

**Aus der Tropenmedizinischen Abteilung  
der Missionsärztlichen Klinik Würzburg  
Chefarzt Priv.-Doz. Dr. A. Stich**

**Wertigkeit von Immunfluoreszenz und Polymerasekettenreaktion  
in der Diagnose und klinischen Bewertung  
bei der Afrikanischen Trypanosomiasis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Alexander Pablo Querfurt  
aus  
Essen

Würzburg, Dezember 2007

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. A. Stich  
**Koreferent:** Prof. Dr. K. Brehm  
**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2008

Der Promovend ist Arzt.

Meinen lieben Eltern.

„Das Wenige, das du tun kannst, ist viel.“

Albert Schweitzer (1875 - 1965)

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>  | <b>IV</b> |
| <b>ALLGEMEINE HINWEISE ZUM SPRACHGEBRAUCH .....</b>   | <b>VI</b> |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Sinnggebung dieser Arbeit .....   | 1         |
| 1.2 Geschichte der Schlafkrankheit.....   | 2         |
| 1.3 Biologie und Transmission der Trypanosomen.....   | 3         |
| 1.4 West- und ostafrikanische Form der Schlafkrankheit .....                                    | 4         |
| 1.5 Klinik, Diagnose und Therapie der Schlafkrankheit .....                                     | 5         |
| 1.5.1 Klinik der Schlafkrankheit.....   | 5         |
| 1.5.2 Diagnose der Schlafkrankheit.....   | 6         |
| 1.5.3 Therapie der Schlafkrankheit.....   | 8         |
| 1.6 Die Schlafkrankheit in Angola im Rahmen der sozioökonomischen Bedingungen.....              | 8         |
| <b>2 STAND DER FORSCHUNG, FRAGESTELLUNG UND STUDIENDESIGN .....</b>                             | <b>11</b> |
| 2.1 Stand der Forschung und Fragestellung .....   | 11        |
| 2.1.1 Diagnose der HAT und PCR-Nachweise von Trypanosomen-DNA .....                             | 11        |
| 2.1.2 Antikörperspiegel von Trypanosomiasis-Patienten.....                                      | 13        |
| 2.1.3 Methodik des IFT .....  | 16        |
| 2.2 Studiendesign .....   | 17        |
| <b>3 MATERIALIEN, PATIENTEN UND METHODEN.....</b>   | <b>20</b> |
| 3.1 Materialien.....  | 20        |
| 3.1.1 Chemikalien .....   | 20        |
| 3.1.2 Geräte .....  | 20        |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....   | 20        |
| 3.1.4 Antihuman-Antikörper, Enzyme, Oligo- und Desoxynukleotide .....                           | 20        |
| 3.1.5 Puffer, Lösungen und Reaktionsmittel.....   | 21        |
| 3.1.6 Parasiten .....   | 22        |
| 3.1.7 Positiv- und Negativkontrollen & Körperflüssigkeiten für die PCR-Versuche .....           | 23        |
| 3.1.8 Computer, Scanner und Software.....   | 23        |
| 3.2 Patienten und Methoden.....   | 24        |
| 3.2.1 Patienten .....   | 24        |
| 3.2.2 Patientengut.....   | 24        |
| 3.2.3 Klinische Untersuchung der Patienten.....   | 25        |
| 3.2.4 Kultur der Trypanosomen.....  | 26        |
| 3.2.5 PCR.....  | 26        |
| 3.2.5.1 Prinzip der PCR.....  | 26        |
| 3.2.5.2 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Göttingen.....                      | 27        |
| 3.2.5.2.1 Purifikation parasitärer DNA für Positiv- und Negativkontrollen aus Kulturmedium..... | 27        |
| 3.2.5.2.2 Amplifikation der Gene ESAG6 und 7 mittels PCR .....                                  | 28        |
| 3.2.5.2.3 Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese .....           | 28        |
| 3.2.5.2.4 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR .....  | 29        |
| 3.2.5.2.5 PCR-Versuch zur Probenlagerung .....  | 30        |
| 3.2.5.2.6 Vorversuche zur seminested-PCR.....   | 31        |
| 3.2.5.3 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Würzburg.....                       | 32        |
| 3.2.5.3.1 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Kulturmedium ..         | 32        |
| 3.2.5.3.2 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Blut und Liquor ..      | 33        |
| 3.2.5.3.3 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels seminested-PCR .....                             | 33        |
| 3.2.5.3.4 Überprüfung der Spezifität der PCR mittels Toxoplasmen-DNA .....                      | 33        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.2.5.4    | Probenaufbereitung und -analyse .....   | 33        |
| 3.2.5.4.1  | DNA-Purifikation aus Blut- und Liquorproben und Analyse mittels PCR .....           | 33        |
| 3.2.5.4.2  | Probenanalyse mittels seminested-PCR .....  | 34        |
| 3.2.6      | IFT .....   | 34        |
| 3.2.6.1    | Prinzip des IFT .....   | 34        |
| 3.2.6.2    | Vorversuche zum IFT .....   | 35        |
| 3.2.6.2.1  | Beschichtung der Objektträger .....   | 35        |
| 3.2.6.2.2  | Anlegen von Verdünnungsreihen .....   | 36        |
| 3.2.6.2.3  | Schachbrett-Titration .....   | 36        |
| 3.2.6.3    | Versuch zur Probenlagerung .....  | 37        |
| 3.2.6.4    | Probenanalyse mittels IFT .....   | 37        |
| 3.2.6.4.1  | Beschichtung der Objektträger .....   | 37        |
| 3.2.6.4.2  | Anlegen von Verdünnungsreihen .....   | 37        |
| 3.2.6.4.3  | Inkubieren, Waschen und Auswerten .....   | 38        |
| 3.2.6.5    | Positiv- und Negativkontrollen .....  | 38        |
| 3.2.7      | Statistik und Abbildungsnachweis .....  | 38        |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Studienkollektiv .....</b>   | <b>39</b> |
| 4.1.1      | Demographische Basisdaten des Studienkollektives .....                              | 39        |
| 4.1.2      | Diagnostische Tests am Studienkollektiv .....                                       | 39        |
| <b>4.2</b> | <b>Ergebnisse der PCR .....</b>   | <b>41</b> |
| 4.2.1      | Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Göttingen .....                 | 41        |
| 4.2.1.1    | Amplifikation der Gene ESAG6 und 7 mittels PCR .....                                | 41        |
| 4.2.1.2    | Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR .....                                      | 41        |
| 4.2.1.3    | PCR-Versuch zur Probenlagerung .....  | 43        |
| 4.2.1.4    | Vorversuche zur seminested-PCR .....  | 44        |
| 4.2.2      | Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Würzburg .....                  | 44        |
| 4.2.2.1    | Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR .....                                      | 44        |
| 4.2.2.2    | Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Blut und Liquor ..... | 45        |
| 4.2.2.3    | Überprüfung der Spezifität mittels Toxoplasmen-DNA .....                            | 46        |
| 4.2.3      | Probenanalyse mittels PCR .....   | 46        |
| 4.2.3.1    | PCR der Blutproben .....  | 46        |
| 4.2.3.2    | PCR der Liquorproben .....  | 49        |
| 4.2.3.3    | Seminested-PCR der Liquorproben .....   | 51        |
| <b>4.3</b> | <b>Ergebnisse des IFT .....</b>   | <b>52</b> |
| 4.3.1      | Vorversuche des IFT .....   | 52        |
| 4.3.2      | Probenanalyse mittels IFT .....   | 53        |
| 4.3.2.1    | IFT der Serumproben .....   | 53        |
| 4.3.2.2    | IFT der Liquorproben .....  | 55        |
| <b>4.4</b> | <b>Ergebnisse der klinischen Untersuchung .....</b>                                 | <b>58</b> |
| 4.4.1      | Körperliche Untersuchung .....  | 58        |
| 4.4.1.1    | Vollständigkeit der Daten .....   | 58        |
| 4.4.1.2    | Allgemeinzustand .....  | 59        |
| 4.4.1.3    | BMI und Untergewicht .....  | 59        |
| 4.4.1.4    | Temperatur .....  | 60        |
| 4.4.1.5    | Blutdruck .....   | 61        |
| 4.4.1.6    | Puls .....  | 62        |
| 4.4.1.7    | Leber und Milz .....  | 63        |
| 4.4.1.8    | Lymphadenopathie .....  | 64        |
| 4.4.1.9    | Bauchschmerz .....  | 66        |
| 4.4.1.10   | Übersicht über die klinischen Untersuchungsergebnisse .....                         | 67        |
| 4.4.2      | Ergebnisse der Stand- und Ganguntersuchungen .....                                  | 68        |

|            |   |             |
|------------|---|-------------|
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>72</b>   |
| <b>5.1</b> | <b>Diskussion des Studienkollektives</b> .....  | <b>72</b>   |
| <b>5.2</b> | <b>Diskussion der PCR-Versuche</b> .....  | <b>72</b>   |
| 5.2.1      | Methodik und Vorversuche der PCR .....  | 72          |
| 5.2.2      | Rechnerische Nachweisgrenze der PCR.....  | 74          |
| 5.2.3      | Ergebnisse der PCR .....  | 76          |
| 5.2.3.1    | Ergebnisse der PCR der Blutproben .....   | 76          |
| 5.2.3.2    | Ergebnisse der PCR der Liquorproben .....   | 79          |
| 5.2.4      | Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der PCR und Ausblick .....   | 80          |
| <b>5.3</b> | <b>Diskussion der IFT-Versuche und der klinischen Untersuchung</b> .....                                  | <b>82</b>   |
| 5.3.1      | Methodik und Vorversuche des IFT .....  | 82          |
| 5.3.2      | Ergebnisse des IFT und der klinischen Untersuchung .....  | 83          |
| 5.3.2.1    | Ergebnisse des IFT mit Serum .....  | 83          |
| 5.3.2.2    | Ergebnisse der klinischen Untersuchung unter Bezugnahme auf die Ergebnisse des IFT der Serumproben .....  | 86          |
| 5.3.2.3    | Ergebnisse des IFT der Liquorproben .....   | 90          |
| 5.3.2.4    | Ergebnisse der klinischen Untersuchung unter Bezugnahme auf die Ergebnisse des IFT der Liquorproben ..... | 91          |
| 5.3.3      | Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des IFT und der klinischen Untersuchung und Ausblick .....         | 92          |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>94</b>   |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>96</b>   |
|            | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>VII</b>  |
|            | <b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....  | <b>VIII</b> |
|            | <b>ANNEX I: EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNGSFORMULAR</b> .....  | <b>IX</b>   |
|            | <b>ANNEX II: LISTE DER CHEMIKALIEN</b> .....  | <b>X</b>    |
|            | <b>ANNEX III: LISTE DER GERÄTE</b> .....  | <b>XI</b>   |
|            | <b>ANNEX IV: LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN</b> .....  | <b>XIII</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| µM                | mikromolar   |
| Ag                | Antigen  |
| AK                | Antikörper   |
| Aqua bidest.      | <i>Aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)   |
| Aqua dest.        | <i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)  |
| AZ                | Allgemeinzustand   |
| BMI               | <i>body mass index</i>   |
| BNI               | Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg  |
| bp                | <i>base pairs</i> (Basenpaare)   |
| <i>buffy coat</i> | Leukozyten- bzw. Intermediärschicht von zentrifugiertem Vollblut   |
| bzw.              | beziehungsweise  |
| ca.               | circa  |
| CATT              | <i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>   |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTPs             | Desoxynucleotidtriphosphate  |
| DSR               | <i>desired specific reaction</i> (gewünschte spezifische Reaktion)   |
| DXSR              | <i>cross-reaction</i> (Kreuzreaktion)  |
| ELISA             | <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>   |
| EMEM              | <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>  |
| ESAG              | <i>expression-site-associated gene</i>   |
| <i>et al.</i>     | <i>et alteri</i> (und andere)  |
| etc.              | <i>et cetera</i> (und so weiter)   |
| FITC              | Fluorescein Isothiocyanat  |
| HAT               | <i>human African trypanosomiasis</i> (Schlafkrankheit)   |
| HCT               | <i>hematocrit centrifugation technique</i> (Kapillazentrifugation)   |
| ICCT              | <i>Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomíase</i> (Institut zur Bekämpfung und Kontrolle der Schlafkrankheit) |
| IFT               | Immunfluoreszenz-Test  |
| Ig                | Immunglobulin  |
| IHA               | indirekte Hämagglutination   |
| IU                | <i>international unit</i> (internationale Einheit)   |
| J                 | (Lebens-)Jahre   |
| KG                | Körpergewicht  |
| KI                | Konfidenzintervall   |
| Liquor            | <i>Liquor cerebrospinalis</i>  |
| LK                | Lymphknoten  |
| LKP               | Lymphknotenpunktion  |



|               |   |
|---------------|---|
| M             | molar   |
| mAECT         | <i>mini-anion exchange column (centrifugation) technique</i>  |
| max.          | maximal   |
| mHCT          | <i>microhematocrit centrifugation technique</i>   |
| min           | Minute  |
| mM            | millimolar  |
| mRNA          | <i>messenger RNA</i>  |
| MSF           | <i>Médecins Sans Frontières</i> (Ärzte ohne Grenzen)  |
| NSR           | <i>Nonspecific reaction</i> (nicht spezifische Reaktion)  |
| NGO           | <i>Non-governmental organisation</i> (Nichtregierungsorganisation)  |
| PBS           | <i>Phosphate-buffered saline</i>  |
| PCR           | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)   |
| QBC           | <i>quantitative buffy coat technique</i>  |
| RES           | retikuloendotheliales System  |
| RF            | Rheumafaktor  |
| RNA           | Ribonukleinsäure  |
| rpm           | Umdrehungen pro Minute  |
| RR            | Blutdruck gemessen nach Riva-Rocci  |
| s.            | siehe   |
| <i>spp.</i>   | <i>species</i>  |
| STZG          | Seiltänzergang  |
| syst.         | systolisch  |
| <i>T.b.</i>   | <i>Trypanosoma brucei</i>   |
| <i>T.b.b.</i> | <i>Trypanosoma brucei brucei</i>  |
| <i>T.b.g.</i> | <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>   |
| <i>T.b.r.</i> | <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>   |
| tw.           | teilweise   |
| U             | <i>units</i> (Einheiten)  |
| u. a.         | unter anderem   |
| u/o           | und / oder  |
| UDSR          | <i>undesired specific reaction</i> (ungewünschte spezifische Reaktion)  |
| UN            | <i>United Nations</i> (Vereinte Nationen)   |
| UNITA         | <i>União Nacional para a Independência Total de Angola</i> (Nationale Union für die völlige Unabhängigkeit Angolas) |
| VAT           | Variable Antigen-Typen  |
| VSG           | <i>variant surface antigen glycoproteins</i>  |
| WHO           | Weltgesundheitsorganisation   |
| z.B.          | zum Beispiel  |
| ZNS           | zentrales Nervensystem  |

Außerdem wurden die chemischen Elementsymbole und gängigen Abkürzungen des metrischen Systems verwendet.

## **Allgemeine Hinweise zum Sprachgebrauch**

In der vorliegenden Arbeit wird nur die maskuline Form verwendet, welche inhaltlich sowohl männliche als auch weibliche Individuen einschließen soll. Dies geschieht der Einfachheit und Kürze halber und ist in keiner Weise diskriminierend gemeint.

Um den äußerst fragwürdigen Begriff „Entwicklungsländer“ zu umgehen wird nachfolgend von „den Ländern des Südens“ gesprochen.

Im Text sind Zahlen bis zwölf zugunsten besserer Lesbar- und Verständlichkeit absatzweise entweder als numerische Zahl oder als Wort geschrieben.

Der in der Arbeit benutzte Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben wird in manchen Statistikbüchern auch als Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test (kurz: U-Test) oder als Wilcoxon-Rangsummentest (kurz: Wilcoxon-Test) bezeichnet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Sinngebung dieser Arbeit

Die Schlafkrankheit oder afrikanische Trypanosomiasis (*human African trypanosomiasis* = HAT) ist eine der am meisten vernachlässigten Krankheiten überhaupt [108]. Nachdem ihre Ausbreitung in den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts in vielen Ländern gut kontrolliert war, hat sie nun wieder Ausmaße einer größeren Epidemie angenommen. In vielen der betroffenen Regionen führte dies zu einer Krise der öffentlichen Gesundheitslage (*public health crisis*) [86]. So sind heutzutage schätzungsweise bis zu 500.000 Personen in 36 Ländern weltweit betroffen, wobei die Gesamtinzidenz ca. 50.000 neue Fälle pro Jahr beträgt [91, 106]. Dem Risiko einer Infektion scheinen insgesamt sogar fast 60 Millionen Menschen ausgesetzt zu sein, wobei durch die derzeitigen Kontrollprogramme nur ca. vier Millionen überwacht werden [107]. Die Schlafkrankheit liegt in der weltweiten Rangliste der *disability-adjusted life years lost* (DALYS) aller parasitären Erkrankungen nach Malaria und lymphatischer Filariasis auf Platz drei [13].

Da die Erkrankung in den ärmsten Gegenden von manchen der wirtschaftlich schwächsten Länder der Welt vorkommt, sind die Etablierung und Implementierung von effektiven Kontrollprogrammen mit großen Schwierigkeiten verbunden. Besonders der fehlende Zugang zu Gesundheitseinrichtungen für die Bevölkerung in ruralen Gebieten erschwert substantiell das Prozedere von Fallfindung, Behandlung und Nachsorge. Als Folge dessen wird geschätzt, dass nur 10% der von der Krankheit Betroffenen eine geeignete Behandlung erfahren. In vielen derzeit von dem Wiederaufflammen der Schlafkrankheit betroffenen Ländern übersteigen die notwendigen Kontrollmaßnahmen die Kapazitäten der verantwortlichen Regierungsinstitutionen. Ursache hierfür ist u. a. die Kombination aus fehlenden Geldmitteln, politischer Instabilität und die aufgrund von unzureichender Bezahlung, schlechten Arbeitsbedingungen und Missmanagement nachlassende Motivation der Fachkräfte [2]. Neben dem immensen Ausmaß an menschlichem Leiden und den entstehenden sozialen Folgen wird aber auch der Viehbestand von der Schlafkrankheit betroffen. Dies führt nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) global zu einem jährlichen wirtschaftlichen Verlust von ca. 4,5 Milliarden US-Dollar [108].

Trotz dieser erschreckenden Fakten sind die Forschungsaktivitäten zu Diagnose, Kontrolle und Therapie der Krankheit katastrophal niedrig: Weniger als 1/7 aller Studien über die Schlafkrankheit gehen auf diese Bereiche ein, denn Trypanosomen werden in der heutigen wissenschaftlichen Gesellschaft eher als Objekt der Grundlagenforschung angesehen [91]. So zählen diese Parasiten zu den am meisten erforschten Organismen überhaupt. Zahlreiche molekularbiologische Mechanismen wurden an ihnen zuerst beschrieben oder im Detail geklärt. Hierzu zählen u. a. die Antigenvariation, das Trans-Spleißen, die Polyadenylierung

und das Editieren von RNA. Leider haben sich jedoch daraus allzu oft keine Ergebnisse ergeben, die konkret die Praxis der Bekämpfung der Krankheit stärken [92].

Obwohl die Erkrankung ohne Behandlung immer letal verläuft und die derzeit bekannten wirksamen anti-trypanosomalen Medikamente mit starken Nebenwirkungen bis hin zu der Gefahr des Todes der behandelten Patienten verbunden sind, wird kaum Forschung an neuen Therapien betrieben. Da die Krankheit fast ausschließlich wirtschaftlich arme Afrikaner ländlicher Gebiete betrifft und der Absatzmarkt für die Pharmaindustrie daher noch nicht einmal die Amortisierung der Forschungskosten erwarten lässt [40], verwundert es aus rein ökonomischer Sicht nicht, dass seit über 20 Jahren kein neues anti-trypanosomales Medikament mehr auf den Markt gekommen ist [92]. Im Gegenteil: Auch die bisher verfügbaren Standard-Medikamente drohten bis vor wenigen Jahren aus Rentabilitätsgründen ganz aus der Produktpalette der Pharmazeutischen Industrie zu verschwinden. Nachdem in den 90er Jahren noch der Produktionsstopp von mehreren anti-trypanosomalen Präparaten geplant war, konnte ab Ende 2001 durch eine *Public-Private-Partnership-Initiative* der WHO mit den jeweiligen Firmen Einigung über die kostenlose Bereitstellung der essentiellen Schlafkrankheits-Medikamente erzielt werden. Die Planung der Verteilung dieser Arzneimittel übernimmt seitdem die WHO, während die Logistik von „Ärzte ohne Grenzen“ (MSF) durchgeführt wird [90].

Derweil klafft die globale Schere zwischen arm und reich immer mehr auseinander und internationale Zielsetzungen wie die globale Armutshalbung bleiben in der Umsetzung oft weit hinter den Erwartungen zurück. Vor dem Hintergrund des wechselseitigen Zusammenhanges von Armut und Krankheit führt die Bekämpfung von Krankheiten nicht nur zum gesundheitlichen Wohl des Einzelnen, sondern schafft oft auch erst eine der Basis-Voraussetzungen für eine soziale und wirtschaftliche Stabilisierung der Gesellschaft in den Ländern des Südens. Neben den unverzichtbaren alltäglichen Fallsuchen und Behandlungsmaßnahmen vor Ort besteht jedoch auch die Notwendigkeit verbesserter Kontroll-, Diagnostik- und Therapiemethoden, um den Kampf gegen diese schreckliche Krankheit eines Tages gewinnen zu können. Diese Arbeit möchte einen kleinen Teil dazu beitragen.

## 1.2 Geschichte der Schlafkrankheit

T. M. Winterbottom (1765 - 1859) beschrieb im Jahre 1803 in Sierra Leone eine fieberhafte Erkrankung, welche mit zervikaler Lymphadenopathie und Lethargie assoziiert war. Ungefähr 50 Jahre später brachte David Livingstone (1813 - 1873) die Tsetsefliege (*Glossina* spp.) mit der Transmission der Nagana-Seuche in Verbindung, einer Krankheit, die zum massenhaften Sterben von importierten europäischen Rindern auf den Weideflächen des subsaharischen Afrikas führte. Im Jahre 1894 machte schließlich David Bruce (1855 - 1931) im heutigen Südafrika Parasiten der Gattung *Trypanosoma* als infektiöses Agens der Nagana-

Seuche aus. Acht Jahre später wurde von J. Dutton (1874 - 1905) und J. Todd (1876 - 1949) der Beweis geführt, dass die Infektion mit Trypanosomen für die von Winterbottom beschriebene Krankheit, die fortan Trypanosomen-Fieber genannt wurde, verantwortlich war. Erneut war es D. Bruce, der in Uganda zeigte, dass diese Parasiten nicht nur zu einzelnen Fällen des Trypanosomen-Fiebers führten, sondern „gleichfalls“ die in epidemischer Form auftretende *Negro Lethargy* auslösten. Er bewies mit seinen Arbeiten, dass in beiden Fällen tatsächlich ein und dieselbe Infektion vorlag und diese durch den Stich von infizierten Tsetsefliegen übertragen wurde. Ihm zu Ehren wurden später die afrikanischen Formen der Trypanosomen mit dem Speziesnamen „*brucei*“ versehen. Nachfolgend dauerte es jedoch noch mehrere Jahre, bis die zwei heutzutage bekannten humanpathogenen Formen *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) und *rhodesiense* (*T.b.r.*) identifiziert wurden [13].

### 1.3 Biologie und Transmission der Trypanosomen

Die Schlafkrankheit wird von einem einzelligen, extrazellulären Protozoon der Gattung *Trypanosoma* hervorgerufen. Trypanosomen sind eingeißelige Flagellaten der Ordnung *Kinetoplastida*, welche sich durch klonale Teilung vermehren. Als charakteristische Zeichen besitzen sie neben einer Flagelle extranukleäre DNA, welche als zwei miteinander verkettete Ringe (Mini- und Maxi-Ring) eine scheibenförmige Struktur in der Nähe des Geißelbasalkörpers innerhalb der Matrix des einzigen Mitochondriums bilden, den Kinetoplasten.

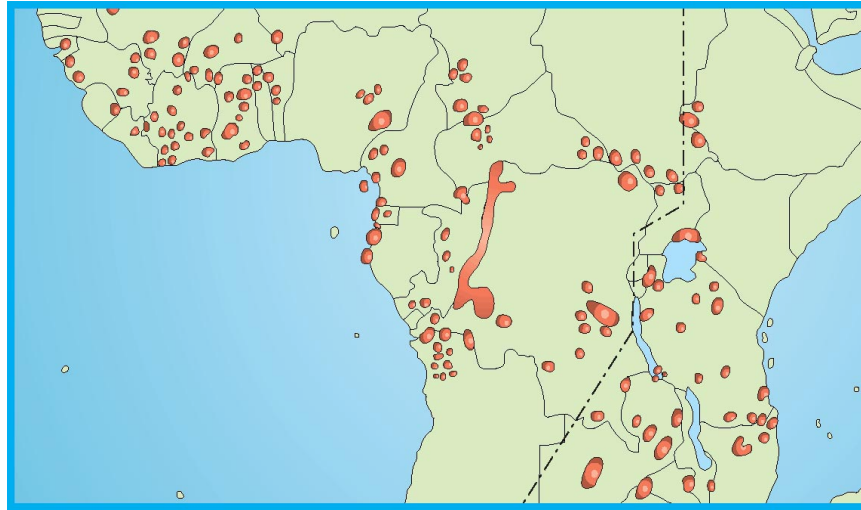
Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch den Stich der Tsetsefliege. Die in Angola vorherrschenden Formen des Vektors sind *Glossina fuscipes* und *Glossina palpalis* [16]. Das Infektionsrisiko ist dabei am Ende der Trockenzeit, wenn der Kontakt zwischen Fliege und Mensch am intensivsten ist, besonders hoch. Während der Lebensphasen der Trypanosomen in Wirt und Vektor kommt es zu zyklischen Veränderungen ihrer Gestalt: Die Trypanosomen gelangen bei der Speichelinjektion durch die Fliege in metazyklischer Form in das Bindegewebe des Menschen. Sie verteilen sich über die Lymph- und Blutbahn im Körper, wobei eine Umwandlung in eine schlanke, teilungsfähige Form (*long slender*) erfolgt. Schließlich entwickeln sich die Parasiten über Zwischenschritte hin zu der gedrungenen Form (*short stumpy*), in der sie sich nicht mehr teilen können. Über einen erneuten Stich können sie in den Mitteldarm der Fliege aufgenommen werden, wo sie die prozyklische Form annehmen. In der Speicheldrüse des Insektes wandeln sich nun die Trypanosomen über die epimastigote wieder in die metazyklische Form um. Kommt es zu einem nochmaligen Stich, hat sich mit der wiederholten Übertragung der Infektions- und Metamorphologie-Zyklus geschlossen [92].

