßnahmen am Tier (Pour-on und/oder Spray mit Flumethrin 1% oder Deltamethrin 1%) und in der Umwelt (Targets), sowie der Behandlung klinisch erkrankter Tiere bestanden, waren die Prävalenzen auf Werte zwischen 0 und 5,2% gesunken. Die suboptimale Organisation und Interessenkonflikte der Tierbesitzer und der verschiedenen beteiligten Institutionen, die geringe Kostendeckung hinsichtlich der Targets und andere Faktoren führten jedoch zu mangelnder Nachhaltigkeit der erfolgreich durchgeführten Maßnahmen (KAMUANGA, 2001).