Trypanosomen bieten einen außergewöhnlichen Mechanismus, um als extrazelluläre Parasiten der Immunantwort des Wirtes zu entgehen: Die Parasiten sind von einem 15 Nanometer dicken Außenmantel aus dicht gepackten, veränderlichen Glykoproteinen (*variant surface*

*antigen glycoproteins* = VSG) umkleidet. Kommt es zu einer Infektion, so bildet das wirtseigene Immunsystem Antikörper (AK) gegen diese VSG-Moleküle, da sie das immundominante Antigen der Trypanosomen darstellen [57]. Der Großteil der Parasiten-Population wird damit vernichtet. Einige wenige überleben jedoch, da sie bereits gegenüber ihren Vorläufern veränderte VSG-Moleküle exprimieren. Von den Überlebenden wächst nun eine neue Population heran, gegen deren VSG-Moleküle das menschliche Immunsystem erneut Antikörper bildet. Abermals wird der größte Teil der Trypanosomen eliminiert und wiederum sind es nur einige Parasiten, die dem Angriff durch einen erneuten Wechsel ihres VSG-Mantels entgegen [92]. Die Möglichkeiten der Variation der VSG-Moleküle sind dabei enorm: Jedes Trypanosom besitzt hierfür ca. 1000 unterschiedliche Gene, zu deren Expression es durch die Aktivierung einer von 20 unterschiedlichen Expressionsstellen kommt. Es folgt die Transkription in eine mRNA und die Translation in das entsprechende Protein. Möglichkeiten der Expression eines anderen Gens sind u. a. der Austausch von Genen (duplikative Transposition nicht-telomerer Gene) oder das „Umschalten“ auf eine andere Expressionsstelle (*in-situ-switch*). Der daraus resultierende Antigen-switch passiert spontan in einer Rate von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  pro Zellteilung [13]. Falls medikamentös nicht unterbrochen, wiederholt sich somit der Vorgang der Umgehung des Immunsystems durch einzelne Klone bis hin zur Erschöpfung (*immune exhaustion*) der infizierten Patienten.

### 1.4 West- und ostafrikanische Form der Schlafkrankheit

Morphologisch nicht voneinander unterscheidbar, rufen die beiden Unterarten jedoch zwei verschiedene Schlafkrankheitstypen hervor: *T.b.g.* ist Auslöser der west- und *T.b.r.* der ostafrikanischen Form der afrikanischen Trypanosomiasis (s. Abbildung 1). Während sich die ostafrikanische Form vermehrt in dünn besiedelten savannenartigen Gebieten findet, kommt die westafrikanische Form vor allem in Flussnähe und somit auch in bevorzugten Lebensräumen der Menschen vor. Die durch *T.b.r.* ausgelöste Variante der HAT ist u. a. durch einen schnelleren klinischen Verlauf und eine andere Weise des en- und epidemischen Auftretens gekennzeichnet [86]. Im Folgenden soll nur auf die in Angola vorkommende westafrikanische Form eingegangen werden.



**Abbildung 1: Vorkommen der HAT in Afrika.** Rote Flächen: Gebiete, wo die Schlafkrankheit auftritt; Gestrichelte Linie: Grenze zwischen west- und ostafrikanischer Form. **Quelle:** A. Stich.

## 1.5 Klinik, Diagnose und Therapie der Schlafkrankheit

### 1.5.1 Klinik der Schlafkrankheit

Bei der Schlafkrankheit werden zwei Stadien unterschieden: Das initiale Stadium I ist durch inflammatorische Prozesse vor allem in hämolymphatischen Geweben und Organen, das fortgeschrittene Stadium II durch eine chronisch progrediente Meningoenzephalitis gekennzeichnet.

Wenige Tage nach der Infektion entsteht an der Einstichstelle eine lokale Entzündungsreaktion in Form einer handtellergroßen Hautrötung, der so genannte Trypanosomenschanter. Die regionalen Lymphknoten (LK) schwellen an und leiten die Erreger nach zwei bis vier Wochen über Lymphe und Blut in den gesamten Körper. Als pathognomonisch wird dabei die Lymphadenopathie der posterior zervikal gelegenen Lymphknoten angesehen (Winterbottom-Zeichen). Die Klinik ist in ihrem weiteren Verlauf zunächst höchst unspezifisch: Fieber, welches periodisch in 1-7 Tagen wiederkehrt und natürlich nicht auf Anti-Malariamittel anspricht, kann das einzige Zeichen sein. Der Fieberverlauf spiegelt dabei die Wellenbewegung der Parasitämie wider [92]. Weitere Symptome sind Kopf- und Gelenkschmerzen, Myalgie, Schwäche und Unwohlsein sowie Hepato- und Splenomegalie [25].

Dieser Initialphase kann eine relativ asymptomatische Phase folgen, welche einige Monate bis etliche Jahre dauern kann. Daneben können jedoch auch endokrine Dysfunktionen wie Amenorrhoe, reduzierte Libido, Impotenz etc. auftreten. Es sind sogar Fälle von Orchitis als untypische Manifestation der HAT beschrieben worden [27]. Während es häufiger zu schweren Anämien kommt, finden sich Hautveränderungen im Sinne von makulo-papulösen Eruptionen sowie Pruritus oder Gesichtssödemen eher selten [25].

Das fortgeschrittene Stadium II der Erkrankung beginnt mit der Invasion der Parasiten ins Zentralnervensystem (ZNS). Zuerst dringen die Trypanosomen in weniger geschützte Zonen

wie den Plexus choroideus, den Thalamus, das Pinealorgan oder die Hypophyse ein. Das Intervall zwischen Infektionsbeginn und Stadium II beträgt normalerweise mehrere Monate bis zu zwei Jahre [13]. Im Verlauf entwickelt sich eine chronisch progrediente Meningoenzephalitis mit charakteristischen Symptomen wie stärksten Kopfschmerzen und fokalen Ausfallerscheinungen. Durch die Beeinträchtigung von motorischen Funktionen und Sprache sowie dem Auftreten von Tremor kann es zu einer Parkinson-ähnlichen Symptomatik kommen. Sich allmählich entwickelnde psychiatrische Störungen reichen von mentaler Desorientierung und Apathie über Manie, schizoide Attacken, Paranoia und Aggressivität bis hin zum Delirium. Schließlich kommt es zu den namensgebenden Schlafzyklusstörungen mit einer tagsüber vermehrten Schläfrigkeit. Die Patienten erleiden Gewichtsverluste und werden letztendlich komatös (s. Abbildung 2). Oft kommt es nicht zuletzt durch die sekundäre Immunsuppression als Resultat der *immune exhaustion* schließlich zu bakteriellen Superinfektionen wie z.B. Aspirationspneumonien. Die Krankheit verläuft immer letal, wenn sie nicht behandelt wird [25].



**Abbildung 2: Patientin im Stadium II.** Das Kind war apathisch, bewegungsarm und reagierte kaum noch auf äußere Reize. Die Ernährung musste über eine nasogastrale Sonde vorgenommen werden, „Nasenflügeln“ und Rippeneinziehungen deuteten auf eine erschwerte Atmung hin. **Quelle:** A. Stich.

### 1.5.2 Diagnose der Schlafkrankheit

Falls ein Patient nicht typische Symptome wie den Trypanosomenschanter oder das Winterbottom-Zeichen zeigt, ist die Diagnose klinisch aufgrund der unspezifischen Zeichen der Krankheit nur schwer zu stellen.

Zum Screening wird ein 1978 von Magnus *et al.* [56] beschriebener serologischer Test, der *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT), verwendet. Dieser Test basiert auf einem Reagenz, bestehend aus gefärbten, Kälte-getrockneten Trypanosomen mit selektierten variablen Antigen-Typen (VAT). Der CATT ist unter Feldbedingungen leicht anzuwenden und hat beträchtlich zur aktiven Fallfindung im Vergleich zur alleinigen Durchführung von



parasitologischen Nachweistechniken beigetragen. Er bleibt jedoch umstritten, da falsch-positive Ergebnisse bei verschiedenen Infektionskrankheiten wie Schistosomiasis, Filariasis, Toxoplasmose, Malaria oder Infektionen mit apathogenen Trypanosomen vorkommen können und vereinzelt auch falsch-negative Resultate beschrieben werden [28, 67].

Der direkte Parasitennachweis kann aus Lymphflüssigkeit, Blut oder Liquor erfolgen. Da die Menge der Parasiten in Blut und Liquor bei Infektionen mit *T.b.g.* jedoch eher niedrig ist und mit der antigenetischen Variation fluktuiert, liegt sie teilweise unter der mikroskopischen Nachweisgrenze [95]. Dies macht mitunter aufwendige Konzentrationsverfahren notwendig. So stehen verschiedene Techniken wie die Lymphknotenpunktion (LKP) mit anschließender mikroskopischer Untersuchung der Lymphflüssigkeit, der dicke Tropfen in Giemsa- oder Field-Färbung sowie die Kapillarzentrifugation (*hematocrit centrifugation technique* = HCT) zu Verfügung [95]. In manchen Arbeiten wird die HCT auch als mHCT (*microhematocrit centrifugation technique*), als CTC (*capillary tube centrifugation technique*) oder als Woo-Test bezeichnet.

Gelingt ein direkter Nachweis durch diese Methoden nicht, so kommt die Titrierung des CATT zur Anwendung: Die nationalen Richtlinien in Angola legen dabei den Grenzwert für die Diagnosestellung auf eine Agglutination bei  $\geq 1:8$ -Serumverdünnung fest [2]. Neuere Studien empfehlen jedoch diesen Grenzwert als  $\geq 1:16$ -Serumverdünnung zu definieren [19]. Als weniger häufig angewendete, da technisch schwierigere Diagnostikmethode sind u. a. die *mini-anion exchange column technique* (mAECT) und die *quantitative buffy coat technique* (QBC) zu nennen [86]. Auch der Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) gehört noch nicht zu den Standardmethoden (s. 2.1.1). Eine Reihe von weiteren serologischen Verfahren, wie der indirekte Immunfluoreszenz-Test (IFT), die indirekte Hämagglutination (IHA) sowie der *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) gehören auch zum Diagnostik-Repertoire, werden jedoch ebenfalls nur selten verwendet [13].

Zur Stadieneinteilung erfolgt eine Lumbalpunktion: Werden mikroskopisch Trypanosomen entdeckt oder über 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> gezählt, so liegt nach WHO-Kriterien das Stadium II, andernfalls das Stadium I vor [106]. Der Grenzwert der Pleozytose allein ist jedoch aktuell umstritten und wird in manchen Ländern anders festgelegt [48]. So wird in Angola von dem „echten“ Stadium II ein „Intermediär-Stadium“ abgegrenzt, das vorliegt, wenn 6 bis 20 Zellen/mm<sup>3</sup>, aber keine Trypanosomen gefunden werden [2]. Diese zusätzliche Unterteilung hat Konsequenzen für die spezifische Therapie.

Als weiteres Kriterium für die Diagnose des Stadiums II kann die erhöhte Proteinmenge im Liquor herangezogen werden. Wegen der mangelnden technischen Ausstattung ist allerdings auch dieser Test oft nicht anwendbar [13]. Vor wenigen Jahren ist ein spezifischer Test zur Quantifizierung von IgM im Liquor erschienen [50], dessen Wertigkeit in der Feldanwendung aktuell evaluiert wird.

### 1.5.3 Therapie der Schlafkrankheit

Die Therapie der Schlafkrankheit ist kompliziert, gefährlich und kostenintensiv. Es stehen nur eine handvoll nebenwirkungsreicher Medikamente zu Verfügung [47]. Derzeit kommt in Angola das in Tabelle 1 gezeigte, stadienabhängige Schema zur Anwendung [14, 83].

Das nebenwirkungsärmere Pentamidin löste erst vor einigen Jahren die Therapie mit Melarsoprol im Intermediärstadium ab, nachdem eine Studie ergab, dass die Behandlung mit diesem Medikament nur ein geringfügiges Ansteigen der Rückfallquote zur Folge hatte [24]. Denn Melarsoprol allein hat aufgrund einer gefürchteten Komplikation, der Melarsoprol-induzierten Enzephalopathie, eine Therapie-induzierte Mortalität von 4 bis 12%. Aber auch weitere schwerwiegende Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und exfoliative Dermatitis sind von diesem Medikament bekannt [73]. Da Eflornithin zwar wesentlich weniger toxisch, jedoch ungefähr fünfmal so teuer wie Melarsoprol ist, wurde es bisher aufgrund der hohen Kosten nicht als *first-line-drug* eingesetzt [20, 86].

**Tabelle 1: Therapie der HAT**

| <i>Patienten / Stadium</i> | <i>Arzneimittel</i>                      | <i>Dauer der Behandlung</i>                      |
|----------------------------|--|--|
| Stadium I                  | Pentamidin i.m. 4 mg/kg KG               | 7 bis 10 Tage                                    |
| Intermediärstadium         | Pentamidin i.m. 4 mg/kg KG               | 7 bis 10 Tage                                    |
| Stadium II                 | Melarsoprol i.v. 2,2 mg/kg KG            | 10 Tage  |
| Rezidive im Stadium II     | Eflornithin i.v. 400 mg/kg KG            | 4x/Tag über 14 Tage                              |
| Alle Stadium-II-Patienten  | Prednisolon p.o. 1 mg/kg KG (max. 40 mg) | für die Dauer der Behandlung, dann ausschleichen |

In Angola konnte durch gezielte Maßnahmen die Mortalität der HAT-Patienten zwar von 7,5% (1995) auf 2,9% (2001) gesenkt werden [2]. Es wird hier allerdings, wie auch in diversen anderen Ländern, von Melarsoprol-Resistenzen in steigenden Zahlen von bis zu 25% berichtet [88, 91].

### 1.6 Die Schlafkrankheit in Angola im Rahmen der sozioökonomischen Bedingungen

Die Schlafkrankheit wurde in Angola erstmals im Jahr 1871 entdeckt. Es brauchte jedoch mehrere Jahrzehnte, damit der Kampf gegen die Krankheit systematisch organisiert wurde. So richtete die portugiesische Kolonialregierung 1926 eine erste Spezial-Kontrolleinheit und 1949 das erste mobile Team ein, um Patienten in peripheren Gebieten zu erreichen. Nicht einmal zehn Jahre später wurde annähernd die gesamte Bevölkerung in den endemischen Zonen durch die Kontrollmaßnahmen konstant erfasst [2]. Etwa zur gleichen Zeit wurden anti-trypanosomale Medikamente verfügbar. Die systematische HAT-Kontrolle war ein Schlüssel zur aufblühenden landwirtschaftlichen und ökonomischen Entwicklung im nachfolgenden Zeitraum bis in die frühen 70er Jahre. So wurden 1974 nur drei neue Fälle im gesamten Land registriert [88].

Nach der Unabhängigkeit Angolas im Jahre 1975 tobte fast 30 Jahre lang ein brutaler Bürgerkrieg, der das Land verwüstet, die Infrastruktur zerstört und eine schwer traumatisierte Bevölkerung zurückgelassen hat. Zunächst schlug 1995 der Versuch der Vereinten Nationen (UN), Frieden und Versöhnung unter den Konfliktparteien herzustellen, fehl [94]. Erst zwei Monate nach dem Tod des UNITA-Anführers, Jonas Savimbi, im Februar 2002 kam es zu einem Friedensvertrag zwischen der Regierung Angolas und der UNITA.

Während des Bürgerkriegs wurden die Kontrollmaßnahmen äußerst schwierig und brachen allmählich zusammen [2]. Schon allein die Logistik in den peripheren, oft verminten und extrem unsicheren Gegenden wurde zu einer unberechenbaren Gefahr. Als Resultat der nachlassenden Kontrollen, der kaum stattfindenden Aus- und Weiterbildung des Personals, der zusammenbrechenden Versorgung mit Verbrauchsmaterialien und den daraus entstehenden begrenzten Therapiemöglichkeiten kam es zu einem Wiederaufflammen der Schlafkrankheit in erschütternden Dimensionen: Angola war Ende der 90er Jahre eines der am meisten von der Schlafkrankheit betroffenen Länder [86] und die Fallzahlen nahmen in den folgenden Jahren noch weiter zu. Im Jahr 2001 waren über 12.000 neue Fälle zu verzeichnen [91]. Die Inzidenz lag damit in diesem Jahr ca. dreimal so hoch im Vergleich zum Zeitpunkt der Einführung von Melarsoprol (1949).

Die nationale Regierungsinstitution, die mit der Koordination und Implementierung der HAT-Kontrolle beauftragt wurde, ist das *Instituto de Combate e Controlo das Tripanossomíase* (ICCT), eine Spezialabteilung des Angolanischen Gesundheitsministeriums. Obwohl mit zahlreichen Spezialisten ausgestattet, ist es dennoch aufgrund der begrenzten finanziellen Ressourcen abhängig von der Unterstützung zahlreicher ausländischer Organisationen und Partner.

Während des Krieges genoss die katholische Kirche ein gewisses Privileg, auf beiden Konfliktseiten operieren zu können. Durch das lokale Caritas-Netzwerk wurde 1995 ein Projekt gegründet, dessen Name ANGOTRIP sich als Akronym aus den beiden Wörtern Angola und Trypanosomiasis (portugiesisch: *tripanossomíase*) zusammensetzt. Unterstützt von der Kirche und ausländischen Partnern (wie dem Missionsärztlichen Institut Würzburg) konnten durch dieses Projekt selbst unter schwierigsten Bedingungen Grundaktivitäten aufrechterhalten werden [2]. Und dies zu einer Zeit, als weder die UN noch internationale NGOs Zugang zu der lokalen Bevölkerung hatten.

Derzeit operiert ANGOTRIP in drei Provinzen Angolas: Uíge, Kuanza Norte und Zaïre. Nach UN-Schätzungen leben in diesen Regionen ca. 1,4 Millionen Menschen, von denen die Mehrheit subsistenzwirtschaftende Bauern sind. In der Provinz Uíge existieren ANGOTRIP-Behandlungszentren in den Verwaltungsstädten Uíge, Negage und Quitexe. Letzteres musste jedoch nach einem Überfall der UNITA-Rebellen 1998 im Prinzip aufgegeben werden und führt nur noch Teilaktivitäten durch. In diesen Zentren arbeiten staatlich geprüfte Ärzte,

Krankenschwestern und -pfleger sowie ausgebildete medizinisch-technische Assistenten, jedoch im Bereich der Diagnostik- und Laborarbeit vor allem auch angelernte Hilfskräfte. In Abbildung 3 wird zur örtlichen Orientierung eine Karte von Angola gezeigt.



**Abbildung 3: Karte von Angola.** Die Studienorte befinden sich in der Provinz Uíge, im nördlichen Teil des Landes. **Quelle:** A. Stich.

Zur Eindämmung der Schlafkrankheit arbeitet ANGOTRIP in Zusammenarbeit mit dem ICCT mit unterschiedlichen Methoden: Bei der passiven Fallsuche kommen die Patienten aufgrund von Krankheitszeichen selbst zum Behandlungszentrum. Dieses System wird in Gebieten mit hoher Transmissions-Rate allerdings als unzureichend betrachtet. So fährt zur aktiven Fallsuche ein mobiles Diagnostik-Team in die Dörfer, führt CATT-Reihenuntersuchungen an der lokalen Bevölkerung durch und lädt Verdachtsfälle zur endgültigen Diagnose und Therapie in ein Behandlungszentrum ein. Außerdem wurden Vektorkontrollen in Form von speziellen Tsetsefliegen-Fallen, die von *Caritas de Angola* in Eigenarbeit hergestellt werden, dort eingeführt, wo sich das Habitat der Fliegen mit dem Lebensraum der Bevölkerung überlappt.

## 2 Stand der Forschung, Fragestellung und Studiendesign

### 2.1 Stand der Forschung und Fragestellung

#### 2.1.1 Diagnose der HAT und PCR-Nachweise von Trypanosomen-DNA

Die Diagnostik der westafrikanischen HAT ist wegen der niedrigen Parasitämie und der Begrenzung auf wenige, oft unzureichend sensitive Techniken des direkten Parasitennachweises problematisch. Die rechnerischen Nachweisgrenzen der gängigsten Methoden des direkten Parasitennachweises liegen bei 5000 Trypanosomen/ml Blut (dicker Tropfen), 500 Trypanosomen/ml Blut (HCT) bzw. 100 Trypanosomen/ml Blut (mAECT) [104]. Gelingt mit diesen Verfahren der Trypanosomennachweis nicht, muss die Diagnose auf serologischer Basis gestellt werden. Obwohl serologische Tests auf spezifische AK wie der CATT geeignet für das Massen-Screening sind, unterscheiden sie jedoch nicht zwischen aktueller und abgelaufener Infektion. Hohe Zahlen an falsch-positiven Resultaten werden berichtet und es können auch falsch-negative vorkommen, falls das spezifische Test-Antigen nicht von dem jeweiligen Parasiten-Klon exprimiert wird [85, 98]. Einen echten „Gold-Standard“ zur Beurteilung der existierenden Diagnostikmethoden gibt es nicht, auch wenn mit der *Proteomic-Signature-Analyse* eine moderne experimentelle Diagnostikmethode hierzu einen ersten Ansatz brachte [69].

In anderen Bereichen der klinischen Mikrobiologie zum Direktnachweis extrazellulärer Parasiten längst Standard, zählt die PCR noch nicht zu den etablierten Diagnostikmethoden der HAT. Allerdings sind mehrere PCR-basierte Techniken zur Detektion von *T.b. spp.* beschrieben worden. Zur DNA-Detektion von Trypanosomeninfektionen wurden zunächst Ziel-DNA-Abschnitte für PCR-Versuche gewählt, welche in multipler Kopie im Genom von Trypanosomen vorliegen: Moser *et al.* verwendeten bereits 1989 spezifische Primer (TBR1 und 2) für eine repetitive DNA-Sequenz [64], Bromidge *et al.* führten 1993 die Amplifikation von VSG-Gen-DNA durch [12], Mathieu-Daude *et al.* beschrieben 1994 eine PCR mit Kinetoplasten Mini-Ring-DNA [59] und Ramos *et al.* stellten 1996 Mini-Exon-DNA mittels PCR dar [79]. All diese Versuche zeichneten sich durch eine sehr gute Sensitivität aus – teilweise lag die analytische Nachweisgrenze bei nur 0,1 Trypanosom/10µl pro PCR-Versuchsansatz. Die Autoren verwendeten jedoch allesamt DNA-Isolate aus großen Mengen von purifizierten Parasiten.

Schares & Mehlitz wiesen schließlich 1996 Trypanosomen aus dem Blut von infizierten Patienten nach, wobei Kinetoplasten Mini-Ring-DNA über eine nested-PCR amplifiziert wurde [82]. Kanmogne *et al.* wendeten 1996 zur Detektion von *T.b.g.* bei serologisch positiven, aber aparasitämen Schlafkrankheitsverdachtsfällen die von Moser *et al.* (1989) beschriebene PCR an [37]. Hier ergab sich der Verdacht, dass nicht alle serologisch positiv getesteten Pa-

tienten tatsächlich an einer Trypanosomeninfektion litten, da trotz guter Sensitivität (25 Trypanosomen/ml Blut, entsprechend 1 Trypanosom/10 µl PCR-Ansatz) nur 22% dieser Proben ein positives Resultat in der PCR zeigten. Penchenier *et al.* führten 2000 mit derselben Technik an einer großen Zahl von Patienten und Verdachtsfällen eine Studie durch, wobei sich dieser Verdacht erhärtete: Bei einer rechnerischen Nachweisgrenze von 1 Trypanosom/ml Blut bzw. einer Sensitivität von 99,4% und Spezifität von 98,6% ließen sich von fast 1500 serologischen Verdachtsfällen nur 50 positive PCR-Resultate finden (3,5%) und von diesen insgesamt nur fünf neue Fälle durch direkten Parasitennachweis bestätigen [71].

Solano *et al.* erreichten 2002 mittels derselben PCR-Technik sogar eine Sensitivität von 100% (Spezifität 92%). Sie schlossen jedoch einen Folgeversuch an, der zeigte, dass die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse nur mäßig war: In ca. 20% konnte ein nicht-konkordantes Ergebnis zur vorherigen Testung beobachtet werden. Die Inkonsistenz der Resultate war bei CATT-positiven, aber aparasitämen Fällen besonders groß. Sie schlussfolgerten daraus, dass die verwendeten Primer (TBR1 und TBR2) eine niedrige Spezifität hatten und ein positives Ergebnis dieser PCR nicht als Beweis einer Trypanosomeninfektion gewertet werden kann [87]. Dabei verwiesen sie auf andere Autoren, welche bereits früher in longitudinalen Studien publiziert hatten, dass die von Moser *et al.* (1989) beschriebene PCR in endemischen Regionen falsch-positiv ausfallen kann [22, 31].

Allen bisher beschriebenen Studien ist gemeinsam, dass die Probenlagerung bis zur DNA-Purifikation u/o PCR-Analyse tiefgekühlt oder tiefgefroren erfolgte. Kabiri *et al.* wendeten 1999 erstmals ein DNA-Purifikationssystem an, welches die Probenlagerung bei Raumtemperatur vorsah [36]. Zur Detektion von Trypanosomen-DNA wurden Primer (MUSEQ1 und 2) benutzt, welche zur Amplifikation von Abschnitten der *expression-site-associated gene* (ESAG) 6 und 7 dienten, die in 20-facher Kopie im Genom von *T.b. spp.* vorliegen. Obwohl die rechnerische Nachweisgrenze dieser Methode sehr gut war (40 Trypanosomen/ml Blut, entsprechend 0,1 Trypanosom/10 µl Testansatz) konnten von 23 Fällen mit gesichertem Parasitennachweis zunächst nur 15 Proben positiv per PCR getestet werden. Erst in Folgeuntersuchungen der Patienten vier bis sechs Monaten später gelang es, bei fünf weiteren Proben ein positives Resultat zu erzielen, während in den verbleibenden drei Fällen die PCR-Analyse auch hier negativ blieb. Bei einer „End-Sensitivität“ von 87% und „End-Spezifität“ von 97% wurde von 36 serologischen Verdachtsfällen auch nur ein positives Resultat in der PCR gesehen.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass vor allem die serologischen Verdachtsfälle problematisch in der Beurteilung sind. Besonders hinsichtlich des Grenzwertes der Serumverdünnung in der CATT-Titrierung zur Diagnosestellung gibt es aktuell unterschiedliche Empfehlungen [2, 19]. Falsch-positive bzw. falsch-negative Diagnostikentscheide können jedoch sowohl für den Einzelnen (eventuell erfolgt eine Therapie mit nebenwirkungsreichen

Medikamenten, obwohl keine Infektion vorliegt, bzw. es erfolgt keine Therapie, obwohl in Wirklichkeit eine lebensbedrohliche Infektion besteht), als auch für die Gemeinschaft (aufgrund eines falsch-negativen Entscheides bleibt die Therapie trotz bestehender Infektion aus, wodurch das infizierte Individuum weiterhin Trypanosomenträger und damit auch potentielles Reservoir für die Transmission auf Andere bleibt) zur Gefahr werden.

Zum anderen wird die Stadieneinteilung kontrovers diskutiert: Gelingt der Parasitennachweis im Liquor nicht (was die Regel ist), so ist die Anzahl der Leukozyten der Rückenmarksflüssigkeit entscheidend für die Stadienzuordnung der Patienten. Die aktuelle WHO-Einteilung sieht vor, dass bereits ab einer Zellzahl von 6 Zellen/mm<sup>3</sup> im Liquor das fortgeschrittene Stadium II vorliegt [106]. Die verantwortlichen Gesundheitsinstitute mancher Ländern haben die Grenze zur Stadieneinteilung jedoch auch bei 10 oder mehr Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor festgelegt [18, 48]. Da die Sensitivität der parasitologischen Nachweismethode der Wahl – der Mikroskopie – erfahrungsabhängig begrenzt ist und mittels molekularbiologischer Methoden auch Trypanosomen im Liquor bei Patienten mit einer Zellzahl  $\leq 5$  Leukozyten/mm<sup>3</sup> nachgewiesen wurden [43, 93], ist auch in diesem Punkte eine Verbesserung der Diagnostik wünschenswert, um den Patienten die optimale Therapie zukommen lassen zu können. Vor dem Hintergrund der bisherigen Ausführungen steht die 1. Hauptfragestellung dieser Arbeit:

- Stellt die Polymerasekettenreaktion eine Bereicherung in der Diagnose und Stadieneinteilung der Schlafkrankheit dar?

Da im Diagnostik-Repertoire der HAT noch kein „Gold-Standard“ existiert, soll diese Frage anhand von Vergleichen zu herkömmlichen Methoden, insbesondere zu den direkten Parasitennachweistechiken LKP, HCT und der Mikroskopie des Liquors, überprüft werden.

### 2.1.2 Antikörperspiegel von Trypanosomiasis-Patienten

Eines der Hauptcharakteristika der afrikanischen Trypanosomen ist die Präsenz von VSG-Molekülen, die nahezu die gesamte Membran der Parasiten während der Zyklusphase im Säugetierwirt bedecken und somit die vorherrschenden Oberflächenantigene darstellen [57, 96]. Die chronische Infektion mit *T.b.g.* induziert zirkulierende AK gegen mehrere Antigene des Parasiten: Die erste Antikörperantwort zu Beginn der Krankheit ist gegen das Oberflächenantigen gerichtet. Die sequentielle Ausbildung von antigenetisch verschiedenen VSG-Molekülen ermöglicht jedoch einigen Trypanosomen der Wirtimmunantwort zu entgehen [100], wodurch Klone von Trypanosomen mit unterschiedlicher antigener Ausprägung (VAT) überleben. Nachfolgend werden Antikörperantworten auch gegen andere antigene Strukturen, einschließlich invarianter VSG-Epitope, der Membran, zytoplasmatischer und nukleärer Antigene, durch T-Zell-abhängige und -unabhängige Wege induziert [96].

Beim ersten Parasitenkontakt (Tag 3-4) kommt es zunächst zu einer vermehrten IgM-Produktion, während IgG in weniger hohen Spiegel vorliegt [13, 96]. Bereits 1964 bemerkte Mattern einen drastischen Anstieg der IgM-Serumkonzentration bei Schlafkrankheitspatienten auf das 8-16fache [61]. Jedoch besteht nur ein kleiner Teil dieser Makroglobuline aus AK, die gegen das Oberflächenantigen der Trypanosomen gerichtet sind [26]. Die Serumspiegel der verschiedenen Antikörperklassen wurden in mehreren Studien untersucht, wobei sich zeigte, dass für die westafrikanische HAT mit im Durchschnitt 35-44 g/l hohe Konzentrationen von IgG (Normbereich: 8-18 g/l) und mit 11-14 g/l ebenfalls erhöhte Spiegel für IgM (Normbereich: 0,6-2,8 g/l) charakteristisch sind. Die mittlere Konzentration von IgA bleibt hingegen mit 2,5-4,0 g/l (Normbereich: 0,9-4,5 g/l) im Normbereich [3, 41, 49]. Dabei kann jedoch im Einzelnen bei bis zu 39% der Patienten eine leichte Erhöhung dieser Immunglobulinklasse beobachtet werden. Den im Schnitt insgesamt hohen Ig-Spiegeln liegt wahrscheinlich eine unspezifische B-Lymphozyten-Stimulation zu Grunde [4].

Auch im Liquor lassen sich im fortgeschrittenen Stadium erhöhte Spiegel an IgM und IgG finden, die durchschnittliche Konzentration von IgA bleibt indes auch hier im Normbereich [49, 61]. Die posttherapeutische Normalisierung der IgM-Spiegel verläuft verzögert und kann sogar mehr als ein Jahr dauern [8, 103]. Es weisen jedoch nicht alle Stadium-II-Patienten erhöhte IgM-Werte im Liquor auf. Insbesondere bei solchen Kranken, bei welchen gerade erst die ZNS-Invasion der Trypanosomen stattgefunden hat, kann die Konzentration von IgM unterhalb des Messbaren liegen. Der Liquor von Stadium-I-Patienten und Gesunden enthält indes generell nur geringste Mengen oder gar kein IgM [49, 61, 103].

Die Verteilung der Spiegel von spezifischen Antikörpern im Serum gleicht derjenigen der Gesamtimmunglobuline: Der Spiegel an spezifischem IgG ist am höchsten, während spezifisches IgM in mittleren Konzentrationen und spezifisches IgA kaum im Serum zu finden ist [41, 49]. Spezifisches IgE findet sich hingegen nicht im Serum oder Liquor. Trotz des gleichartigen Verteilungsmusters im Durchschnitt lässt sich im Einzelfall kein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an allgemeinem und spezifischem IgM herstellen [41].

Drei bis vier Tage nach der Infektion erscheint VSG-spezifisches IgM in hohen Spiegel im Blut der HAT-Patienten und partizipiert in der Trypanosomenelimination. VSG-spezifisches IgG tritt jedoch erst nach dem Verschwinden der jeweiligen VAT-Population auf [96]. Knobloch *et al.* (1984) zeigten, dass zwar sowohl die Gesamtspiegel von IgG und IgM, als auch die der spezifischen Antikörper dieser Klassen im ersten Jahr nach Therapie abfallen, während des zweiten und dritten posttherapeutischen Jahres jedoch teilweise wieder drastisch ansteigen, ohne dass eine neue Infektion nachgewiesen werden kann [41]. Kegels *et al.* (1992) schlussfolgerten aus ihren Arbeiten, dass steigendes Alter oder eine vorhergegangene HAT-Infektion Auswirkungen auf die Seropositivität der Patienten haben [39]. Es lassen



sich jedoch auch hohe Zahlen von symptomlosen und Parasiten-negativen AK-Trägern sowohl in epidemischen als auch in nicht epidemischen Gebieten finden [29].

Die Angaben in der Literatur zu Präsenz und Konzentrationen der spezifischen AK im Liquor sind widersprüchlich: Während Frezil *et al.* (1974) mit einer Modifikation des IFTs nach Wery *et al.* (1970) [102] häufig spezifische AK im Liquor beobachtet hatten [30], konnten Knobloch *et al.* (1984) dies nicht bestätigen, obwohl sie die gleiche Methode benutzt hatten [41]. Letztere Arbeitsgruppe fand nur bei einem von sieben Patienten einen niedrigen Titer von spezifischen AK im Liquor. Auch Whittle *et al.* (1977) konnten mittels ELISA keine erhöhte Aktivität von spezifischen AK im Liquor im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation entdecken bzw. keinen Zusammenhang zwischen der gefundenen Aktivität und dem Stadium der Infektion oder der posttherapeutischen Prognose herstellen [103]. Durch einen semiquantitativen ELISA gelang es Lejon *et al.* (1998) jedoch spezifische anti-trypanosomale AK auch im Liquor – und zwar vornehmlich IgG und IgM, jedoch auch IgA – nachzuweisen [49]. Der Median der Konzentrationen lag hierbei allerdings jeweils ca. 1000fach tiefer als der entsprechende im Serum.

Bisherige Studien zu den Spiegeln von spezifischen AK nehmen weitgehend nur Bezug auf die Stadieneinteilung und den Therapieerfolg, kaum aber auf den Schweregrad der Erkrankung oder den prognostischen Verlauf. Lediglich Whittle *et al.* (1977) stellten fest, dass kein Zusammenhang zwischen der Klinik in Nachuntersuchungen und dem Spiegel von spezifischen Antikörpern im Liquor besteht [103]. Diese Autorengruppe gab dabei jedoch nicht an, nach welchen Kriterien die Einschätzung der klinischen Situation vorgenommen wurde. In diesem Zusammenhang steht die 2. Hauptfrage dieser Arbeit:

- Ergeben sich aus dem quantitativen und qualitativen Nachweis von Immunglobulinen in Serum und Liquor mögliche Zusammenhänge mit dem klinischen Bild bei der Schlafkrankheit?

Diese Frage soll anhand von Vergleichen von klinischen Parametern mit dem im IFT bestimmten Spiegeln von anti-trypanosomalen Antikörpern aus Serum und Liquor überprüft werden. Eine Existenz solcher Zusammenhänge wäre insofern verständlich, da u. a. der Spiegel von Zytokinen wie der des Tumor-Nekrose-Faktors alpha mit dem Auftreten von Fieber und Entzündungszeichen von HAT-Patienten korreliert [68]. Ähnliches könnte also auch für spezifische Immunglobuline gelten. Kurz vor der Fertigstellung dieser Arbeit erschien eine Publikation, welche einzelne klinische Parameter mit der Quantität der Pleozytose der entsprechenden Patienten verglich [11]. Auf diese Arbeit wird im Kapitel 5.3.2.2 eingegangen.

### 2.1.3 Methodik des IFT

Zur Immunodiagnose der *T.b.g.*-Schlafkrankheit auf Basis des Nachweises von spezifischen AK entwickelten Wery *et al.* (1970) einen IFT und empfahlen die Verwendung von *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) als Antigen, da diese nicht humanpathogenen Parasiten bei gleicher Spezifität und Sensitivität für die Testmethode weniger gefährlich in der Laboranwendung sind als die menschenpathogenen Trypanosomen [101, 102].

Bei dieser Technik wurden relativ wenig falsch-positive oder zweifelhafte Reaktionen mit Seren von Patienten beobachtet, die an tropischen und anderen Infektionskrankheiten wie Malaria, Schistosomiasis, Toxoplasmose, Loa-Loa-, Onchocerca volverus- oder Amöben-Infektionen, litten [81, 102]. Je nach Methode und Endpunkt-Titerlesung wird die Spezifität des IFT zwischen 83% und 100% und die Sensitivität zwischen 82% und 94,7% beziffert [29, 39, 67]. Im Vergleich zu anderen serologischen Tests wie der *radialimmunodiffusion* (RID), dem ELISA oder dem CATT bzw. der CATT-Titrierung erwies sich der IFT jeweils als sensitiver [29, 39, 67]. So wurde der IFT zur Kontrolle der HAT u. a. in Äquatorial Guinea, Gabun und der Demokratischen Republik Kongo mit Erfolg eingesetzt [67].

Während die meisten Autoren bei der Testung von polyvalentem Serum erst Reaktionen ab einer Verdünnungsstufe von 1:40 oder 1:50 als spezifische Reaktion ansehen [29, 30, 67, 102], finden sich bei der Bewertung des Grenzwertes für spezifische Antikörper in der Literatur unterschiedliche Angaben: So legen Knobloch *et al.* (1984) den Grenzwert für eine Reaktion für spezifisches IgG bei 1:20 und für spezifisches IgM bei 1:5 fest [41]. Amevigbe *et al.* (1992) bewerten hingegen erst einen IgG-Titer von  $\geq 1:50$  als spezifisch [3]. Bei der Bewertung der Titerhöhe und deren Spezifität durch verschiedene Personen oder Arbeitsgruppen spielen Unterschiede in der Endpunkt-Titerlesung eine besondere Rolle. Alle Autoren sind sich jedoch einig, dass die Ablesung innerhalb von 24 Stunden erfolgen sollte. Da Seren von Personen aus Mitteleuropa kein Trypanosomen-spezifisches IgG bzw. IgM enthalten [41], eignen sie sich als Negativ-Kontrolle im IFT.

Nach Beutner (1971) können folgende Reaktionen beim IFT unterschieden werden [7]:

1. Gewünschte spezifische Reaktion (*desired specific reaction* = DSR):

Dies ist eine immunologische Reaktion zwischen einem Testserum und dem Antigen. Von den reagierenden homologen AK (eigentliche DRS) werden heterologe (kreuzreagierende) AK, die eine spezifische Aktivität gegen das dargebotene Ag zeigen als Untergruppe abgegrenzt (*cross-reactive DSR* = DXSR).

2. Ungewünschte spezifische Reaktion (*undesired specific reaction* = UDSR):

Dies bezeichnet eine immunologische Reaktion welche z.B. auftritt, wenn spezifisch gebundene AK (DSR) der Klasse IgM mit *rheumatoid factor like antibodies* der Klasse IgG reagieren, so dass mehr Konjugat gebunden wird und die Gesamtreaktion steigt.

### 3. Nicht spezifische Reaktion (*nonspecific reaction* = NSR):

So werden Reaktionen genannt, die primär nicht immunologisch sind, wie z.B. solche von einem Adhaerens bestimmter Serumkomponenten oder Konjugat mit Oberflächen des Antigens.

Auf diese Einteilung wird insbesondere in Kapitel 5.3.1 eingegangen.

## 2.2 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit wurde vom Ethik-Komitee der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg und vom Ethik-Komitee des ICCT (Luanda / Angola) zugelassen. Jeder Patient, der in die Studie aufgenommen wurde, unterzeichnete zuvor eine Einverständniserklärung, in der er über Risiken und Nutzen der Studienteilnahme aufgeklärt wurde. Dies geschah auf Portugiesisch, der Amtsprache Angolas, oder unter Zuhilfenahme eines Übersetzers in der jeweiligen Stammsprache. In Annex I wird eine Abbildung der Einverständniserklärung gezeigt. Die Einschlusskriterien für diese Studie lauteten:

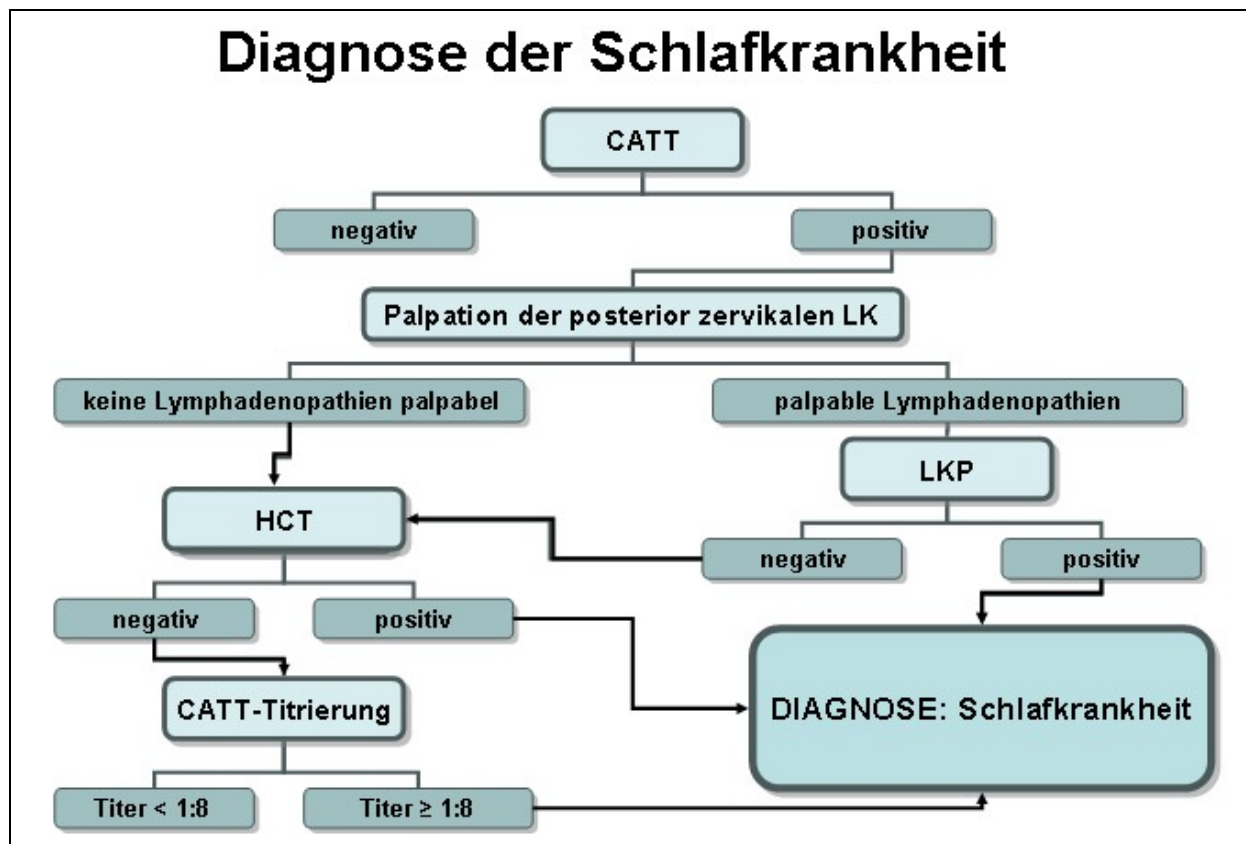
- Unterzeichnete Einverständniserklärung der Patienten.
- Bestätigte Diagnose nach nationalen Kriterien [2].
- Alter:  $\geq 3$  Jahre.

Die Patienten kamen entweder selbst zur Diagnostik (passive Fallsuche) oder wurden in ein Behandlungszentrum gebracht, nachdem sie mittels des Screeningtests CATT positiv getestet worden waren (aktive Fallsuche). Die Probenentnahme und die körperliche Untersuchung der Patienten fanden vom 11.10.02 bis zum 30.10.02 in den ANGOTRIP-Behandlungszentren für Schlafkrankheit in Uíge und Negage in der Provinz Uíge in Angola statt. In Abbildung 4 wird ein Überblick über die Reihenfolge der diagnostischen Untersuchungen und die Sicherung der Diagnose gegeben. Die Diagnose galt nach den in Angola üblichen Kriterien als bestätigt, wenn einer der folgenden Punkte zutraf [2]:

- Parasitennachweis in der Lymphknotenpunktion.
- Parasitennachweis in der HCT.
- CATT-Titer von  $\geq 1:8$ .

Die für die Studie nötigen Blutentnahmen erfolgten im Anschluss an die Diagnosestellung. Bei allen Patienten mit bestätigter Diagnose wurde eine Lumbalpunktion zur Stadienermittlung angeschlossen, bei der auch der Liquor für diese Arbeit entnommen wurde, so dass keine zusätzliche Lumbalpunktion erforderlich wurde. In Abbildung 5 wird ein Beispiel einer diagnostischen Lumbalpunktion vor Ort gezeigt. Alle Blut- und Liquorproben wurden somit

noch vor Beginn der Behandlung gewonnen. Die der Arbeit zu Grunde liegende Stadieneinteilung erfolgte nach den internationalen WHO-Kriterien [106].



**Abbildung 4: Wegbaum zur Diagnose der HAT.** Bei Patienten mit positivem CATT wurden vom angolischen Personal die zervikalen Lymphknoten palpirt und gegebenenfalls eine Lymphknotenpunktion durchgeführt. War diese negativ, wurde eine HCT angeschlossen. Bei ebenfalls negativem Resultat wurde der CATT-Titer bestimmt.

Vor der spezifischen HAT-Therapie wurde allen Patienten eine kurative Dosis Mebendazol und Chloroquin verabreicht. Die klinischen Untersuchungen wurden zeitnah zur Diagnostik durchgeführt, erfolgten in manchen Fällen aber bis zu drei Tage nach Therapiebeginn. Alle Untersuchungen wurden vom Autor dieser Arbeit persönlich durchgeführt, objektive Daten wie Gewicht, Temperatur etc. aber teilweise von den Aufzeichnungen des angolischen Personals übernommen (s. 3.2.3).

Versuche zur Justierung der Methoden mit Testmaterialien wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität, Göttingen, durchgeführt und am Missionsärztlichen Institut Würzburg bestätigend wiederholt. Versuche mit Patientenmaterialien und deren Auswertung wurden ausschließlich am Missionsärztlichen Institut Würzburg durchgeführt.



**Abbildung 5: Lumbalpunktion vor Ort.**

### 3 Materialien, Patienten und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Die Liste der Chemikalien befindet sich in Annex II.

##### 3.1.2 Geräte

Die Liste der Geräte befindet sich in Annex III.

##### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die Liste der Verbrauchsmaterialien befindet sich in Annex IV.

##### 3.1.4 Antihuman-Antikörper, Enzyme, Oligo- und Desoxynukleotide

###### a) Antihuman-Antikörper:

|   |                       |
|---|-----------------------|
| FITC-konjugiertes Antihuman-IgA .....       | Dianova, Hamburg      |
| FITC-konjugiertes Antihuman-IgG .....       | Dianova, Hamburg      |
| FITC-konjugiertes Antihuman-IgM .....       | Dianova, Hamburg      |
| Rheumafaktor-Absorbens (Antihuman-IgG)..... | bioMérieux, Nürtingen |

###### b) Enzyme:

|                                      |                              |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Taq-DNA-Polymerase 5 U/μl .....      | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| Proteinase K (30 m-Anson-U/mg) ..... | VWR International, Nürnberg  |

###### c) Desoxynukleotide:

|  |                 |
|--|-----------------|
| Desoxyadenosin Adenosin-Triphosphat (dATP).....  | Roche, Mannheim |
| Desoxyguanosin Guanosin-Triphosphat (dGTP) ..... | Roche, Mannheim |
| Desoxycytidin-Triphosphat (dCTP) .....           | Roche, Mannheim |
| Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP) .....          | Roche, Mannheim |

###### d) Primer:

|   |                      |
|---|----------------------|
| ATR2 (5'-CCACCGCGGTGAGACGTGTA-3') 50 μM .....   | Sigma ARK, Darmstadt |
| ATF2 (5'-CAGATGGTGACGAAGGAAACGG-3') 50 μM ..... | Sigma ARK, Darmstadt |
| ATR3 (5'-GCGAAGTACACGGCAGGGTA-3') 50 μM .....   | Sigma ARK, Darmstadt |
| MUSEQ1 (5'-GCGTTAGCAGCAGCTGCAGCTG-3') 50 μM ... | Sigma ARK, Darmstadt |
| MUSEQ2 (5'-CCTCCTCGGATATTTTCCGCACCC-3') 50 μM   | Sigma ARK, Darmstadt |

### 3.1.5 Puffer, Lösungen und Reaktionsmittel

#### a) Puffer:

|  |                 |
|--|-----------------|
| Puffer AS 1 .....  | Qiagen, Hilden  |
| Puffer AS 2 .....  | Qiagen, Hilden  |
| Puffer AL .....  | Qiagen, Hilden  |
| Puffer AW1 .....   | Qiagen, Hilden  |
| Puffer AW2 .....   | Qiagen, Hilden  |
| Puffer AE .....  | Qiagen, Hilden  |
| PCR-Reaction-Buffer (10x konzentriert ohne Mg <sup>2+</sup> ) .....    | Roche, Mannheim |
| 10xTAE-Puffer .....  | Roth, Karlsruhe |
| 1xTAE-Puffer: 10xTAE-Puffer mit H <sub>2</sub> O bidest. 1:10 verdünnt |                 |

#### b) Lösungen:

##### Baltz-Medium *Basic-Solution*:

- 3 g HEPES
- 500 mg Glucose-Monohydrat
- 110 mg Na-Pyruvat
- 7 mg Hypoxanthin
- 2 mg Thymidin
- 10,7 mg Adenosin
- 14,1 mg Bathocuproninsulfonat
- in 50 ml EMEM (mit L-Glutamin und Phenolrot) lösen
- pH mit HCl / NaOH auf 7.5 einstellen
- steril filtrieren
- mit 450 ml EMEM auffüllen
- 5 ml NEAA zugeben

##### β-Mercapto-Stammlösung:

- 14,2 µl β-Mercaptoethanol
- 10 ml H<sub>2</sub>O bidest steril
- steril filtrieren

##### Baltz-Medium *Complete-Solution*:

- 40 ml Baltz-Medium *Basic-Solution*
- 8 ml inaktiviertes fötales Rinderserum
- 0,4 ml β-Mercapto-Stammlösung
- 0,4 ml Penicillin / Streptomycin

Stammlösung A für PBS:

- 80 g NaCl
- 2,0 g KCl
- 1,0 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 1,32 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- in Aqua bidest. lösen

Stammlösung B für PBS:

- 28,98 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 2,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- in Aqua bidest lösen

PBS:

- 100 ml Stammlösung A
- 100 ml Stammlösung B
- 800 ml Aqua bidest
- pH-Wert mit HCl / NaOH auf 7,0 einstellen

3. Sonstige Reaktionsmittel:

Fluoprep ..... bioMérieux, Nürtingen  
Loading Dye Solution 6x ..... MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder (0,5 mg DNA/ml)..... MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
Evans-Blau Lösung 1%..... bioMérieux, Nürtingen

Nucleotidgemisch (2,5 mM je Nucleotid):

- 40  $\mu\text{l}$  Desoxyadenosin-Triphosphat (dATP) (25 mM)
- 40  $\mu\text{l}$  Desoxyguanosin-Triphosphat (dGTP) (25 mM)
- 40  $\mu\text{l}$  Desoxycytidin-Triphosphat (dCTP) (25 mM)
- 40  $\mu\text{l}$  Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP) (25 mM)
- 240  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

3.1.6 Parasiten

- (1) *Trypanosoma brucei brucei* (Laboratory strain TC 211) aus der AG Tropenmedizin und Seuchenbekämpfung des Missionsärztlichen Instituts Würzburg.
- (2) Bereits purifizierte DNA von *Toxoplasma gondii* (Laboratory strain NTE) aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität zu Göttingen.



### 3.1.7 Positiv- und Negativkontrollen & Körperflüssigkeiten für die PCR-Versuche

#### IFT-Positivserum:

- (1) Serum aus dem Hamburger Bernhard-Nocht-Institut (BNI) eines Schlafkrankheitspatienten aus Uganda, dessen Titer anti-trypanosomaler Antikörper der Klasse IgG durch das BNI auf 1:640 bestimmt worden war.
- (2) Serum aus der Würzburger Missionsärztlichen Klinik eines deutschen Schlafkrankheitspatienten ohne vorhergehende Titerbestimmung.

#### IFT-Negativserum:

- (1) Serum eines gesunden Mitteleuropäers, der sich seit mehr als 20 Jahren nicht mehr in potentiellen Schlafkrankheitsgebieten aufgehalten hat und auch nie Symptome der Krankheit zeigte.

#### Testserum für IFT auf Toxoplasmose:

- (1) Serum eines Toxoplasmose-Patienten der Universitätsklinik Göttingen mit einem Titer von 1:16000.

#### Körperflüssigkeiten für PCR-Versuche:

- (1) Vollblut eines gesunden Mitteleuropäers, der sich seit mehr als 20 Jahren nicht mehr in potentiellen Schlafkrankheitsgebieten aufgehalten hat und auch nie Symptome der Krankheit zeigte.
- (2) Liquores von mehreren Patienten der Göttinger Universitätsklinik und der Würzburger Missionsärztlichen Klinik mit unterschiedlichen Krankheitsbildern ohne den Verdacht auf HAT.

### 3.1.8 Computer, Scanner und Software

|                                      |                            |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Computer Toshiba Satellite 1110..... | Toshiba Corporation        |
| Scanner Epson Smart Panel.....       | Epson Corporation          |
| Betriebssystem Windows XP .....      | Microsoft Corporation, USA |
| Microsoft Word 2000.....             | Microsoft Corporation, USA |
| Microsoft Excel 2000 .....           | Microsoft Corporation, USA |
| Microsoft Power Point 2000 .....     | Microsoft Corporation, USA |
| Microsoft Paint V5.1.....            | Microsoft Corporation, USA |
| SPSS für Windows V12.0 .....         | SPSS Incorporation, USA    |
| Adobe Acrobat Reader 5.0.....        | Adobe Incorporation, USA   |
| CIB pdf brewer.....                  | CIB Software GmbH, München |

## 3.2 Patienten und Methoden

### 3.2.1 Patienten

Während der Studiendauer in Angola (11.10.02 bis 30.10.02) wurde bei insgesamt 102 Personen aus den Verwaltungsbezirken Uíge und Negage die Diagnose Schlafkrankheit gestellt. Von diesen nahmen 97 an der vorliegenden Studie teil, während fünf Kinder nicht in die Studie eingeschlossen wurden: Es handelte sich dabei um zwei Waisen, die ohne Begleitung erschienen und daher nur fraglich einwilligungsfähig waren, sowie um drei Kinder, die jünger als drei Jahre waren und somit nicht die Einschlusskriterien (s. 2.2) erfüllten. Die CATT-Prävalenz der Bevölkerung dieser Gegend lag bei 5,9%.

### 3.2.2 Patientengut

Alle Blut- und Liquorproben wurden vor Beginn der Behandlung abgenommen (s. 2.2). Von jedem Patienten wurden folgende Körperflüssigkeiten gewonnen:

- Für die PCR-Versuche: 2,7 ml Vollblut und 0,75 ml Liquor.
- Für die IFT-Versuche: 3,5 ml Vollblut und 0,75 ml Liquor.

Durch intravenöse Punktion wurden 2,7 ml Vollblut in einer EDTA-Monovette® und 3,5 ml Vollblut in einer Serum-Monovette® gewonnen (s. Abbildung 6). Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurden für die PCR-Versuche 750 µl *buffy coat* bzw. 750 µl Serum für die IFT-Versuche entnommen und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Den Seren wurde ein Tropfen Chloroform (ca. 15 µl) hinzugegeben, während den *buffy coat*-Proben je 750 µl Puffer AS1 zugefügt wurde.



**Abbildung 6: Blutentnahme zur Probengewinnung.**

Während der diagnostischen Lumbalpunktion wurden je zweimal 750 µl Liquor von den Patienten gewonnen, denen anschließend ebenfalls ein Tropfen Chloroform bzw. 750 µl Puffer AS1 zugegeben wurde. Direkte Sonnenexposition und heiße Räume wurden sowohl bei der Probengewinnung als auch bei der weiteren Bearbeitung gemieden. Sämtliche Proben wurden im Folgenden bei -20 °C gelagert, wobei die Latenzzeit von Abnahme bis Lagerung nie größer als acht Stunden war. Der Transport von Angola nach Deutschland erfolgte in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporkiste. Die weitere Lagerung fand bis zur Analyse ebenfalls bei -20 °C statt.

### 3.2.3 Klinische Untersuchung der Patienten

Alle klinischen Untersuchungen wurden entweder direkt nach der Diagnostik oder bis zu drei Tage danach durchgeführt. Sie umfassten neben der anamnestischen Befragung nach vorhergehenden Schlafkrankheits-Episoden folgende Kriterien:

- (1) Einschätzung des Allgemeinzustandes (AZ).
- (2) Messung der Größe und des Gewichtes sowie der axillären Temperatur.
- (3) Messung des Pulses und des Blutdruckes jeweils im Liegen und im Stehen.
- (4) Bimanuelle Palpation des Abdomens, der Leber und der Milz sowie Erfassung von abdominalem Schmerz.
- (5) Palpation von Lymphadenopathien der *Regiones occipitalis, cervicalis anterior et posterior, supraclavicularis, epitrochlearis et inguinalis*.
- (6) Beurteilung von Gang und Stand sowie des Seiltänzeranges (STZG).

Die Werte der unter (2) angegebenen Untersuchungen wurden zum Teil aus den Krankenakten übernommen und zum Teil selbst gemessen. Die Größe und das Gewicht der Patienten wurden verwendet, um mittels der Formel  $BMI = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Körpergröße im Quadrat [m}^2\text{]}$  den *body mass index* zu bestimmen. Die Blutdruckmessungen (3) erfolgten mit zentrumseigenen, herkömmlichen Blutdruckmanschetten am rechten Oberarm. Sie konnten bei Kindern unter zwölf Jahren nicht durchgeführt werden, da vor Ort keine Kindergrößen dieser Manschetten verfügbar waren. Die Ermittlungen der Größen von Hepar und Splen (4) erfolgten allein mittels Tastbefund, da vor Ort kein Ultraschallgerät zu Verfügung stand. Die Palpation der zervikalen Lymphknoten (5) wurde in bimanueller Technik von dorsal ausgeführt. Bei der Untersuchung des Standes (6) wurde überprüft, ob ein Patient in der Lage war aufzustehen und ohne Hilfestellung sicher stehen zu können. Als abnorm galten Pro-, Retro- oder Lateropulsion mit offenen bzw. geschlossenen Augen (Romberg-Versuch). Die Untersuchung des normalen Ganges und des Seiltänzeranges wurden über eine Distanz von mindestens fünf Metern ausgeführt. Als pathologisch wurden Fallneigungen, Gangabweichungen oder ein stark schlurfendes Gangbild gewertet. Bei der Beurteilung des Seiltänzeran-

ges wurde ein Resultat als krankhaft beurteilt, wenn während der Prüfung Ataxien und/oder Fallneigungen auftraten.

### 3.2.4 Kultur der Trypanosomen

Nach der von Baltz *et al.* (1985) beschriebenen Methode wurden *T.b.b.* in Kultur gehalten [5]. Hierzu wurden die Trypanosomen in Zellkulturflaschen mit 5 ml Baltz-Medium *Complete-Solution* gegeben. Das Baltz-Medium wurde wie unter 3.1.5 beschrieben hergestellt. Die Vermehrung der Parasiten fand bei 37 °C und 4,9% CO<sub>2</sub>-Zufuhr statt. Um günstige Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden die Trypanosomen in Konzentrationen zwischen 10<sup>4</sup>/ml und 4 x 10<sup>6</sup>/ml gehalten. Die Konzentrationsbestimmung der Parasiten im Baltz-Medium erfolgte durch Entnahme von 10 µl der Kultursuspension und anschließender Zählung der Trypanosomen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Falls erforderlich, wurde anschließend eine Teilmenge des trypanosomenhaltigen Kulturmediums in ein neues Kulturgefäß überführt.

### 3.2.5 PCR

#### 3.2.5.1 Prinzip der PCR

Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, das zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten *in vitro* dient. Die Selektivität der DNA-Neusynthese wird dabei durch die Wahl der Oligonukleotide (Primer), welche als Startpunkte der Replikation der zu amplifizierenden DNA-Sequenz dienen, erreicht. Die Polymerasekettenreaktion setzt sich aus drei Schritten zusammen:

- (1) Denaturierung des DNA-Doppelstranges zu zwei DNA-Einzelsträngen bei 92 bis 96 °C.
- (2) Hybridisieren der Primer am jeweilig komplementären Teil der DNA-Matrize bei 45 bis 72 °C (Annealing).
- (3) Verlängerung des DNA-Stranges zu einem neuen DNA-Doppelstrang durch schrittweises Hinzufügen von Desoxynukleotiden (dNTPs) an das 3'OH-Ende des Primers bei 72 °C (Elongation). Üblicherweise wird die hitzestabile DNA-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) als Katalysator der DNA-Strangsynthese genutzt.

Die Abfolge dieser drei Schritte wird als Zyklus bezeichnet, wobei sowohl die Temperatur als auch die Reaktionszeit jedes einzelnen Schrittes fest gewählt sind und sich auch in nachfolgenden Zyklen nicht verändern. Die aufeinander folgenden Wiederholungen eines Zyklus führen zur Amplifikation der DNA. Vorausgesetzt, dass die Elongationszeit in jedem Zyklus lang genug gewählt wurde, so dass der neu entstehende Strang eine potentielle Bindungsstelle für den jeweilig anderen Primer im darauf folgenden Zyklus darstellen kann, kommt es zu einer Vergrößerung des Pools an DNA-Vorlagen. Zunächst entstehen neue DNA-Stränge

undefinierter Länge, in den nachfolgenden Zyklen jedoch DNA-Amplifikate mit definierter Länge. Die Länge dieses DNA-Stückes sowie dessen Position im Genom richtet sich nach Sequenz der Primer.

Die mittels PCR erhaltenen DNA-Fragmente können durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Eine Methode, die Länge der amplifizierten DNA-Stücke darzustellen ist, das PCR-Produkt in die Taschen eines erstarrten 1,5%-Agarose-Gels zu pipettieren und es durch Anlegen von Spannung durch das Gel laufen zu lassen. Kürzere DNA-Fragmente durchlaufen das Gel schneller als längere, so dass sich auf diese Weise verschieden lange DNA-Amplifikate voneinander trennen. Unter UV-Licht stellen sich so Anhäufungen von DNA-Stücken gleicher Länge als einzelne Banden dar, deren Länge in Basenpaaren (bp) mit Hilfe eines Markers ermittelt werden kann.

### 3.2.5.2 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Göttingen

#### 3.2.5.2.1 Purifikation parasitärer DNA für Positiv- und Negativkontrollen aus Kulturmedium

Die in Kultur gehaltenen Trypanosomen wurden nach der unter 3.2.4 genannten Methode quantifiziert. Einem Kulturmedium mit  $1,8 \times 10^4$  Trypanosomen/ml wurden 1,1 ml entnommen. Dies entsprach einer ungefähren Gesamtmenge von  $2 \times 10^6$  Trypanosomen.

Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. So entstand eine Testlösung mit einem Parasitengehalt von  $10^5$  Trypanosomen/10  $\mu$ l.

Zur Purifizierung der parasitären DNA aus dieser Testlösung wurde ein kommerzielles System (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet [76]. Die Elution erfolgte dabei in 200  $\mu$ l AE-Puffer. Nach Herstellerangaben liegt die DNA-Ausbeute bei Proben mit einer Zellzahl von nicht mehr als  $10^7$  Zellen/ml bei nahezu 100%. Der Anleitung folgend ergab sich also ein Eluat mit gleicher Konzentration an parasitärer DNA wie der aus der Testlösung ( $10^5$  Trypanosomen/10  $\mu$ l). Aus dieser DNA-Lösung wurden 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt: Es wurden 100  $\mu$ l der DNA-Lösung in 900  $\mu$ l AE-Puffer gegeben, das Ganze durchmischt und hieraus wiederum 100  $\mu$ l in 900  $\mu$ l AE-Puffer pipettiert. Auf diese Weise entstanden Lösungen mit in 10er-Potenzen absteigenden DNA-Konzentrationen von  $10^5$  Trypanosomen/10  $\mu$ l bis 1 Trypanosom/10  $\mu$ l.

Die mittels dieser Methode gewonnene Parasiten-DNA diente für die nachfolgenden Versuche und Probenanalysen als Positivkontrolle. Die Aufarbeitung der Negativkontrolle erfolgte ebenfalls nach demselben Verfahren; anstelle des Probengutes wurde jedoch Aqua bidest. verwendet. Positiv- und Negativkontrollen wurden zum Ausschluss falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse in jedem Versuchsansatz und in jedem Test zur Probenanalytik systematisch mitgeführt.

### 3.2.5.2.2 Amplifikation der Gene ESAG6 und 7 mittels PCR

Das Amplifikat ergab sich bei dieser PCR durch den Einsatz der Primer MUSEQ1 und MUSEQ2, die spezifisch für die Gene ESAG6 und 7 des Transferin-Rezeptors von *T.b. spp.* sind [36]. DNA-Isolate von *T.b.b.* (s. 3.2.5.2.1) wurden in Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000 Trypanosomen/10 µl als Template eingesetzt. Bei der Zugabe der Templates wurden Aerosol-vermeidende Pipettenspitzen verwendet, um falsch-positiven Ergebnissen durch Übertragen von DNA-Molekülen zuvor pipettierter Proben in die nachfolgenden vorzubeugen. Die verbleibenden 40 µl eines jeden 50 µl-Ansatzes setzten sich wie folgt zusammen:

- |  |         |
|--|---------|
| • Primer MUSEQ1 (50 µM)  | 1 µl    |
| • Primer MUSEQ2 (50 µM)  | 1 µl    |
| • Nukleotidgemisch (2,5 mM je Nucleotid)                       | 0,4 µl  |
| • Taq-Polymerase (5 U/µl)                                      | 0,2 µl  |
| • PCR-Reaction-Buffer (10x konzentriert) mit MgCl <sub>2</sub> | 5 µl    |
| • steriles H <sub>2</sub> O                                    | 32,4 µl |

So entstanden 50 µl-Ansätze mit je einer finalen Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 1,5 mM und unterschiedlichen DNA-Mengen. Die Ansätze wurden in den Programmable Thermal Control Thermocycler gestellt und das PCR-Programm unter den von Karibi *et al.* (1999) publizierten Bedingungen gestartet [36]:

- |                                  |           |             |
|----------------------------------|-----------|-------------|
| ○ Initiale Denaturierung (95 °C) | 1 Minute  | } 30 Zyklen |
| ○ Denaturierung (94 °C)          | 1 Minute  |             |
| ○ Hybridisierung (60 °C)         | 1 Minute  |             |
| ○ Elongation (72 °C)             | 1 Minute  |             |
| ○ Finale Elongation (72 °C)      | 7 Minuten |             |

Danach folgte eine Abkühlung auf 4 °C, bis das Programm gestoppt wurde. Bis zur Auftragung in der Gelelektrophorese erfolgte die Lagerung der PCR-Amplifikate bei 6 °C.

### 3.2.5.2.3 Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Um ein 1,5%iges Agarose-Gel zu erhalten, wurden 0,9 g Agarose NEEO mit 60 ml 1x TAE-Puffer in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben vermischt und anschließend für zwei bis drei Minuten bei 450 Watt in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach der Zugabe von 0,6 µl 1%-Ethidiumbromid (EtBr) und nochmaligem Schwenkdurchmischen wurde das Gel in die mit Kämmen besetzte Elektrophorese-Kammer gegossen. Nach dem vollständigen Erstarren wurden die Kämmen entfernt und das Gel in das mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Bad gestellt. Nun wurden 10 µl des PCR-Produktes auf Parafilm mit 2 µl Loading Dye durchmischt und 10 µl dieses Gemisches in die entstandenen Geltaschen pipettiert. In eine leere Geltasche wurden außerdem 3 µl DNA-Längenmarker gegeben.

Durch das Anlegen von 120 V Spannung über 40 Minuten wurden die DNA-Amplifikate von anderen DNA-Molekülen ebenso getrennt wie die verschiedenen langen DNA-Fragmente des Längenmarkers. Das Gel wurde durch 10-minütiges Baden in Aqua dest. entfärbt und nachfolgend in einer Dunkelkammer auf eine UV-Lichtplatte gelegt. Durch UV-Licht (260nm) wurden so die einzelnen mit EtBr-gefärbten DNA-Anhäufungen als Banden sichtbar und konnten abfotografiert werden. Der Vergleich zu den einzelnen Banden des DNA-Längenmarkers ermöglichte die Abschätzung der ungefähren Länge der Amplifikate.

#### 3.2.5.2.4 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR

Die unter 3.2.5.2.1 gewonnenen DNA-Isolate wurden als Template für die von Matovu *et al.* (2001) beschriebene PCR eingesetzt [60]. Der Reaktionsansatz für die Amplifikation einer Probe setzte sich in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach den gleichen Bedingungen wie unter 3.2.5.2.2 beschrieben zusammen, es wurden lediglich andere Primer verwendet:

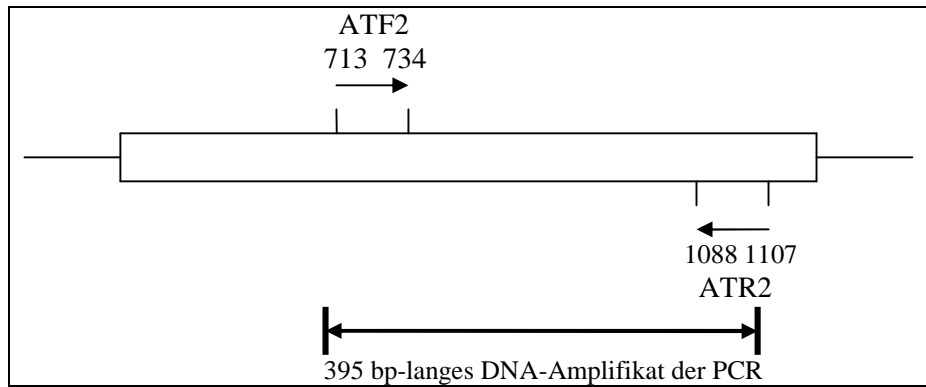
- Primer ATF2 (50 µM) 1 µl
- Primer ATR2 (50 µM) 1 µl

Anschließend wurden erneut je 10 µl der DNA-Lösung mit Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000 Trypanosomen/10 µl und eine Negativkontrolle als Template unter Verwendung von Aerosol-vermeidenden Pipettenspitzen zugegeben. Hieraus ergaben sich ein Volumen von 50 µl und eine MgCl<sub>2</sub>-Endkonzentration von 1,5 mM je PCR-Ansatz.

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in den Thermocycler gestellt und das PCR-Programm unter den publizierten Bedingungen gestartet:

- Initiale Denaturierung (94 °C) 5 Minuten
  - Denaturierung (94 °C) 1 Minute
  - Hybridisierung (55 °C) 2 Minuten
  - Elongation (72 °C) 2 Minuten
  - Finale Elongation (72 °C) 10 Minuten
- } 30 Zyklen

Es erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C und eine anschließende Lagerung bei 6 °C bis zur Auftragung in der Gelelektrophorese (s. 3.2.5.2.3). Für den so zu amplifizierenden DNA-Abschnitt wurde eine Stranglänge von 395 bp erwartet, welche sich aus den Positionen der Primer ergab: ATF2 und ATR2 liegen im Genom von *T.b. spp.* an den Basenpositionen 713 bis 734 (ATF2) bzw. 1088 bis 1107 (ATR2) des TbAT1-Genes [1]. Die Lage der Primer und die Länge des Amplifikates werden schematisch in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Position der Primer ATF2 und ATR2 im TbAT1 Gen.** Parallele Linien: Doppelstrang der DNA; Einfache Pfeile: Position und Richtung der jeweiligen Primer; Endbegrenzte Pfeile: Position und erwartete Länge des Amplifikates.

Die Variationen von Parametern wie Magnesium-Konzentration, Annealing-Temperatur und Anzahl der Zykluswiederholungen sowie deren Einfluss auf das PCR-Ergebnis werden unter 4.2.1.2 dargestellt. Auf Basis der in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse wurden zur Amplifikation des TbAT1-Genes schließlich folgende, optimierte Konditionen festgesetzt:

- |  |         |
|--|---------|
| • Primer ATF2 (50 µM)  | 1 µl    |
| • Primer ATR2 (50 µM)  | 1 µl    |
| • Nukleotidgemisch (2,5 mM je Nucleotid)                       | 0,4 µl  |
| • Taq-Polymerase (5 U/µl)                                      | 0,2 µl  |
| • PCR-Reaction-Buffer (10x konzentriert) mit MgCl <sub>2</sub> | 5 µl    |
| • MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                    | 0,5 µl  |
| • steriles H <sub>2</sub> O                                    | 31,9 µl |

Somit lag eine finale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,75 mM für jeden 50 µl-Ansatz vor. Das Programm des Thermocyclers wurde wie folgt definiert:

- |                                  |            |             |
|----------------------------------|------------|-------------|
| ○ Initiale Denaturierung (94 °C) | 5 Minuten  | } 45 Zyklen |
| ○ Denaturierung (94 °C)          | 1 Minute   |             |
| ○ Hybridisierung (65 °C)         | 2 Minuten  |             |
| ○ Elongation (72 °C)             | 1 Minute   |             |
| ○ Finale Elongation (72 °C)      | 10 Minuten |             |

Es erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C, bis das Programm gestoppt wurde.

#### 3.2.5.2.5 PCR-Versuch zur Probenlagerung

Die Konzentration der in Kultur gehaltenen Trypanosomen wurde im Kulturmedium bestimmt und 5,5 µl des Mediums mit  $4 \times 10^6$  Trypanosomen/ml in 200 µl Vollblut gegeben. Das Blut enthielt somit näherungsweise  $2,2 \times 10^4$  Trypanosomen. Dieser Ansatz wurde in dreifacher Ausfertigung angesetzt, genau wie je einer in einer 1:10-Verdünnung und 1:100-Verdünnung des Mediums (10 µl Medium + 90 µl PBS bzw. 10 µl Medium + 990 µl PBS). Die Verdün-



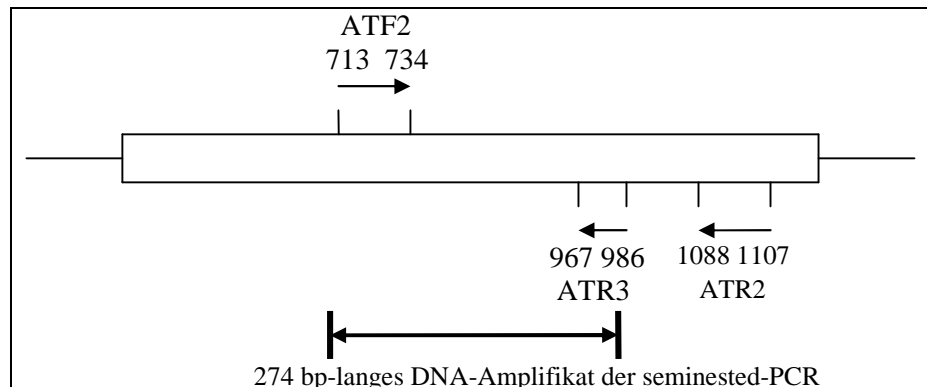
nungsansätze enthielten also näherungsweise  $2,2 \times 10^2$  bzw.  $2,2 \times 10^3$  Trypanosomen/200  $\mu$ l Vollblut. Diese Testproben wurden an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur gelagert. Nach jeweils 10, 20 und 30 Tagen wurde eine Testprobe von Blut und Liquor der DNA-Purifikation zugeführt. Hierbei wurde eine modifizierte Variante der unter 3.2.5.2.1 beschriebenen Methode benutzt. So wurde statt des Lysis-Puffers AL der Lysis-Puffer AS verwendet, welcher sich aus den beiden Komponenten Puffer AS1 und Puffer AS2 zusammensetzt. Der Puffer AS1 wurde in äquivalenten Mengen direkt zu den Proben gegeben. Das aus dieser Variante entwickelte Anwendungsprotokoll sah außerdem die Benutzung einer Menge von nur 180  $\mu$ l Probenvolumen vor [75]. Übertragen auf die Testproben entsprach dies jeweils einer Gesamtmenge von ca.  $2 \times 10^4$  (bzw.  $2 \times 10^3$  und  $2 \times 10^2$ ) Trypanosomen, deren Elution in 200  $\mu$ l Puffer AE erfolgte. Da der DNA-Verlust bei Elution von Blutproben in 200  $\mu$ l laut Herstellerangaben vernachlässigbar klein ist (s. 5.2.2), befanden sich jeweils die eingesetzten DNA-Mengen von  $2 \times 10^4$  (bzw.  $2 \times 10^3$  und  $2 \times 10^2$ ) Trypanosomen/200  $\mu$ l im Eluat. Dies entsprach DNA-Konzentrationen von  $10^3$  (bzw.  $10^2$  und 10) Trypanosomen/10  $\mu$ l.

Für die Herstellung der Liquortestproben wurden 1,6  $\mu$ l trypanosomenhaltiges Kulturmedium der oben erwähnten Ausgangskonzentration in 200  $\mu$ l Liquor gegeben. Dies entsprach näherungsweise einer Konzentration von  $6,4 \times 10^3$  Trypanosomen/200  $\mu$ l Liquor. Durch den Einsatz von 180  $\mu$ l Probengut wurden demnach  $5,76 \times 10^3$  Trypanosomen der DNA-Purifikation zugeführt. Nach den Herstellerempfehlungen für Liquorproben erfolgte die Elution in 50  $\mu$ l Puffer AE, wodurch sich ca. 86% der eingesetzten DNA im Eluat finden, d.h.  $4,95 \times 10^3$  Trypanosomen/50  $\mu$ l. Dies entspricht einer Konzentration von  $0,99 \times 10^3$  oder näherungsweise  $10^3$  Trypanosomen/10  $\mu$ l. Mit den 1:10- und 1:100-Verdünnungen des parasitenhaltigen Ausgangsmediums wurde entsprechend verfahren. Die an Tag 10 entnommenen Liquorproben wurden irrtümlicher Weise in 200  $\mu$ l statt in 50  $\mu$ l eluiert. Dies führte zu Eluat-Konzentrationen, die nur  $\frac{1}{4}$  des Angestrebten betragen: 250, 25 bzw. 2,5 Trypanosomen/10  $\mu$ l. Die so erhaltenen DNA-Eluate wurden anschließend unter den unter 3.2.5.2.4 definierten Bedingungen an dem jeweiligen Tag der DNA-Purifikation mittels PCR amplifiziert.

#### 3.2.5.2.6 Vorversuche zur seminested-PCR

Der Reaktionsansatz war dem der vorhergegangenen PCR identisch (s. 3.2.5.2.4), außer dass als Template anstatt 10  $\mu$ l nur 2  $\mu$ l des Produktes der primären PCR und dementsprechend 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mehr verwendet und anstelle des Primers ATR2 der weiter „innen“ im Gen liegende Primer ATR3 (ebenfalls 1  $\mu$ l von einer 50  $\mu$ M Lösung) zugegeben wurde. Außerdem wurde die Anzahl der Amplifikationszyklen auf 40 reduziert. Als Negativkontrolle diente analog zu den Proben jeweils das Produkt der Negativkontrolle der primären PCR. Durch die Verwendung der Primer ATF2 (lokalisiert an den Basenpositionen 713 bis 734 des TbAT1-

Gens) und ATR3 (lokalisiert an den Basenpositionen 967 bis 986 des TbAT1-Gens) wurde bei der Amplifikation ein 274 bp-langer DNA-Strang erwartet (s. Abbildung 8).



**Abbildung 8: Position der Primer ATF2, ATR2 und ATR3 im TbAT1-Gen.** Parallele Linien: Doppelstrang der DNA; Einfache Pfeile: Position und Richtung der jeweiligen Primer; Endbegrenzte Pfeile: Position und erwartete Länge des Amplifikates.

### 3.2.5.3 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Würzburg

#### 3.2.5.3.1 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Kulturmedium

Unter Verwendung des optimierten PCR-Protokolls der Göttinger Versuche (s. 3.2.5.2.4) wurde eine PCR mit purifizierter DNA von  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 Trypanosomen/10  $\mu\text{l}$  gefahren. Hierbei kam ein PCR-Reaktions-Puffer ohne  $\text{MgCl}_2$ -Zusatz zur Anwendung. Um in einem 50  $\mu\text{l}$ -Ansatz eine finale Konzentration von 1,75 mM zu erreichen, wurden 3,5  $\mu\text{l}$  des 25 mM  $\text{MgCl}_2$  und entsprechend weniger  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben. Die Produkte dieser PCR wurden anschließend in die Taschen eines 1,5%-Agarose-Gels pipetiert und der Elektrophorese zugeführt (s. 3.2.5.2.3).

Die Variationen von Parametern wie Magnesium-Konzentration, Annealing-Temperatur und Anzahl der Zykluswiederholungen sowie deren Einfluss auf das PCR-Ergebnis werden unter 4.2.2.1 dargestellt. Aufgrund der in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse wurde zur Amplifikation des TbAT1-Genes schließlich folgende, optimierte Zusammensetzung für einen 50  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz gewählt:

- |   |                    |
|---|--------------------|
| • Purifizierte DNA (Template)                                 | 10 $\mu\text{l}$   |
| • Primer ATF2 (50 $\mu\text{M}$ )                             | 1 $\mu\text{l}$    |
| • Primer ATR2 (50 $\mu\text{M}$ )                             | 1 $\mu\text{l}$    |
| • Nukleotidgemisch (2,5 mM je Nucleotid)                      | 0,4 $\mu\text{l}$  |
| • Taq-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )                        | 0,2 $\mu\text{l}$  |
| • $\text{MgCl}_2$ (25 mM)                                     | 5 $\mu\text{l}$    |
| • PCR-Reaction-Buffer (10x konzentriert) ohne $\text{MgCl}_2$ | 5 $\mu\text{l}$    |
| • steriles $\text{H}_2\text{O}$                               | 27,4 $\mu\text{l}$ |

Hieraus ergab sich eine  $MgCl_2$ -Endkonzentration von 2,5 mM je PCR-Ansatz. Das Programm für den Thermo-Cycler wurde wie folgt definiert:

- |                                  |            |             |
|----------------------------------|------------|-------------|
| ○ Initiale Denaturierung (94 °C) | 5 Minuten  | } 45 Zyklen |
| ○ Denaturierung (94 °C)          | 1 Minute   |             |
| ○ Hybridisierung (66,1 °C)       | 2 Minuten  |             |
| ○ Elongation (72 °C)             | 1 Minute   |             |
| ○ Finale Elongation (72 °C)      | 10 Minuten |             |

Es erfolgte eine Abkühlung auf 10 °C, bis das Programm gestoppt wurde. Mit diesen Einstellungen wurden auch die Patientenproben analysiert.

#### 3.2.5.3.2 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Blut und Liquor

Analog zu dem Versuch zur Probenlagerung in Göttingen (s. 3.2.5.2.5) wurden DNA-Isolate aus Blut und Liquor gewonnen, deren Eluate DNA-Konzentrationen von  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 bzw. 1 Trypanosomen/10  $\mu$ l enthielten. Die derart purifizierte DNA wurde nachfolgend als Template den unter 3.2.5.2.4 definierten PCR-Bedingungen zugeführt.

#### 3.2.5.3.3 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels seminested-PCR

Die Produkte des in 3.2.5.3.1 beschriebenen PCR-Experimentes wurden als Template einer seminested-PCR zugeführt. Dabei wurde wie unter 3.2.5.2.6 beschrieben vorgegangen, allerdings wurde das auf 40 Zyklen reduzierte PCR-Protokoll benutzt (s. 3.2.5.3.1).

#### 3.2.5.3.4 Überprüfung der Spezifität der PCR mittels Toxoplasmen-DNA

Zum Nachweis von Toxoplasmen wurde purifizierte DNA des Mikrobiologischen Institutes der Universität Göttingen in die unter 3.2.5.3.1 beschriebene PCR eingesetzt. Dabei kamen DNA-Konzentrationen von  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 Toxoplasmen/10  $\mu$ l zum Einsatz. Nachfolgend wurden 2  $\mu$ l der Produkte dieser PCR der unter 3.2.5.3.3 beschriebenen seminested-PCR zugeführt.

#### 3.2.5.4 Probenaufbereitung und -analyse

##### 3.2.5.4.1 DNA-Purifikation aus Blut- und Liquorproben und Analyse mittels PCR

Die Purifikation der DNA aus den Liquorproben fand sofort nach dem Auftauen bei 37 °C unter Elution in 50  $\mu$ l statt (s. 3.2.5.2.5). Die Gemische aus 750  $\mu$ l *buffy coat*-Probe und 750  $\mu$ l Puffer AS1 waren nach dem Auftauen zunächst in einem gelatinösen Zustand. Statt der ursprünglich vorgesehenen Menge von 180  $\mu$ l wurde das Gesamtvolumen von 750  $\mu$ l behandelt: Um das Gesamtverhältnis von Probengut und Beimischungen des DNA-Purifikationsverfahren zu wahren, wurde der Faktor 4,17 (750/180) für die Zugaben der Kit-Bestandteile gewählt. Durch Zugabe der Proteinase K (4,17 x 20  $\mu$ l = 83  $\mu$ l) und des Puffers

AS2 (4,17 x 40 µl = 166,8 µl) wurde das Gemisch nach einer verlängerten Inkubationszeit von bis zu einer Stunde auf diese Weise flüssig und somit pipettierbar. Nachfolgend wurden wieder die Mengenangaben nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Die Lagerung der purifizierten DNA bis zum Einsatz in der PCR erfolgte bis zu drei Tage bei 6 °C. Zur Analyse der DNA der Blut- und Liquorproben kam das unter 3.2.5.3.1 beschriebene PCR-Protokoll zur Anwendung. Positiv- und Negativkontrollen wurden dabei zum Ausschluss falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse in jeder PCR systematisch mitgeführt. Als Positivkontrollen diente purifizierte DNA von *T.b.b.* aus Kulturmedium mit DNA-Konzentrationen von 10<sup>2</sup> Trypanosomen/10 µl (s. 3.2.5.2.1). Die Aufarbeitung der Negativkontrollen erfolgte jeweils im gleichen Durchgang und in demselben Verfahren wie das der Proben. Anstelle des Probengutes wurde jedoch Aqua bidest. verwendet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte eine Wiederholung der PCR von 55 Blut- und 52 Liquorproben. Hierbei wurde in 51 bzw. 32 Fällen purifizierte DNA aus 540 ml Probengut angewendet, in den übrigen Fällen fand die Wiederholung mit purifizierter DNA aus 180 ml Probengut statt. Die Purifizierung der DNA aus 540 ml Probengut erfolgte durch dreifache Auftragung des Probengutes auf die Qiagen-Spinsäulen mit jeweils anschließender Zentrifugierung nach Herstellerangaben [75], ansonsten wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

#### 3.2.5.4.2 Probenanalyse mittels seminested-PCR

Manche Liquorproben wurden einer seminested-PCR zugeführt. Dabei wurde das unter 3.2.5.3.3 beschriebene Verfahren angewendet. Bei der mitgeführten Positivkontrolle wurde das Produkt der primären PCR jedoch 1:1000 verdünnt. Die Negativkontrolle wurde entsprechend den Testproben unverdünnt aus der primären PCR entnommen und in die seminested-PCR eingesetzt.

### 3.2.6 IFT

#### 3.2.6.1 Prinzip des IFT

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz dient zum Nachweis von Antikörpern aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten und beruht auf dem Prinzip eines Sandwichtestes: Trypanosomen werden auf Objektträger aufgebracht, fixiert und mit dem zu testenden Patientenmaterial inkubiert. Enthält die Testsubstanz spezifische Antikörper, so binden diese an das Trypanosomen-Antigen, wobei auch die Antikörper selbst antigene Determinanten tragen. Nach einem Waschschrift, bei dem ungebundenes Immunglobulin entfernt wird, folgt eine zweite Inkubation mit Fluoreszein-markiertem Antihumanglobulin. Dieses bindet nun seinerseits an den Antigen-Antikörper-Komplex. Nicht gebundenes Antihumanglobulin wird durch erneutes Waschen entfernt, so dass sich nun nur noch an das fixierte Antigen gebun-

dene Komplexe aus Antikörpern und Antihumanglobulin auf dem Reaktionsfeld befinden. Wird das Präparat unter UV-Beleuchtung mikroskopiert, bewirkt das einstrahlende Licht eine Fluoreszenzanregung, wodurch das markierte Antihumanglobulin gelblich-grün leuchtet. Falls dem Antihumanglobulin ein bläulicher Farbstoff wie z.B. Evans Blue hinzugefügt wird, kommt es zur Gegenfärbung: Die nicht mit Antikörper-Antihumanglobulin-Komplex besetzten Stellen der Parasiten erscheinen unter UV-Licht rötlich, wodurch sich die Kontrastierung des Gesamtbildes erhöht.

Die Verwendung von Antihuman-IgM, -IgG, oder -IgA, welche spezifisch an die Antikörper der jeweiligen Klassen binden, erlaubt die Differenzierung der verschiedenen Antikörpertypen. Durch das Auftragen von definierten Verdünnungen einer Testsubstanz kann der Antikörpertiter bestimmt werden.

### 3.2.6.2 Vorversuche zum IFT

#### 3.2.6.2.1 Beschichtung der Objektträger

Auf die Reaktionsfelder der Objektträger wurde trypanosomenhaltiges Baltz-Medium in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen und durch Anwärmen auf einer Heizplatte oder einem metallenen Deckel eines Wasserbades bei ca. 40 °C getrocknet. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden erreicht, indem höher konzentriertes Ausgangsmedium mit PBS verdünnt wurde. So wurden z.B. 1 ml Medium mit  $4,4 \times 10^6$  Trypanosomen/ml 0,76 ml PBS zugefügt, einem 1,76 ml Medium-PBS-Gemisch mit  $2,5 \times 10^6$  Trypanosomen/ml entsprechend.

Folgende Mengen und Konzentrationen wurden zur Erprobung der Trypanosomen-Fixierung auf Objektträger aufgetragen:

|       |        |                                      |
|-------|--------|--------------------------------------|
| 5 µl  |        | • $0,86 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |
| 10 µl |        | • $1,34 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |
| 15 µl | von je | • $1,73 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |
| 20 µl |        | • $2,01 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |
| 25 µl |        | • $2,68 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |
|       |        | • $3,46 \times 10^6$ Trypanosomen/ml |

Anschließend wurden die so beschichteten Objektträger für acht bis zehn Minuten in Aceton oder gekühltes Methanol getaucht. Nach der erneuten Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger unter einem Mikroskop hinsichtlich der Verteilung der Trypanosomen und der Klarheit des Hintergrundes begutachtet. Nach dem Trocknen bei Raumluft wurden die Objektträger in Aufbewahrungskisten bei -20 °C gelagert.

### 3.2.6.2.2 Anlegen von Verdünnungsreihen

Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Serums von 1:20 bis 1:2560 angelegt. Die 1:20-Verdünnung erfolgte, indem zu 10 µl Serum 190 µl PBS gegeben wurde. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden 100 µl dieser Verdünnung in das erste Feld einer Mikrotiterplatte gegeben, während in die nachfolgenden Felder je 50 µl PBS gegeben wurde. Anschließend wurden 50 µl der 1:20-Verdünnung mit den 50 µl des Folgefeldes vermischt. Aus der so entstandenen 1:40-Verdünnung wurden wiederum 50 µl mit 50 µl PBS des Folgefeldes durchmischt. Dieses Verfahren wurde mit den neu entstandenen Verdünnungen und den entsprechenden Folgefeldern solange wiederholt, bis in einer Reihe einer Mikrotiterplatte folgende Verdünnungsreihe entstanden war:

| Feld-Nr.   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7      | 8      |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Verdünnung | 1:20  | 1:40  | 1:80  | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:2560 |
| Menge      | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl  | 100 µl |

### 3.2.6.2.3 Schachbrett-Titration

Das BNI stellte freundlicher Weise ein Testserum zu Verfügung, dessen anti-trypanosomaler IgG-Titer auf 1:640 bestimmt worden war. Dieses Serum wurde fortan als Positivkontrolle und Mittel in einer Schachbrett-Titration zur Justierung der Testschritte genutzt.

Nach dem Auftauen der Objektträger über 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Serum in Verdünnungen von 1:320 bis 1:1280 auf die Reaktionsfelder 1 bis 6 und auf die Felder 9 und 10 eine Negativkontrolle (s. 3.2.6.5), jeweils in 10 und 20 µl, aufgetragen. Derart wurden vier Objektträger ausgestattet. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS abgespült und dann für zehn Minuten in einer mit PBS gefüllten Küvette gewaschen. Nach dem Trocknen mittels Filterpapier wurden äquivalente Mengen (also 10 bzw. 20 µl) von FITC-konjugiertem Antihuman-IgG auf die Reaktionsfelder aufgetragen. Da nach Herstellerangaben das Antihuman-globulin in Verdünnungen von 1:50 bis 1:200 benutzt werden sollte, wurde jeweils ein Objektträger mit Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:200 bzw. 1:400 beschichtet. Erneut wurde in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, bevor wiederum abgespült und die 10-minütige Waschung mit PBS durchgeführt wurde. Nachdem die Objektträger abermals mit Filterpapier getrocknet wurden, wurden sie mit Fluoprep eingedeckt und mit einem Abdeckglas versehen. Die Präparate wurden innerhalb von 24 Stunden unter Anregung von UV-Licht eines Fluoreszenz-Systems (BH-2-RFCA mit 100 Watt-Quecksilberdampf-Brenner von Olympus) und Verwendung von 40er Objektiven mikroskopiert. Eine Reaktion wurde als positiv gewertet, wenn mindestens 50% der Trypanosomen eine deutliche Fluoreszenz zeig-

ten. Als Antikörpertiter wurde der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung genommen, die mit dem Antigen noch eine positive Reaktion ergab.

### 3.2.6.3 Versuch zur Probenlagerung

Es wurden zu 500 µl Serum eines Toxoplasma-Patienten der Universitätsklinik Göttingen ein Tropfen Chloroform (ca. 15 µl) hinzu gegeben. Die Probe wurde 30 Tage lang bei Raumtemperatur gelagert und ihr Antikörpertiter anschließend mittels Routine-IFT der serologischen Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen bestimmt.

### 3.2.6.4 Probenanalyse mittels IFT

#### 3.2.6.4.1 Beschichtung der Objektträger

Nach der unter 3.2.6.2.1 beschriebenen Technik wurden auf jedes Reaktionsfeld der Objektträger 20 µl trypanosomenhaltiges Baltz-Medium in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Trypanosomen/ml aufgetragen. Nach der Trocknung bei 40 °C erfolgte die Fixierung durch Eintauchen in Methanol. Nach der erneuten Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger direkt für den IFT verwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.6.4.2 Anlegen von Verdünnungsreihen

Verdünnungsreihen von Serum und Liquor wurden mit PBS hergestellt (s. 3.2.2), wobei der in Angola zugegebene Tropfen Chloroform in der Verdünnungsberechnung vernachlässigt wurde: Für die Bestimmung von IgG und IgA aus Serum wurden die Seren zunächst 1:20 verdünnt und dann wie unter 3.2.6.2.2 beschrieben in Verdünnungen bis zu 1:2560 gebracht. In gleicher Art wurde mit Liquor für die IgG- bzw. IgA-Bestimmung verfahren, die Verdünnungsreihen wurden jedoch schon mit einer 1:10-Verdünnung begonnen. Zusätzlich wurden nach gleicher Methode bei manchen Liquorproben 1:2 und 1:4 Verdünnungen hergestellt. Für die Bestimmung von IgM aus Serum wurde zunächst mit PBS eine 1:10-Verdünnung gebildet (7 µl Serum + 63 µl PBS) und anschließend die gleiche Menge an Rheumafaktor (RF)-Absorbens hinzu gegeben. Die so entstandene 1:20-Verdünnung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde in oben beschriebener Weise eine Verdünnungsreihe von 1:20 bis 1:2560 hergestellt.

Für die IgM-Bestimmung wurde Liquor ebenfalls mit RF-Absorbens behandelt: Einer 1:5 Verdünnung von Liquor mit PBS wurde die gleiche Menge an RF-Absorbens hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur über eine Stunde und dem Anlegen einer Verdünnungsreihe des Faktors 2, ausgehend von der 1:10-Verdünnung.

### 3.2.6.4.3 Inkubieren, Waschen und Auswerten

Nach dem Auftauen der Objektträger über 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden je 20 µl der Serum- bzw. Liquorverdünnungen auf die Reaktionsfelder 1 bis 8 aufgetragen. Zusätzlich wurden je 20 µl einer Positiv- und einer Negativkontrolle (s. 3.2.6.5) auf Feld 9 bzw. 10 gegeben. Es folgten eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C, ein Waschschrift, die Zugabe von 1:100-verdünntem Konjugat mit erneuter 30-minütiger Inkubation, ein abschließender Waschschrift und das Eindecken mit Fluoprep wie unter 3.2.6.2.3 beschrieben. Zur Gegenfärbung der Trypanosomen und Kontrastverschärfung zwischen positivem und negativem Ergebnis wurde die 1:100 Verdünnung des Konjugats dabei zu einem Teil Konjugat, einem Teil Evans Blue und 98 Teilen PBS hergestellt. Die Präparate wurden innerhalb von 24 Stunden unter den unter 3.2.6.2.3 beschriebenen Bedingungen mikroskopiert und ausgewertet.

### 3.2.6.5 Positiv- und Negativkontrollen

Positiv- und Negativkontrollen wurden zum Ausschluss falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse in jedem Versuchsansatz und in jedem Test zur Probenanalytik systematisch mitgeführt. Als Positivkontrollen diente Serum eines Schlafkrankheitspatienten aus Uganda, dessen Titer anti-trypanosomaler Antikörper der Klasse IgG vom BNI auf 1:640 bestimmt worden war sowie Serum eines deutschen Schlafkrankheitspatienten der Würzburger Missionsärztlichen Klinik. Als Negativkontrolle wurde Serum eines gesunden Mitteleuropäers, der sich seit mehr als 20 Jahren nicht mehr in potentiellen Schlafkrankheitsgebieten aufgehalten hat und auch nie Symptome der Krankheit zeigte, verwendet. Positiv- wie Negativkontrollen wurden in 1:20-Verdünnungen in den IFT eingesetzt. Durch Aliquotierung einer größeren Menge dieser Verdünnung konnte ein oftmaliges Einfrieren und Auftauen der Proben verhindert werden.

### 3.2.7 Statistik und Abbildungsnachweis

Die statistischen Analysen wurden in explorativer Weise zur Hypothesengenerierung durchgeführt. Für alle statistischen Berechnungen wurde SPSS für Windows Version 11.0 bzw. Version 12.0 benutzt. Die Abbildungen 12, 13, 15, 21, 22 und 23 wurden ebenfalls mit Hilfe des oben genannten Programms, die Abbildungen 17, 18 und 19 mit Microsoft Excel 2000, die Abbildungen 4, 9 und 16 mit Microsoft Powerpoint 2000 und die Abbildungen 7, 8 und 20 mit Microsoft Paint Version 5.1 erstellt. Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei den restlichen Abbildungen um eigene Fotografien.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Studienkollektiv

#### 4.1.1 Demographische Basisdaten des Studienkollektives

Der Altersmedian lag bei 28,5 Jahren, wobei 22,7% der Studienteilnehmer minderjährig waren. Das Minimum fand sich bei 3, das Maximum bei 86 Jahren. Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung ließ sich mit 46 weiblichen zu 51 männlichen Studienteilnehmern ein ausgeglichenes Verhältnis feststellen. Anamnestisch war zu erheben, dass es sich bei 85 von 88 Patienten (96,6%) um eine Ersterkrankung und bei 3 Fällen (3,4%) um ein Rezidiv mit einer rezidivfreien Zeit von 4 bis 12 Jahren handelte. In 9 Fällen konnte die Angabe nicht ermittelt werden. In Tabelle 2 wird eine Übersicht über diese Daten gezeigt.

**Tabelle 2: Demographische Basisdaten des Studienkollektives**

|  | <i>Anzahl</i>      | <i>Median (Minimum - Maximum)</i> |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| Alter (Jahre)  | n= 96 <sup>a</sup> | 28,5 (3 - 86)                     |
| <i>Häufigkeit (%)</i>                                  |                    |                                   |
| Erwachsene ( $\geq 18$ Jahre) / Kinder ( $< 18$ Jahre) | n= 97              | 75 (77,3%) / 22 (22,7%)           |
| Geschlecht (weiblich / männlich)                       | n= 97              | 46 (47,4%) / 51 (52,6%)           |
| Ersterkrankung / Rezidiv                               | n= 88 <sup>b</sup> | 85 (96,6%) / 3 (3,4%)             |

<sup>a</sup> In einem Fall fehlt eine genaue Altersangabe.

<sup>b</sup> Konnte bei neun Patienten nicht ermittelt werden.

#### 4.1.2 Diagnostische Tests am Studienkollektiv

In Tabelle 3 wird eine Übersicht der Ergebnisse der diagnostischen Laboruntersuchungen der 97 Patienten dieser Arbeit gezeigt. Hierbei ist das Prinzip des Vorgehens und der Reihenfolge der Untersuchungen des angolanischen Personals zu berücksichtigen (s. 2.2).

Bei 44 Patienten wurde von den lokalen Mitarbeitern eine Lymphadenopathie festgestellt und eine LKP angeschlossen. Diese ergab in 31 Fällen einen Parasitennachweis. Aufgrund fehlender Elektrizität konnte in Uíge keine HCT durchgeführt werden. So wurde dieser Diagnostiktest statt der verbleibenden 66 Fälle nur 51-mal angewendet und führte dabei zu 14 positiven Resultaten. Der Nachweis von Trypanosomen gelang mit diesen beiden Techniken somit bei insgesamt 45 von 97 Patienten (46,4%), während sich die Diagnose in den übrigen 52 Fällen (53,6%) auf den serologischen Grenzwert von  $\geq 1:8$  des CATT-Titers stützte.

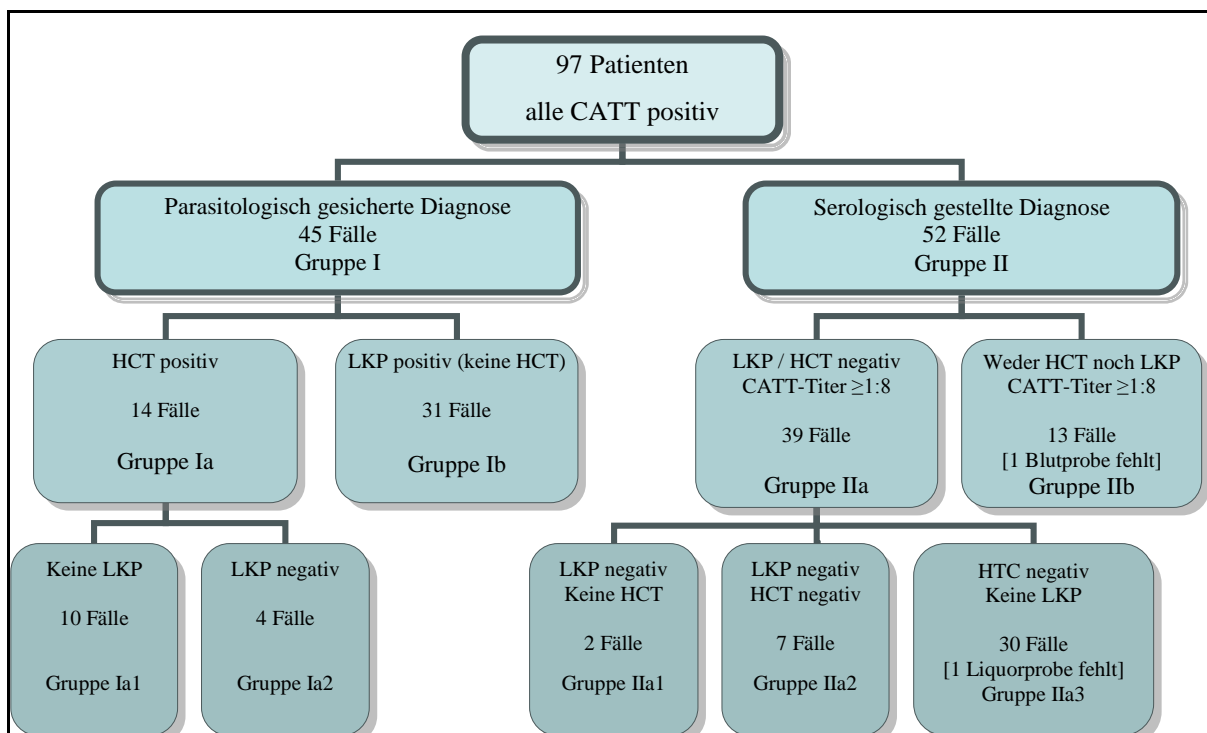
Bei einer Patientin wurde wegen einer Schwangerschaft keine Lumbalpunktion durchgeführt, so dass in diesem Fall keine Stadienzuordnung möglich war. Die verbleibenden 96 Patienten verteilten sich zu 42,7% auf das Stadium I gegenüber 57,3% des Stadiums II. Hierbei wurden in 14,6% der Fälle Trypanosomen per Mikroskopie gefunden. Gemessen an den

Stadium-II-Patienten entsprach dies einer Quote von 25,5%. Die übrigen Stadieneinteilungen basierten auf den gezählten Leukozyten pro mm<sup>3</sup> Lumbalflüssigkeit.

**Tabelle 3: Laborergebnisse des Studienkollektives**

|  | Anzahl | Häufigkeit (%)                             |                                       |
|--|--------|--|---------------------------------------|
| CATT (+ / ++ / +++)  | n= 97  | 49 (50,5%) / 42 (43,3%) / 6 (6,2%)         |                                       |
| LKP (positiv / negativ)  | n= 44  | 31 (70,5%) / 13 (29,5%)                    |                                       |
| HCT (positiv / negativ)  | n= 51  | 14 (27,5%) / 37 (72,5%)                    |                                       |
| CATT-Titer (1:8 / 1:16 / 1:32)   | n= 52  | 31 (59,6%) / 11 (21,2%) / 10 (19,2%)       |                                       |
| Stadieneinteilung (Stadium I / II)                                     | n= 96  | 41 (42,7%) / 55 (57,3%)                    |                                       |
| Trypanosomen im Liquor<br>Alle Patienten (positiv / negativ)           | n= 96  | 14 (14,6%) / 82 (85,4%)                    |                                       |
| Trypanosomen im Liquor<br>Stadium-II-Patienten (positiv / negativ)     | n= 55  | 14 (25,5%) / 41 (74,5%)                    |                                       |
|  |        | <i>Mittelwert<br/>(Standardabweichung)</i> | <i>Median<br/>(Minimum - Maximum)</i> |
| Leukozyten im Liquor<br>Alle Patienten (Zellen/mm <sup>3</sup> )       | n= 96  | 64,67 (130,889)                            | 7 (2 - 606)                           |
| Leukozyten im Liquor<br>Stadium-II-Patienten (Zellen/mm <sup>3</sup> ) | n= 55  | 110,18 (158,74)                            | 31 (6 - 606)                          |

Zusammenfassend kann das Patientenkollektiv unter Angabe der abgenommenen Blut- und Liquorproben in die in Abbildung 9 gezeigten Gruppen eingeteilt werden, auf die im Folgenden verwiesen wird.



**Abbildung 9: Einteilung der Patienten in Gruppen nach Vollständigkeit der Laborergebnisse.** Es ist zu beachten, dass die elf Patienten der Gruppen Ia2 und IIa2 sowohl in den Statistiken der LKP- als auch der HCT-Ergebnisse angeführt werden und in den Gruppen IIa3 bzw. IIb eine Liquor- bzw. eine Blutprobe fehlen.

## 4.2 Ergebnisse der PCR

### 4.2.1 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Göttingen

#### 4.2.1.1 Amplifikation der Gene ESAG6 und 7 mittels PCR

Ein positives Resultat konnte nur für die Testprobe mit einer DNA-Konzentration von  $10^3$  Trypanosomen/10  $\mu$ l festgestellt werden:

| Proben-Nr. | 1                      | 2                      | 3                  | 4                 |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| Template   | $10^3$ T.b./10 $\mu$ l | $10^2$ T.b./10 $\mu$ l | 10 T.b./10 $\mu$ l | 1 T.b./10 $\mu$ l |
| Ergebnis   | positiv (+)            | negativ                | negativ            | negativ           |

Eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 40 oder eine vermehrte Zugabe von Taq-Polymerase mit 5 U statt 1 U pro Ansatz ergab keinen Unterschied im Resultat. Eine Gradienten-PCR mit einer DNA-Konzentration von  $10^3$  Trypanosomen/10  $\mu$ l ergab unter sonst exakt gleichen Bedingungen nachfolgendes Ergebnis:

| Proben-Nr.                           | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Annealing-Temperatur in $^{\circ}$ C | 50,1 | 50,9 | 52,3 | 54,4 | 56,8 | 59,5 | 62,2 | 64,8 | 67,1 | 68,9 | 70,1 |
| Ergebnis                             | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | ++   | -    |

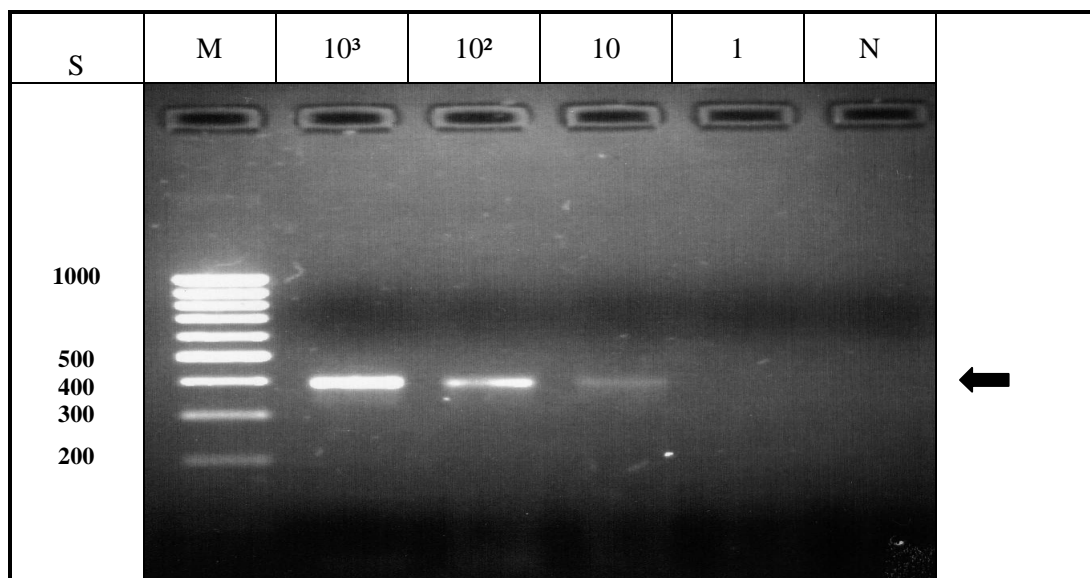
Die stärkste Bande und damit die größte Menge an amplifizierter DNA ergaben sich für Probe Nr.10, bei der eine Annealing-Temperatur von 68,9  $^{\circ}$ C gewählt worden war. Mit dieser optimierten Annealing-Temperatur wurde eine erneute PCR mit DNA-Konzentrationen von  $10$ ,  $10^2$  und  $10^3$  Trypanosomen/10  $\mu$ l gestartet. Es zeigte sich jedoch wiederum nur die Testprobe mit  $10^3$  Trypanosomen/10  $\mu$ l positiv.

#### 4.2.1.2 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR

Es konnten klare Banden für die Testproben mit DNA-Konzentrationen von  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 Trypanosomen/10  $\mu$ l gesehen werden (s. Abbildung 10):

| Proben-Nr. | 1                      | 2                      | 3                  | 4                 |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| Template   | $10^3$ T.b./10 $\mu$ l | $10^2$ T.b./10 $\mu$ l | 10 T.b./10 $\mu$ l | 1 T.b./10 $\mu$ l |
| Ergebnis   | positiv (+++)          | positiv (++)           | positiv (+)        | negativ           |

Der amplifizierte DNA-Abschnitt hatte die erwartete Länge von 395 bp (s. 3.2.5.2.4).



**Abbildung 10: Beispiel eines Ergebnisses der PCR.** S: Skalierung des DNA-Längenmarkers von 1000 bp bis 200 bp; M: DNA-Längenmarker;  $10^3$  bis 1: Testproben mit entsprechenden Äquivalenten trypanosomaler DNA/10  $\mu$ l; N: Negativkontrolle. Der Pfeil verweist auf die DNA-Banden des PCR-Produktes der Testproben, welche sich auf der kalkulierten Höhe von 395 bp befinden. Je deutlicher die Banden hervortreten, desto mehr DNA wurde amplifiziert.

Der Einsatz von 5 U gegenüber 1 U Taq-Polymerase erbrachte eine Abschwächung der Banden und wurde somit nicht weiter verfolgt. Die Variation der  $MgCl_2$ -Konzentration unter Einsatz von Testproben mit DNA-Konzentrationen von  $10^2$ -Trypanosomen/10  $\mu$ l zeigte folgende Resultate:

| Proben-Nr.   | 1   | 2    | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8    |
|--|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Zugabe von 25 mM $MgCl_2$ -Lösung ( $\mu$ l)             | 0   | 0,5  | 1   | 2   | 3   | 5   | 7   | 14   |
| Finale $MgCl_2$ -Konzentration je 50 $\mu$ l-Ansatz (mM) | 1,5 | 1,75 | 2,0 | 2,5 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 10,0 |
| Ergebnis   | ++  | +++  | ++  | ++  | ++  | ++  | +   | +    |

Die stärkste Bande zeigte sich für Probe Nr. 2 mit einer finalen  $MgCl_2$ -Konzentration von 1,75 mM. Somit wurde diese Konzentration für die nachfolgenden Versuche verwendet. Die anschließende Gradienten-PCR ergab folgende Resultate:

| Proben-Nr.                          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Annealing-Temperatur in $^{\circ}C$ | 45,1 | 45,8 | 47,3 | 49,3 | 51,7 | 54,4 | 57,1 | 59,7 | 62,1 | 63,9 | 65,1 |
| Ergebnis                            | +    | +    | +    | +    | ++   | ++   | ++   | ++   | +++  | ++   | +++  |

Das Resultat der Probe Nr. 6, welche einer vergleichbaren Annealing-Temperatur wie der ursprünglich von Matovu *et al.* (2001) publizierten ( $55^{\circ}C$ ) zugeordnet war, wurde als gut bewertet. Die stärkste Bande zeigte sich jedoch für Probe Nr. 11 ( $65^{\circ}C$  Hybridisierungstemperatur), weswegen eine erneute Gradienten-PCR mit einer Verschiebung der Annealing-Temperatur angesetzt wurde:

## Ergebnisse

|                            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Proben-Nr.                 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
| Annealing-Temperatur in °C | 52,2 | 52,9 | 54,4 | 56,4 | 58,8 | 61,5 | 64,2 | 66,8 | 69,1 | 70,9 | 72,0 |
| Ergebnis                   | ++   | ++   | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +++  | ++   | ++   | +    |

Erneut zeigte sich ein gutes Ergebnis für die von Matovu *et al.* (2001) verwendete Hybridisierungstemperatur, jedoch ein noch besseres für Probe Nr. 8 mit einer Temperatur von 66,8 °C. Die Bande dieser Probe war im Vergleich zu derjenigen der Probe Nr. 11 des vorhergehenden Versuches allerdings schwächer. Die Annealing-Temperatur der nachfolgenden Versuche wurde somit auf 65,0 °C festgesetzt. Unter Verwendung der optimierten MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und der verbesserten Annealing-Temperatur wurde eine PCR mit einer Erhöhung der Zyklenzahl auf 40 durchgeführt:

|            |                            |                            |               |              |
|------------|----------------------------|----------------------------|---------------|--------------|
| Proben-Nr. | 1                          | 2                          | 3             | 4            |
| Template   | 10 <sup>3</sup> T.b./10 µl | 10 <sup>2</sup> T.b./10 µl | 10 T.b./10 µl | 1 T.b./10 µl |
| Ergebnis   | positiv (+++)              | positiv (+++)              | positiv (++)  | negativ      |

Unter diesen Bedingungen zeigte sich nun auch die Bande der Testprobe mit 10 Trypanosomen/10 µl deutlich positiv. Eine erneute PCR mit einer Verminderung der Dauer der Hybridisierung und der Elongation auf jeweils eine Minute zeigte eine generelle Abschwächung aller Banden. Wurde jedoch die Annealing-Zeit wieder auf zwei Minuten erhöht, zeigte sich die Bande der Testprobe mit 10 Trypanosomen/10 µl wieder sehr deutlich. Eine Erhöhung auf 45 Zyklen brachte die bisher am besten sichtbare Bande für diese Testprobe, so dass diese Zyklenzahl von nun an gewählt wurde. Die analytische Nachweisgrenze unter diesen optimierten Bedingungen (s. 3.2.5.2.4) betrug somit 10 Trypanosomen/10 µl im 50 µl-PCR-Ansatz.

### 4.2.1.3 PCR-Versuch zur Probenlagerung

Die analytische Nachweisgrenze lag bereits am 10. Tag bei nur noch 10<sup>2</sup> Trypanosomen/10 µl und sank sukzessive ab. Am deutlichsten war dies an den Blutproben erkennbar, da hier nach 30 Tagen nur noch 10<sup>3</sup> Trypanosomen/10 µl nachweisbar waren. Aber auch bei den Liquorproben nahm die Bandenstärke ab, so dass auch hier der Nachweis von 10 Trypanosomen/10 µl spätestens nach 20 Tagen nicht mehr gelang (s. Tabelle 4).

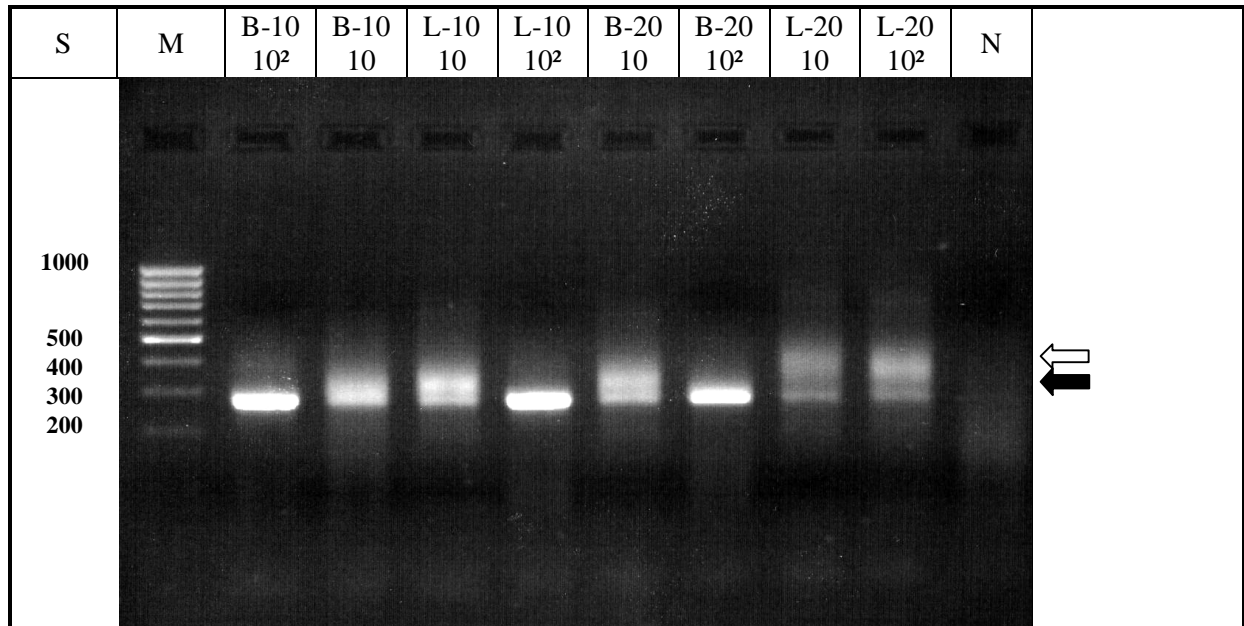
**Tabelle 4: Ergebnisse des PCR-Lagerungsversuches**

| Tag | Testmedium | 10 <sup>3</sup> T.b./10 µl | 10 <sup>2</sup> T.b./10 µl | 10 T.b./10 µl        |
|-----|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| 10  | Blut       | positiv (+++)              | positiv (++)               | negativ              |
|     | Liquor     | positiv (++) <sup>a</sup>  | positiv (+) <sup>a</sup>   | negativ <sup>a</sup> |
| 20  | Blut       | positiv (++)               | positiv (+)                | negativ              |
|     | Liquor     | positiv (+++)              | positiv (++)               | negativ              |
| 30  | Blut       | positiv (+)                | negativ                    | negativ              |
|     | Liquor     | positiv (+++)              | positiv (+)                | negativ              |

<sup>a</sup> Konzentrationen sind hier 250, 25 bzw. 2,5 Trypanosomen/10 µl.

#### 4.2.1.4 Vorversuche zur seminested-PCR

Mit Hilfe dieser Technik konnte ein DNA-Nachweis selbst für die Liquorversuchsproben erbacht werden, die ursprünglich nur das Äquivalent von 10 Trypanosomen/10 µl enthielten. Im Falle der irrtümlicherweise in 200 µl eluierten Liquorproben des Tages 10 bedeutete dies eine analytische Nachweisgrenze von 2,5 Trypanosomen/10 µl. In Abbildung 11 wird exemplarisch das Ergebnis der Amplifikation eines 274 bp-langen DNA-Stranges des TbAT1-Genes mittels seminested-PCR gezeigt.



**Abbildung 11: Beispiel eines Ergebnisses der seminested-PCR.** S: Skalierung des DNA-Längenmarkers von 1000 bp bis 200 bp; M: DNA-Längenmarker; B-10/B-20: Bluttestprobe nach 10 bzw. 20 Tagen; L-10/L-20: Liquortestprobe nach 10 bzw. 20 Tagen; 10<sup>2</sup>/10: Äquivalente trypanosomaler DNA/10 µl; N: Negativkontrolle. Der schwarze Pfeil verweist auf die DNA-Banden des Produktes der seminested-PCR, welche sich auf der kalkulierten Höhe von 274 bp befinden. Je deutlicher die Banden hervortreten, desto mehr DNA wurde amplifiziert. Der weiße Pfeil verweist auf das Ausgangsprodukt der PCR und unspezifische Produkte der seminested-PCR.

#### 4.2.2 Vorversuche zum Trypanosomennachweis mittels PCR in Würzburg

##### 4.2.2.1 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR

Als erstes wurde überprüft, inwieweit sich die Ergebnisse der Vorversuche aus Göttingen zum PCR-Nachweis der Trypanosomen unter den Bedingungen des Würzburger Labors mit unterschiedlichen Materialien und Gerätschaften reproduzieren ließen.

Unter Verwendung der gleichen Bedingungen zeigten sich nur Banden für die Proben mit DNA von 10<sup>3</sup> und 10<sup>2</sup> Trypanosomen/10 µl, jedoch keine für 10 oder 1 Trypanosom/10 µl. Daraufhin wurde eine Variation der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration angeschlossen, wobei eine Probe mit DNA von 10<sup>2</sup> Parasiten/10 µl als Template benutzt wurde. Die übrigen Bedingungen blieben stabil. Das beste Ergebnis zeigte sich bei diesem Versuch für eine finale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,5 mM:

## Ergebnisse

| Proben-Nr.   | 1    | 2   | 3    | 4   | 5    | 6   |
|--|------|-----|------|-----|------|-----|
| Zugabe von 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung (µl)              | 2,5  | 3,0 | 3,5  | 4,0 | 4,5  | 5,0 |
| Finale MgCl <sub>2</sub> -Konzentration je 50 µl-Ansatz (mM) | 1,25 | 1,5 | 1,75 | 2,0 | 2,25 | 2,5 |
| Ergebnis   | -    | +   | ++   | ++  | +++  | +++ |

Dieses Resultat wurde bestätigt als eine Wiederholung der Variation mit Streuungen der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration um diesen Wert durchgeführt wurde:

| Proben-Nr.   | 1   | 2    | 3   | 4    | 5   |
|--|-----|------|-----|------|-----|
| Zugabe von 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung (µl)              | 4,0 | 4,5  | 5,0 | 5,5  | 6,0 |
| Finale MgCl <sub>2</sub> -Konzentration je 50 µl-Ansatz (mM) | 2,0 | 2,25 | 2,5 | 2,75 | 3,0 |
| Ergebnis   | ++  | +++  | +++ | ++   | +   |

Somit wurde eine finale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,5 mM für die nachfolgenden Versuche übernommen. Nun wurde eine Gradienten-PCR gefahren, bei der ebenfalls Proben mit DNA-Extrakten von 10<sup>2</sup> Trypanosomen/10 µl eingesetzt wurden. Die Variation der Hybridisierungstemperatur fand dabei als Streuung um den zuvor in Göttingen ermittelten optimalen Wert von 65 °C statt:

| Proben-Nr.                 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Annealing-Temperatur in °C | 63,0 | 63,1 | 63,4 | 63,8 | 64,4 | 64,9 | 65,5 | 66,1 | 66,6 | 67,0 | 67,2 |
| Ergebnis                   | +    | +    | +    | ++   | ++   | +++  | ++   | +++  | ++   | ++   | +    |

Es zeigte sich hierbei, dass die Bande für die Annealing-Temperatur von 66,1 °C am deutlichsten zu sehen war. Daher wurde dieser Wert in das PCR-Protokoll übernommen. Unter den derart ermittelten optimalen Bedingungen wurde ein erneuter Nachweis der Proben mit 1, 10, 100 und 1000 Trypanosomen/10 µl versucht. Diesmal war auch eine Bande für die Probe mit 10 Trypanosomen/10 µl zu erkennen. Somit war die analytische Nachweisgrenze der Vorversuche aus Göttingen wieder erreicht und die Parameter dieses Versuches wurden als Standardprotokoll der PCR (s. 3.2.5.3.1) festgelegt, mit dem später auch die Patientenproben analysiert wurden.

### 4.2.2.2 Amplifikation des TbAT1-Gens mittels PCR mit DNA-Isolaten aus Blut und Liquor

In diesem Versuch zeigte sich ein negatives Resultat sowohl für die Blut-, als auch für die Liquorproben, die 10 Trypanosomen/10 µl enthielten. Der Versuch wurde wiederholt, die Proben jedoch vor der DNA-Purifikation über Nacht eingefroren und während der DNA-Purifikation für die Dauer von bis zu einer Stunde inkubiert. So sollten die Bedingungen der Patientenproben simuliert werden. Auch dieses Experiment erbrachte einen Abfall der analytischen Nachweisgrenze auf 10<sup>2</sup> Trypanosomen/10 µl, sowohl für Blut-, als auch für Liquorp-

roben. Mit Hilfe der nachfolgenden Amplifikation dieser Proben mittels einer seminested-PCR (s. 3.2.5.3.3) konnte sowohl für Blut als auch für Liquor der Nachweis von ursprünglich 10 Trypanosomen/10 µl wieder erbracht werden.

### 4.2.2.3 Überprüfung der Spezifität mittels Toxoplasma-DNA

In keinem Fall war in der PCR (s. 3.2.5.3.4) ein DNA-Amplifikat von den eingesetzten Proben (Äquivalente von  $10^3$ ,  $10^2$  und 10 Toxoplasmen/10 µl) in der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar. Auch in der anschließenden seminested-PCR zeigten sich alle Proben negativ.

### 4.2.3 Probenanalyse mittels PCR

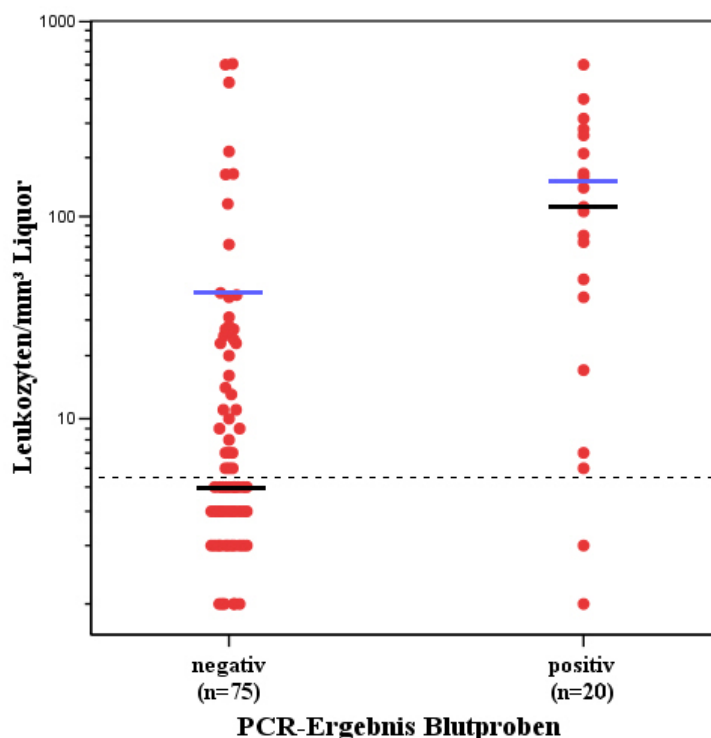
Bei einem 5-jährigen Kind war die Blutentnahme misslungen und eine schwangere Patientin wurde ohne Lumbalpunktion in eine Entbindungsstation verlegt, so dass in nur je 96 Fällen eine PCR aus den Blut- und Liquorproben durchgeführt werden konnte.

#### 4.2.3.1 PCR der Blutproben

In 20 von 96 Fällen (20,8%) zeigte die PCR der Blutproben ein positives Ergebnis. Die Wiederholung der PCR von 51 Blutproben (darunter drei Positive des ersten PCR-Durchlaufes) mit purifizierter DNA aus 540 µl Probengut und von vier weiteren Blutproben mit purifizierter DNA aus 180 µl Probengut (s. 3.2.5.4.1) erbrachte ausnahmslos das gleiche Ergebnis wie im ersten Testdurchgang.

Der Trypanosomennachweis aus Blut gelang abhängig vom Stadium der Krankheit: Obwohl das Verhältnis von Stadium-I- zu Stadium-II-Patienten in dieser Studie recht ausgeglichen war, stammten 18 der 20 per PCR positiv getesteten Blutproben von Patienten im Stadium II. Zwischen einem positivem PCR-Ergebnis der Blutproben und der Zugehörigkeit zum Stadium II der Patienten bestand ein auf dem 1%-Niveau signifikanter Zusammenhang ( $p=0,001$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Der Median der Pleozytose der Gruppe der Patienten mit PCR-negativen Blutproben fand sich bei 5, gegenüber 109 Zellen/mm<sup>3</sup> Liquor für solche Blutproben mit positivem Ergebnis in der PCR. Der Mittelwert für Proben mit negativem Ergebnis lag bei 41,1 Leukozyten/mm<sup>3</sup> mit einem 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) von 14,8 - 76,4 Zellen/mm<sup>3</sup> gegenüber 151,4 Leukozyten/mm<sup>3</sup> (95%-KI: 78,1 - 224,6) für positiv getestete Proben (s. Abbildung 12). Der Unterschied der Zellzahlen dieser beiden Gruppen war auf dem 1%-Niveau signifikant ( $p<0,001$  und  $Z=-4,097$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben).





**Abbildung 12: Ergebnisse der PCR der Blutproben nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Blaue Linien: Mittelwert; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II (> 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor).

Im Vergleich zu den lokalen Parasitennachweismethoden in Angola (HCT und LKP) zeigte sich, dass ein Zusammenhang nur mit den LKP-Ergebnissen, nicht jedoch mit den Resultaten der HCT hergestellt werden konnte. Es ist dabei zu beachten, dass die elf Patienten der Gruppen Ia2 und IIa2 sowohl in den Statistiken der LKP- als auch der HCT-Ergebnisse angeführt werden und die zwölf Blutproben der Gruppe IIb in keiner dieser Statistiken vertreten sind (s. 4.1.2).

Durch LKP wurden bei 31 Patienten Trypanosomen nachgewiesen. Von den zugehörigen Blutproben waren 13 ebenfalls in der PCR positiv. Andererseits ergab die PCR in einem Fall, der negativ in der LKP war, ein positives Ergebnis. In 12 Fällen waren beide Techniken negativ (s. Tabelle 5). Es ergab sich ein auf dem 5%-Niveau signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der LKP und der PCR der Blutproben ( $p= 0,026$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson).

**Tabelle 5: Vergleich von LKP mit PCR der Blutproben**

|                     |         | LKP     |         | Gesamt <sup>a</sup> | Signifikanz <sup>b</sup> |
|---------------------|---------|---------|---------|---------------------|--------------------------|
|                     |         | positiv | negativ |                     |                          |
| PCR-Blut            | positiv | 13      | 1       | 14                  | p < 0,05                 |
|                     | negativ | 18      | 12      | 30                  |                          |
| Gesamt <sup>a</sup> |         | 31      | 13      | 44                  |                          |

<sup>a</sup> Nicht durchgeführte LKP (n= 53) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

<sup>b</sup> Signifikanz des Zusammenhanges von der PCR des Blutes und LKP im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

Von 14 Blutproben, bei denen durch eine HCT die Existenz von Trypanosomen bewiesen wurde, zeigte sich nur eine ebenfalls positiv in der PCR. Hingegen wurden drei Fälle, die negativ in der HCT waren, per PCR positiv getestet. Von diesen Proben stammte eine von einem Patienten, bei dem wie oben erwähnt auch in der LKP kein Parasitennachweis gelungen war. In 34 Fällen erbrachten beide Techniken ein negatives Ergebnis (s. Tabelle 6). Es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang dieser beiden Methoden finden ( $p= 0,911$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson).

**Tabelle 6: Vergleich von HCT mit PCR der Blutproben**

|                     |         | HCT     |         | Gesamt <sup>a</sup> | Signifikanz <sup>b</sup> |
|---------------------|---------|---------|---------|---------------------|--------------------------|
|                     |         | positiv | negativ |                     |                          |
| PCR-Blut            | positiv | 1       | 3       | 4                   | p= 0,91                  |
|                     | negativ | 13      | 34      | 47                  |                          |
| Gesamt <sup>a</sup> |         | 14      | 37      | 51                  |                          |

<sup>a</sup> Nicht durchgeführte HCT (n= 46) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

<sup>b</sup> Signifikanz des Zusammenhanges von der PCR des Blutes und HCT im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

Wurden die Ergebnisse der mikroskopischen Nachweise von LKP und HCT jedoch zusammen betrachtet, so ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit den Resultaten der PCR der Blutproben ( $p= 0,008$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Diese zusammengefassten Ergebnisse von HCT und LKP als direkter Parasitennachweis im Vergleich zu denen der PCR der Blutproben werden in Tabelle 7 dargestellt. Hierbei ist das unter 2.2 erklärte Vorgehen in der Diagnostik zu berücksichtigen. Dies erklärt, dass elf Patienten (Gruppen Ia2 und IIa2) in die einzelne Statistik jeweils beider Mikroskopiertechniken eingehen und zwölf Blutproben (Gruppe IIb) hier nicht aufgeführt werden (s. 4.1.2). In 14 Fällen ergaben sowohl die PCR als auch eine der beiden Mikroskopiertechniken ein positives in 36 Fällen alle drei Methoden ein negatives Resultat. Von den zwölf Blutproben der Gruppe IIb wurden insgesamt drei in der PCR positiv getestet. Gemessen an den mittels LKP oder HCT parasitologisch gesicherten Diagnosen ergaben sich für die PCR der Blutproben eine Sensitivität von 31,1% und eine Spezifität von 92,3%.

**Tabelle 7: Vergleich von HCT / LKP mit PCR der Blutproben**

|                     |         | HCT / LKP <sup>a</sup> |         | Gesamt <sup>b</sup> | Signifikanz <sup>c</sup> |
|---------------------|---------|------------------------|---------|---------------------|--------------------------|
|                     |         | positiv                | negativ |                     |                          |
| PCR-Blut            | positiv | 14                     | 3       | 17                  | p< 0,01                  |
|                     | negativ | 31                     | 36      | 67                  |                          |
| Gesamt <sup>b</sup> |         | 45                     | 39      | 84                  |                          |

<sup>a</sup> Direkter Parasitennachweis durch HCT *oder* LKP.

<sup>b</sup> Weder HCT noch LKP durchgeführt (n= 13) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

<sup>c</sup> Signifikanz des Zusammenhanges der PCR des Blutes mit HCT / LKP im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

## 4.2.3.2 PCR der Liquorproben

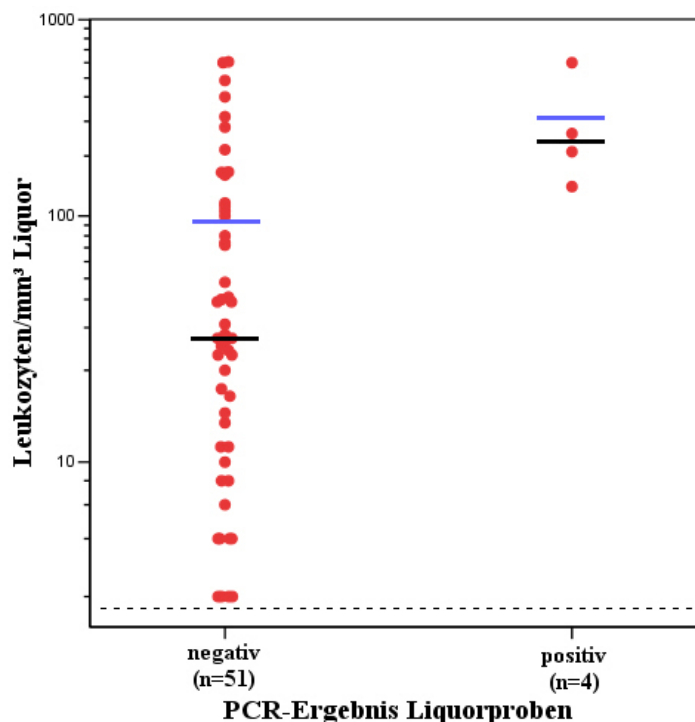
In der ersten Testung zeigten sich 3 von 96 Liquorproben in der PCR positiv. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde die PCR von 52 Liquorproben (darunter alle 3 positiven des ersten PCR-Durchlaufes) wiederholt. Hierbei wurde in 32 Fällen purifizierte DNA aus 540 ml Probengut angewendet (s. 3.2.5.4.1). Dabei kam es im Vergleich zur vorhergehenden Testung in einem Fall zu einem unterschiedlichen Resultat: Eine Probe, die zuvor negativ getestet wurde, zeigte sich nun positiv. Hierbei war die DNA-Purifizierung aus 180 ml Liquor erfolgt. Dieses Ergebnis wurde durch eine erneute Wiederholung bestätigt und als „wahr“ angenommen. In der Liquor-Mikroskopie waren bei dieser Probe zuvor Trypanosomen entdeckt worden. Die Gesamtzahl der positiven Resultate der PCR der Lumbalflüssigkeit von 96 Schlafkrankheitspatienten lag somit bei 4 Fällen (4,2%). Diese stammten alle von Patienten des Stadium II. Bezogen auf die Patienten dieses Stadiums beträgt der Prozentsatz an positiven Ergebnissen 7,3% (4 von 55). Die zugehörigen Blutproben dieser vier Patienten waren in der PCR ebenfalls positiv. Von den 14 Liquorproben, bei denen Trypanosomen mikroskopisch entdeckt worden waren, waren 3 in der PCR positiv, während eine Probe, bei der die Mikroskopie keinen Parasitennachweis ergeben hatte, positiv in der PCR war (s. Tabelle 8). Es bestand ein auf dem 5%-Niveau signifikanter Zusammenhang dieser beiden Methoden ( $p= 0,018$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Gemessen an der Mikroskopie des Liquors ergaben sich für die PCR des Liquors eine Sensitivität von 21,4% und eine Spezifität von 97,6%.

**Tabelle 8: Vergleich von Liquor-Mikroskopie mit PCR der Liquorproben**

| Stadium-II-Patienten |         | Mikroskopie des Liquors |         | Gesamt | Signifikanz <sup>a</sup> |
|----------------------|---------|-------------------------|---------|--------|--------------------------|
|                      |         | positiv                 | negativ |        |                          |
| PCR-Liquor           | positiv | 3                       | 1       | 4      | p < 0,05                 |
|                      | negativ | 11                      | 40      | 51     |                          |
| Gesamt               |         | 14                      | 41      | 55     |                          |

<sup>a</sup> Signifikanz des Zusammenhanges von der PCR des Liquors und der Mikroskopie des Liquors im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

Wie in Abbildung 13 gezeigt, wiesen die vier Patienten, deren Liquorproben per PCR positiv getestet wurden, in der Lumbalflüssigkeit zugehörige Zellzahlen von über 100 Leukozyten/mm<sup>3</sup> auf. Der Median dieser Gruppe lag bei 235 Leukozyten im Liquor/mm<sup>3</sup>, der Mittelwert bei 302,5 Leukozyten/mm<sup>3</sup>. Hingegen fand sich der Median der Liquorproben von Patienten des Stadiums II mit negativem Resultat in der PCR bei 27 Leukozyten im Liquor/mm<sup>3</sup> und der Mittelwert bei 95,1 Leukozyten/mm<sup>3</sup> (95%-KI: 53,8 - 136,4).



**Abbildung 13: Ergebnisse der PCR der Liquorproben nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Blaue Linien: Mittelwert; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II (> 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor).

Es zeigte sich ein auf dem 5%-Niveau signifikanter Unterschied der Leukozytenzahlen dieser beiden Gruppen ( $p= 0,013$  und  $Z= -2,481$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben). Die Ergebnisse der PCR-Nachweise aus Blut und Liquor sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Ergebnisse PCR-Nachweise aus Blut- und Liquorproben**

|   | <i>PCR-Ergebnis</i>    |                     | <i>Gesamt</i>        |
|---|------------------------|---------------------|----------------------|
|   | positiv                | negativ             |                      |
| Blutproben (n= 96) <sup>a</sup>                   | 20 (20,8%)             | 76 (79,2%)          | 96 (100%)            |
| Median (Zellen/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>     | 109 (22,5 - 247,5)     | 5 (4 - 23)          | 7 (4 - 40)           |
| Mittelwert (Zellen/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | 151,4 (78,1 - 224,6)   | 41,1 (14,8 - 76,4)  | 64,3 (37,5 - 91,1)   |
| Liquorproben / Stadium II (n= 55) <sup>b</sup>    | 4 (7,3%)               | 51 (92,7%)          | 55 (100%)            |
| Median (Zellen/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>     | 235 (157,5 - 515)      | 27 (11 - 112)       | 31 (11-160)          |
| Mittelwert (Zellen/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup> | 302,5 (*) <sup>c</sup> | 95,1 (53,8 - 136,4) | 110,2 (67,3 - 152,1) |

<sup>a</sup> Angaben in absoluten Zahlen (Prozent bzw. 25-75%-Quartil bzw. 95%-KI).

<sup>b</sup> Angaben in absoluten Zahlen (Prozent bzw. 25-75%-Quartil bzw. 95%-KI) von Patienten im Stadium II.

<sup>c</sup> Eine Betrachtung des 95%-KI ist aufgrund der geringen Stichprobenzahl nicht sinnvoll.

## 4.2.3.3 Seminested-PCR der Liquorproben

Es wurden je fünf Liquorproben von Patienten beider Stadien ausgewählt. Einziges gemeinsames Kriterium war, dass sie zuvor ein negatives Ergebnis in der normalen PCR zeigten. Die Auswahl der Stadium-II-Proben fiel auf solche mit mikroskopischem Parasitennachweis, um sicher zu gehen, dass kein Grenzfall bezüglich der Stadieneinteilung vorlag. Die Proben von Patienten des fortgeschrittenen Stadiums ergaben in vier von fünf Fällen ein positives, alle übrigen ein negatives Resultat. Dies wird auch in Tabelle 10 gezeigt.

**Tabelle 10: Ergebnisse der seminested-PCR der Liquorproben**

|   | <i>Ergebnis der seminested-PCR</i> <sup>a</sup> |          | <i>Gesamt</i> |
|---|---|----------|---------------|
|   | positiv   | negativ  |               |
| Stadium-II-Liquorproben (n= 5) <sup>b</sup> | 4 (80%)   | 1 (20%)  | 5 (100%)      |
| Stadium-I-Liquorproben (n= 5) <sup>c</sup>  | 0 (0%)  | 5 (100%) | 5 (100%)      |

<sup>a</sup> Angabe in absoluten Zahlen (Prozent).

<sup>b</sup> Liquorproben von Patienten mit mikroskopischem Parasitennachweis.

<sup>c</sup> Liquorproben von Patienten mit höchstens 5 Zellen/mm<sup>3</sup> und ohne Trypanosomen im Liquor.

## 4.3 Ergebnisse des IFT

### 4.3.1 Vorversuche des IFT

Bei der Begutachtung der Objektträger unter dem Mikroskop erwiesen sich die Mengen von 10  $\mu\text{l}$  mit  $1,73 \times 10^6$  Trypanosomen bis 20  $\mu\text{l}$  mit  $2,68 \times 10^6$  Trypanosomen sowohl von der Verteilung als auch von der Gesamtzahl der fixierten Parasiten als geeignet. Ein schnelleres Trocknen bei 40 °C erwies sich gegenüber dem langsameren bei Raumtemperatur als vorteilhaft, da sich so die Parasiten gleichmäßiger über das leicht konkave Reaktionsfeld verteilen. Bei Trocknung unter Raumtemperatur konzentrierten sich die im Kulturmedium befindlichen Trypanosomen der Schwerkraft folgend im Zentrum des Reaktionsfeldes. Die Fixierung mittels Methanol erwies sich gegenüber der mit Aceton in Hinsicht auf die Klarheit des Untergrundes beim Mikroskopieren als günstiger.

In der Schachbrett-Titration zeigte sich die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Serum (und damit auch des Konjugats) in Kombination mit einer Konjugatverdünnung von 1:100 als beste von allen Variationen. Mit diesen Einstellungen konnte die Einstufung des anti-trypanosomalen IgG-Titers von 1:640 des Testserums durch das BNI bestätigt werden. Die Ergebnisse der Schachbrett-Titration sind zusammenfassend in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Ergebnisse der Schachbrett-Titration**

| a) | 10 $\mu\text{l}$ |               |              |       | 20 $\mu\text{l}$ |               |              |      |       |
|----|------------------|---------------|--------------|-------|------------------|---------------|--------------|------|-------|
|    | b)               | Negativ-Serum | Positivserum |       |                  | Negativ-Serum | Positivserum |      |       |
|    |                  | c)            | 1:20         | 1:320 | 1:640            |               | 1:1250       | 1:20 | 1:320 |
|    | 1:50             | -             | +            | ±     | -                | -             | ++           | +    | ±     |
|    | 1:100            | -             | +            | ±     | -                | -             | ++           | +    | ±     |
|    | 1:200            | -             | ±            | ±     | -                | -             | +            | +    | ±     |
|    | 1:400            | -             | ±            | -     | -                | -             | ±            | ±    | -     |

+++ : Stark positive Fluoreszenz; ++ : Mittlere Fluoreszenzstärke; + : Schwachpositive Fluoreszenz; ± : Grenzwert, dem kein eindeutig positives Ergebnis mehr zugeordnet werden konnte – gilt somit als negativ; - : Keine Fluoreszenz.

a) Menge von Konjugat und Serum

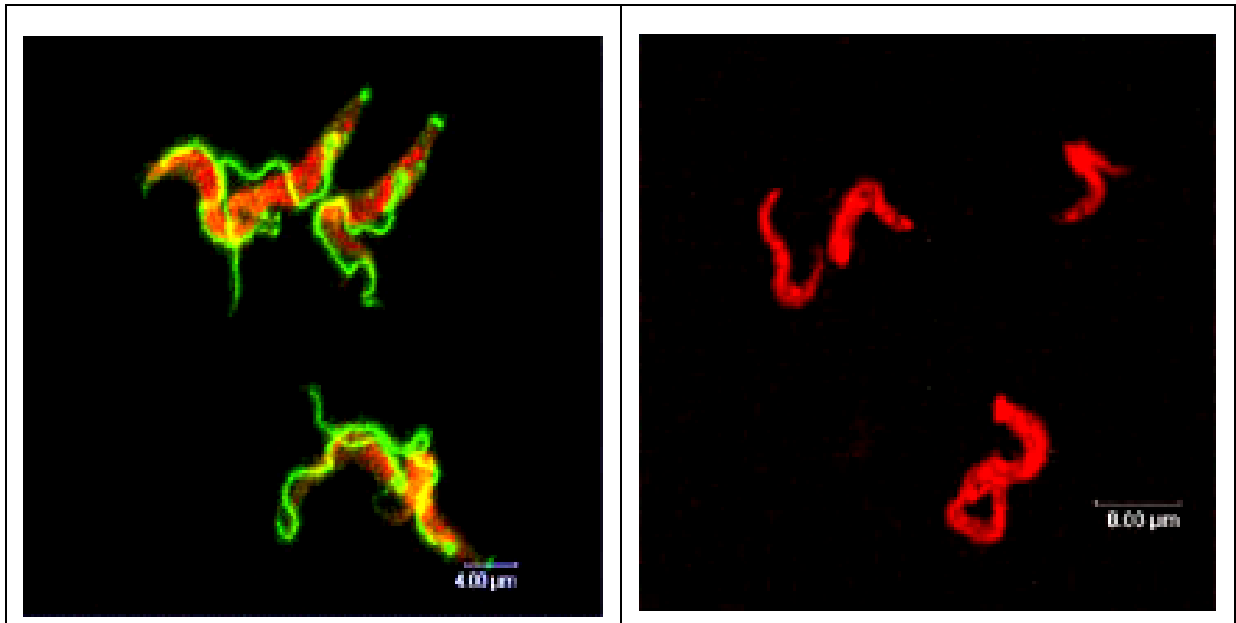
b) Serumverdünnung

c) Konjugatverdünnung

Im Versuch zur Probenstabilisierung durch Chloroform-Zugabe (s. 3.2.6.3) zeigte sich nach 30-tägiger Lagerung ein Abfall des anti-Toxoplasma-Titers des Test-Serums um eine Titerstufe: Der zuvor per Routine-IFT des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen bestimmte polyvalente anti-Toxoplasma-Titer lag bei 1:16000, während ein erneuter Routine-IFT nach der Lagerung einen polyvalenten Titer von 1:8000 ergab.

#### 4.3.2 Probenanalyse mittels IFT

Die Auswertung des indirekten Immunfluoreszenz-Tests fand aufgrund der bereits aufgeführten fehlenden Proben eines 5-jährigen Kindes (Blut) und einer schwangeren Patientin (Liquor) in je 96 Fällen statt. In Abbildung 14 sind Bildexemplare eines positiven und eines negativen Resultats im IFT wiedergegeben.



**Abbildung 14: Positiv- und Negativbeispiel der IFT-Versuche.** Aufnahmen mit 63er-Objektiv unter Anregung von UV-Licht. Links: Positivbeispiel. Hier sind besonders das Flagellum und die undulierende Membran grün fluoreszierend; Rechts: Negativbeispiel. Es leuchtet nur der rote Kontrastfarbstoff.

##### 4.3.2.1 IFT der Serumproben

Die im Durchschnitt höchsten Konzentrationen im Serum wurden für Immunglobuline der Klasse G gefunden. So fand sich der Median dieser Antikörperklasse bei einem Titer von 1:320. Das Minimum lag bei 1:20 und das Maximum bei 1:2560. Das 25%-Quartil war bei einem Titer von 1:80 und das 75%-Quartil bei einem Titer von 1:320 zu finden.

Die zweithöchsten durchschnittlichen Serumspiegel waren für Antikörper der Klasse IgM bestimmbar: Der Median dieser Antikörper wurde bei einem Titer von 1:160, das 25%-Quartil bei einem Titer von 1:80 und das 75%-Quartil bei einem Titer von 1:160 gemessen. Das Titer-Maximum lag bei 1:640. In drei Fällen konnte kein IgM nachgewiesen werden: Bei diesen drei Patienten wurde die Diagnose jeweils auf serologischer Basis gestellt (Gruppe II). Zwei von diesen waren dem Stadium I und einer dem Stadium II zugeordnet.

IgA konnte im Serum nur in geringen Konzentrationen gefunden werden: So lag der Median bei einem Titer von unter 1:20 und das 75%-Quartil bei einem Titer von 1:20. Das Titer-Maximum betrug 1:80. In 69 Fällen konnte kein IgA nachgewiesen werden. Diese Patienten verteilten sich mit 36 (Stadium I) zu 33 (Stadium II) recht ausgeglichen auf beide Stadien. In

40 dieser Fälle war die Diagnose auf serologischer Basis gestellt worden, während bei 29 Fällen ein Direktnachweis mittels LKP oder HCT erbracht werden konnte. In Tabelle 12 ist die Immunglobulin-Verteilung im Serum zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 12: Ergebnisse des IFT mit Serumproben**

| AK im Serum <sup>a</sup> | Reziproke Titer |               |               |               |               |               |               |             |             | Median <sup>b</sup> |
|--------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-------------|---------------------|
|                          | < 20            | 20            | 40            | 80            | 160           | 320           | 640           | 1280        | ≥ 2560      |                     |
| IgG                      | 0<br>(0%)       | 2<br>(2,1%)   | 10<br>(10,4%) | 16<br>(16,7%) | 19<br>(19,8%) | 27<br>(28,1%) | 14<br>(14,6%) | 4<br>(4,2%) | 4<br>(4,2%) | 320<br>(80 - 320)   |
| IgM                      | 3<br>(3,1%)     | 8<br>(8,3%)   | 10<br>(10,4%) | 23<br>(24%)   | 32<br>(33,3%) | 17<br>(17,7%) | 3<br>(3,1%)   | 0<br>(0%)   | 0<br>(0%)   | 160<br>(80 - 160)   |
| IgA                      | 69<br>(71,9%)   | 21<br>(21,9%) | 2<br>(2,1%)   | 4<br>(4,2%)   | 0<br>(0%)     | 0<br>(0%)     | 0<br>(0%)     | 0<br>(0%)   | 0<br>(0%)   | < 20<br>(< 20 - 20) |

<sup>a</sup> Angaben in absoluten Werten (Prozent).

<sup>b</sup> Angaben in reziproken Titern der Serumverdünnungen (25 - 75%-Quartil).

Die Höhe der Titer von IgG, IgM und IgA im Serum waren stadienabhängig. So fanden sich für Stadium-II-Patienten höhere Spiegel dieser Immunglobulinklassen als für Stadium-I-Patienten: Der Median des reziproken Titers im IFT der Patienten im fortgeschrittenen Stadium lag für IgG bei 320, während er sich bei Stadium-I-Patienten bei 80 bestimmen ließ. Der Unterschied der Titerhöhen dieser beiden Patientengruppen war auf dem 1%-Niveau signifikant ( $p < 0,001$  und  $Z = -4,626$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben). Für IgM lag der Median der Patienten im fortgeschrittenen Stadium bei 160 und jener für Patienten im Anfangsstadium bei 80. Auch hier bestand ein auf dem 1%-Niveau signifikanter Unterschied der Titerhöhen dieser beiden Gruppen ( $p = 0,003$  und  $Z = -2,734$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben). Die Mediane der Patienten beider Stadien lagen für IgA bei Titern von unter 1:20. Jedoch wies das 75%-Quartil der Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit einem Titer von 1:20 einen höheren Wert auf als das der Kranken im Anfangsstadium ( $< 1:20$ ). Auch dieser Unterschied war auf dem 1%-Niveau signifikant ( $p = 0,001$  und  $Z = -2,993$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben). In Tabelle 13 sind diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 13: Serum-Antikörper nach Krankheitsstadien**

| Antikörper im Serum <sup>a</sup> | Patienten            |                       | Signifikanz <sup>b</sup> |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
|                                  | Stadium I<br>(n= 41) | Stadium II<br>(n= 55) |                          |
| IgG                              | 80 (40 - 320)        | 320 (160 - 640)       | $p < 0,001$              |
| IgM                              | 80 (30 - 160)        | 160 (80 - 200)        | $p = 0,003$              |
| IgA                              | < 20 (< 20 - < 20)   | < 20 (< 20 - 20)      | $p = 0,001$              |

<sup>a</sup> Angaben in Medianen der reziproken Titer (25 - 75%-Quartil).

<sup>b</sup> Signifikanz der Unterschiede der Titerhöhen der Patientengruppen im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben.



Eine statistisch signifikante und relevante Korrelation von steigendem Alter der Patienten und deren Titerhöhe von spezifischem IgG im Serum ließ sich indes nicht finden ( $p=0,084$  und  $r=0,178$  im Korrelationstest nach Pearson).

Für alle drei getesteten Antikörperklassen waren die Serumspiegel der Gruppe I (Diagnose per mikroskopischem Parasitennachweis) höher als die der Gruppe II (Diagnose auf serologischer Basis). Für IgG lag der Median der reziproken Titer der Gruppe I bei 320, gegenüber 160 für die Proben der Patienten der Gruppe II. Für IgM lag er bei 160 (Gruppe I) bzw. 80 (Gruppe II). Der Median für IgA fand sich bei beiden Gruppen unter 20, jedoch war das 75%-Quartil der Gruppe I bei 20 und das der Gruppe II bei unter 20. Diese Unterschiede waren für IgM auf dem 5%-Niveau signifikant: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben ergab sich für IgM  $p=0,012$  ( $Z=-2,511$ ) und für IgA  $p=0,153$  ( $Z=-1,429$ ) sowie für IgG  $p=0,186$  ( $Z=-1,322$ ). Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Serum-Antikörper nach Parasitennachweis im Blut**

| Antikörper im Serum <sup>a</sup> | Parasitennachweis im Blut       |                                 | Signifikanz <sup>d</sup> |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
|                                  | positiv <sup>b</sup><br>(n= 45) | negativ <sup>c</sup><br>(n= 51) |                          |
| IgG                              | 320 (160 - 640)                 | 160 (80 - 320)                  | $p=0,186$                |
| IgM                              | 160 (80 - 240)                  | 80 (40 - 160)                   | $p=0,012$                |
| IgA                              | < 20 (< 20 - 20)                | < 20 (< 20 - < 20)              | $p=0,153$                |

<sup>a</sup> Angaben in Medianen der reziproken Titer (25 - 75%-Quartil).

<sup>b</sup> In LKP oder HCT positiv (Diagnose per direktem Parasitennachweis = Gruppe I).

<sup>c</sup> In keinem Test von LKP oder HCT positiv (Diagnose per Serologie = Gruppe II).

<sup>d</sup> Signifikanz der Unterschiede der Titerhöhen beider Gruppen im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben.

#### 4.3.2.2 IFT der Liquorproben

Von den 55 Liquores der Patienten im Stadium II zeigten acht einen IgG-Titer von  $\geq 1:10$  (14,6%). Das Titer-Maximum lag für IgG bei 1:20. Die 41 Patienten des Stadiums I wiesen hingegen alle einen IgG-Titer im Liquor von unter 1:10 auf. Für IgM und IgA fand sich sowohl für sämtliche Patienten des Stadiums II, als auch für die des Stadiums I ein Titer von unter 1:10. In Tabelle 15 wird eine Übersicht über die Ergebnisse des IFT der Liquorproben der Stadium-II-Patienten gezeigt.

**Tabelle 15: Ergebnisse des IFT mit Liquorproben**

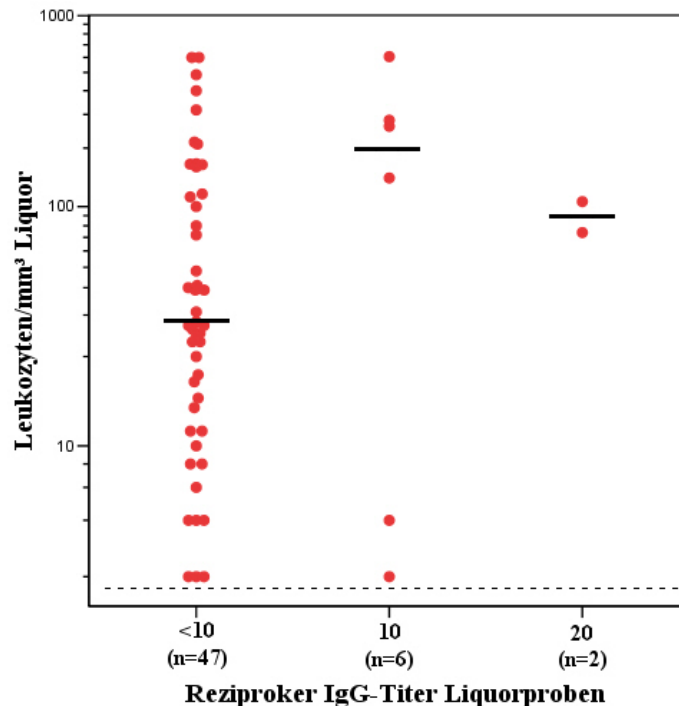
| Antikörper im Liquor <sup>a</sup> | Reziproke Titer |           |          | Median <sup>b</sup> |
|-----------------------------------|-----------------|-----------|----------|---------------------|
|                                   | < 10            | 10        | 20       |                     |
| IgG                               | 47 (85,5%)      | 6 (10,9%) | 2 (3,6%) | < 10 (< 10 - < 10)  |
| IgM                               | 55 (100%)       | 0 (0%)    | 0 (0%)   | < 10 (< 10 - < 10)  |
| IgA                               | 55 (100%)       | 0 (0%)    | 0 (0%)   | < 10 (< 10 - < 10)  |

<sup>a</sup> Angaben in absoluten Werten (Prozent) aller Stadium-II-Patienten (n= 55).

<sup>b</sup> Angaben in reziproken Titern der Liquorverdünnungen (25 - 75%-Quartil) aller Stadium-II-Patienten.

Bei vier der acht Patienten, welche spezifische IgG-Titer von  $\geq 1:10$  im Liquor hatten, konnten per Liquor-Mikroskopie Trypanosomen nachgewiesen werden, bei den anderen vier Kranken gelang dies nicht (siehe Tabelle 16). Sechs dieser acht Patienten zeigten eine

Pleozytose von mehr als 70 Leukozyten/mm<sup>3</sup>. Die verbleibenden zwei Patienten (beide ohne Trypanosomennachweis im Liquor) hatten hingegen mit 6 bzw. 7 Leukozyten/mm<sup>3</sup> nur eine grenzwertig erhöhte Zellzahl im Liquor. In Abbildung 15 wird die Verteilung der spezifischen IgG-Titer der Liquorproben nach der Pleozytose der Stadium-II-Patienten gezeigt. Für die Proben mit Titern von unter 1:10 fand sich der Median bei 28 Leukozyten im Liquor/mm<sup>3</sup>. Dagegen lag der Median für die Gruppe mit einem Titer von 1:10 bei 200 und für diejenige mit einem Titer von 1:20 bei 90 Leukozyten/mm<sup>3</sup>.



**Abbildung 15: Ergebnisse der IFT mit Liquorproben nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II (> 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor).

Von den getesteten Liquorproben, welche für IgG einen Titer von unter 1:10 gezeigt hatten, wurden neun zufällig ausgewählt, mit denen exemplarisch ein IFT unter Auftragen von unverdünntem, 1:2- und 1:4-verdünntem Liquor durchgeführt wurde. Die ausgewählten Proben stammten in sechs Fällen von Patienten des Anfangsstadiums und in drei Fällen von Kranken im Stadium II. Für die Proben von Patienten des fortgeschrittenen Stadiums konnte je einmal ein IgG-Titer von 1:1 bzw. 1:2 nachgewiesen werden (Studiennummern SR 138 und SR 63, siehe Tabelle 16). Die verbleibende Stadium-II-Probe (Studiennummer SR 70) war, ebenso wie alle sechs getesteten Stadium-I-Proben, negativ für spezifisches IgG. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Titerhöhe von IgG im Liquor von Patienten mit gegenüber solchen ohne Trypanosomennachweis im Liquor gefunden ( $p=0,115$  und  $Z=-1,578$  im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben).

Für die Stadium-II-Proben fand sich einmal ein IgM-Titer von 1:4 und einmal einer von 1:1. Hingegen konnte weder in den Proben von Stadium-I-Patienten noch in denen der verblei-

benden beiden Stadium-II-Patienten IgM im Liquor nachgewiesen werden. Bei einem der beiden Letzteren handelte es sich um einen Patienten, bei dem zuvor Trypanosomen im Liquor per Mikroskopie detektiert worden waren. IgA konnte in keiner der neun Proben nachgewiesen werden und auch zwei weitere Liquorproben von Stadium-II-Patienten erwiesen sich als negativ für IgA. Eine Übersicht über diese Ergebnisse wird in Tabelle 16 gegeben.

**Tabelle 16: Antikörper im Liquor von einzelnen Stadium-II-Patienten**

| Studien-Nr.  | Spezifische Antikörper im Liquor <sup>a</sup> |      |      | Trypanosomen in der<br>Mikroskopie des Liquors | Leukozyten/mm <sup>3</sup><br>Liquor |
|--------------|---|------|------|--|--------------------------------------|
|              | IgG   | IgM  | IgA  |  |                                      |
| SR 51        | 20  | < 10 | 0    | negativ  | 106                                  |
| SR 131       | 20  | < 10 | < 10 | negativ  | 74                                   |
| SR 77        | 10  | 4    | 0    | positiv  | 606                                  |
| SR 112       | 10  | < 10 | 0    | positiv  | 260                                  |
| SR 54        | 10  | < 10 | < 10 | negativ  | 7                                    |
| SR 57        | 10  | < 10 | < 10 | negativ  | 6                                    |
| SR 72        | 10  | < 10 | < 10 | positiv  | 140                                  |
| SR 135       | 10  | < 10 | < 10 | positiv  | 280                                  |
| SR 138       | 2   | 1    | 0    | positiv  | 165                                  |
| SR 63        | 1   | 0    | 0    | negativ  | 8                                    |
| SR 70        | 0   | 0    | 0    | positiv  | 164                                  |
| Rest (n= 44) | < 10  | < 10 | < 10 | 8 positiv / 36 negativ                         |                                      |

<sup>a</sup> Angaben in reziproken Titern (bei „< 10“ wurden keine Verdünnungen unter 1:10 angewendet).

## 4.4 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

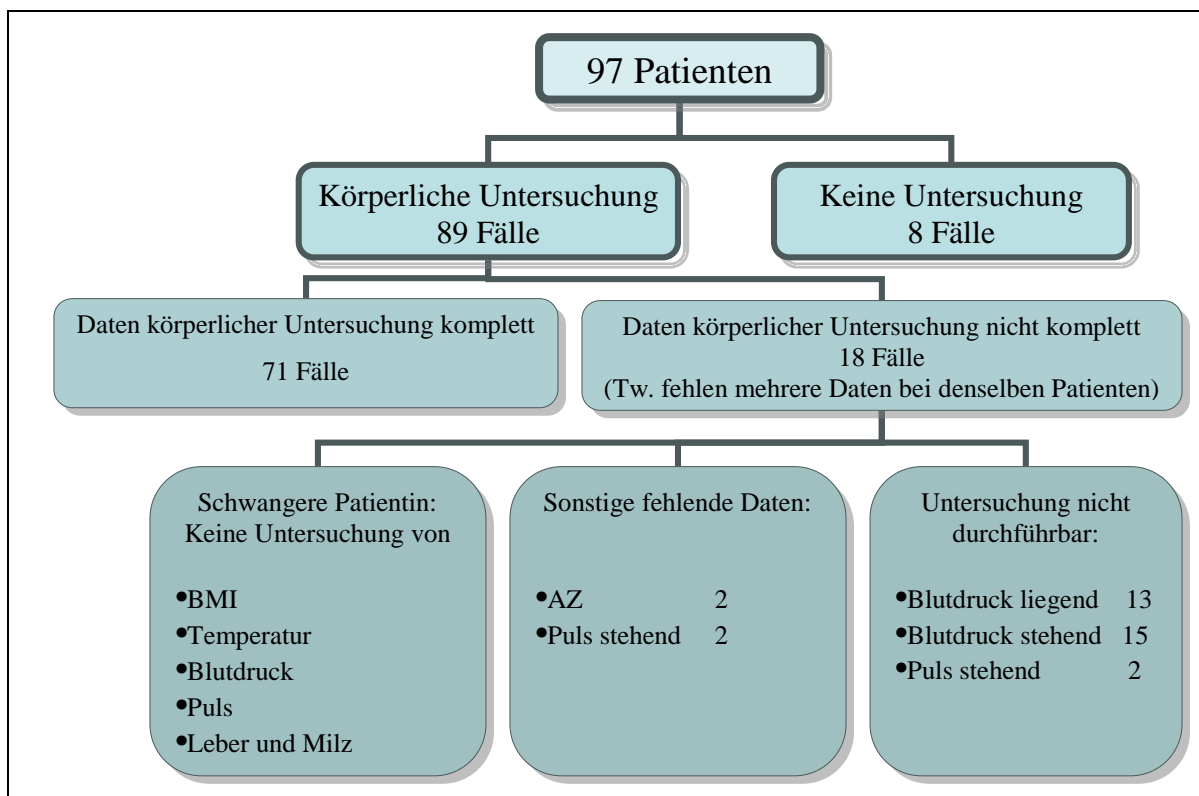
### 4.4.1 Körperliche Untersuchung

#### 4.4.1.1 Vollständigkeit der Daten

Von allen 97 in die Studie aufgenommenen Patienten wurden 89 körperlich untersucht. In 64 dieser 89 Fälle (71,9%) wurde die Untersuchung vor Beginn der Therapie, bei 25 Patienten (28,1%) in einem Zeitraum von ein bis drei Tagen nach Behandlungsbeginn durchgeführt. In acht Fällen war keine körperliche Untersuchung möglich, da sieben Patienten direkt nach der Diagnosestellung in ein anderes Behandlungszentrum verlegt wurden und ein Patient das Behandlungszentrum ohne körperliche Untersuchung verließ. In wenigen Fällen konnten nicht alle Daten der körperlichen Untersuchung erhoben werden. Dies waren im Einzelnen:

- Eine schwangere Patientin, welche vor dem Abschluss der körperlichen Untersuchung in ein anderes Krankenhaus verlegt wurde. Bei ihr konnten nur Untersuchungen der Parameter 'Größe', 'Bauchschmerz' und 'Lymphknotenstatus' sowie die Beurteilung des AZ durchgeführt werden.
- Zwei Patienten, die aufgrund des stark reduzierten AZ nicht aufstehen konnten. Aus diesem Grund konnten die Puls- und Blutdruckwerte im Stehen nicht ermittelt sowie keine Stand- und Gangversuche durchgeführt werden.
- Die Pulswerte im Stehen und die Einschätzungen des AZ wurden bei jeweils zwei Patienten nicht dokumentiert.
- 13 Kinder unter 13 Jahren, für die vor Ort keine geeignete Kinderblutdruckmanschette verfügbar war, so dass der Blutdruck nicht gemessen werden konnte.

Zusammenfassend kann die Vollständigkeit der Untersuchungsdaten wie in Abbildung 16 folgt dargestellt werden.



**Abbildung 16: Vollständigkeit der Daten der körperlichen Untersuchung.** Die einzelnen fehlenden Daten werden in den jeweiligen Abschnitten noch einmal erwähnt, wobei auf diese Auflistung verwiesen wird.

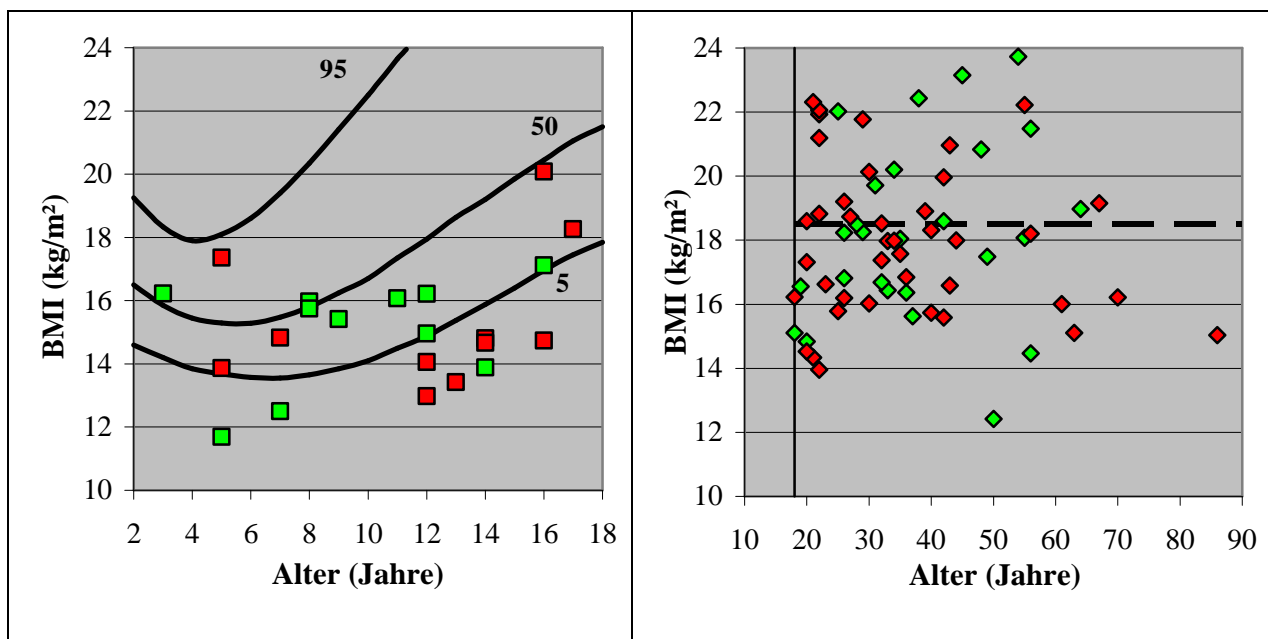
#### 4.4.1.2 Allgemeinzustand

Neben den acht generell nicht untersuchten Patienten, fehlte von zwei weiteren Erwachsenen die Beurteilung des AZ. Von den 87 Untersuchten befanden sich 52 (59,8%) in einem guten und 32 (36,8%) in einem reduzierten AZ. Zwei Personen (2,3%) machten einen stark reduzierten und ein Patient (1,2%) einen moribunden Eindruck.

#### 4.4.1.3 BMI und Untergewicht

Die BMI-Berechnung wurde bei 88 Patienten durchgeführt, bei neun Kranken war dies aufgrund oben beschriebener fehlender Untersuchungsergebnisse nicht möglich (s. 4.4.1.1).

Zur Prüfung von möglichem Untergewicht wurde bei Erwachsenen die allgemein hin definierte Grenze eines BMI-Wertes von unter 18,5 kg/m<sup>2</sup> und bei Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren der WHO-Grenzwert, welcher mit einem BMI-Wert unter der 5%-Perzentile der internationalen *BMI-for-age*-Referenz definiert ist, verwendet [42, 105]. Von den 51 Stadium-II-Patienten, bei denen der BMI berechnet wurde, waren 30 untergewichtig (58,8%), während dies in 20 von 37 Fällen (54,1%) der Stadium-I-Patienten der Fall war. In Abbildung 17 wird die Verteilung des BMI nach Alter und Stadien graphisch dargestellt.



**Abbildung 17: BMI nach Alter und Stadien.** Links: Rote Quadrate: Kinder unter 18 Jahren im Stadium II; Grüne Quadrate: Kinder unter 18 Jahren im Stadium I; Schwarze Kurven: 5, 50 bzw. 95%-Perzentilen der internationalen Referenz als gemittelter Wert von Jungen und Mädchen [42]; Rechts: Rote Karos: Erwachsene im Stadium II; Grüne Karos: Erwachsene im Stadium I; Gestrichelte Linie: Grenze zum Untergewicht bei Erwachsenen (BMI= 18,5).

Insgesamt waren prozentual mehr Erwachsene (40 von 66 = 60,6%) als Kinder (10 von 22 = 45,5%) betroffen. Bei den Erwachsenen im Stadium II fand sich der BMI-Mittelwert bei 17,95 kg/m<sup>2</sup> (95%-KI 17,2 – 18,7) und der Median bei 17,9 kg/m<sup>2</sup>. Der Mittelwert der Erwachsenen im Stadium I lag bei 18,27 kg/m<sup>2</sup> (95%-KI 17,1 – 19,4) und der Median bei 18,2 kg/m<sup>2</sup>.

Es bestand kein signifikanter Unterschied der Titerhöhen der spezifischen Antikörper im Serum von untergewichtigen gegenüber nicht untergewichtigen Patienten: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben ergab sich  $p = 0,279$  ( $Z = -1,083$ ) für IgG,  $p = 0,174$  ( $Z = -1,36$ ) für IgM sowie  $p = 0,495$  ( $Z = -0,682$ ) für IgA.

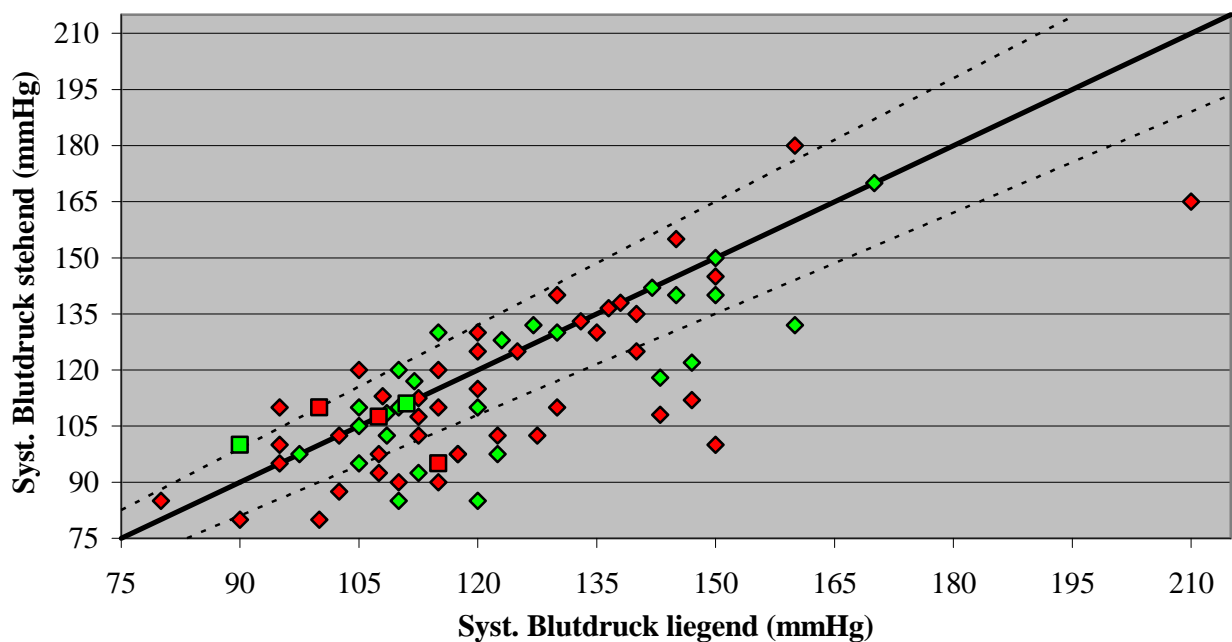
#### 4.4.1.4 Temperatur

Die Messung der axillären Temperatur wurde bei 88 Patienten dokumentiert. Bei den neun Patienten, an denen diese Untersuchung nicht durchgeführt wurde, handelte es sich um die acht generell nicht Untersuchten sowie um die schwangere Patientin (s. 4.4.1.1). Der Median lag bei 36,3 °C, das 25%-Quartil bei 36,0 °C und das 75%-Quartil bei 36,8 °C. Von 88 Patienten zeigten 79 (89,9%) eine normale Temperatur zwischen 36,0 °C und 37,2 °C. Im subfebrilen Bereich (> 37,2 °C und < 38,5 °C) befanden sich zwei (2,3%), im febrilen Bereich (> 38,5 °C) ein Patient (1,1%). Unterkühlte Temperaturen (< 36,0 °C) waren in sechs Fällen (6,8%) zu beobachten. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Titerhöhe von spezifischem IgG, IgA oder IgM im Serum der Patienten mit Temperaturen außerhalb des Normbereichs gegenüber solchen innerhalb des Normbereiches festgestellt werden: Im Wilcoxon-

Test von zwei unabhängigen Stichproben ergab sich  $p = 0,799$  ( $Z = -0,255$ ) für IgG,  $p = 0,634$  ( $Z = -0,476$ ) für IgM sowie  $p = 0,612$  ( $Z = -0,508$ ) für IgA.

#### 4.4.1.5 Blutdruck

Der Blutdruck wurde bei 75 Patienten in liegender und bei 73 Patienten in stehender Position gemessen. Wie bereits erwähnt konnte diese Untersuchung bei 13 Kindern unter 13 Jahren nicht durchgeführt werden. Die Werte im Stehen von zwei Patienten, die aufgrund ihres schlechten AZ nicht in der Lage waren aufzustehen, fehlten ebenfalls. Außerdem wurde die Untersuchung weder bei der schwangeren Patientin noch bei den acht generell nicht Untersuchten durchgeführt (s. 4.4.1.1). Für die Messung im Liegen befand sich der Median bei 115 mmHg (systolisch) bzw. 80 mmHg (diastolisch). Im Stehen lag der Median bei 110 mmHg (systolisch) bzw. 80 mmHg (diastolisch). In 37 von 73 Fällen (50,7%) fand sich ein Abfall des systolischen Blutdrucks nach dem Aufstehen. Unter diesen 73 Fällen befanden sich vier Kinder im Alter von 13 bis 14 und vier Jugendliche im Alter von 16 bis 17 Jahren. In 24 Fällen (32,9%) fand sich ein Blutdruckabfall um mindestens 10% nach dem Aufstehen. Bei zwölf dieser Patienten fiel der systolische Blutdruckwert im Stehen dabei auf Werte zwischen 90 bis 105 mmHg, bei vier Kranken sogar auf Werte unter 90 mmHg, wobei bei nur einem dieser 16 Patienten bereits im Liegen ein systolischer Wert von unter 105 mmHg gemessen wurde. Von diesen 24 Patienten befanden sich sieben im Stadium I und 17 im Stadium II (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Lageabhängigkeit des Blutdruckes.** Rote Karos: Erwachsene und Jugendliche ( $\geq 16$  Jahre) im Stadium II; Rote Quadrate: Kinder (zwischen 13 und 14 Jahren) im Stadium II; Grüne Karos: Erwachsene und Jugendliche ( $\geq 16$  Jahre) im Stadium I; Grüne Quadrate: Kinder (zwischen 13 und 14 Jahren) im Stadium I; Dicke Linie: Steigungsgerade mit Steigungsfaktor = 1,0; Gestrichelte Linien: Steigungsgeraden mit Steigungsfaktoren = 1,1 bzw. 0,9.

Stadium-II-Patienten zeigten prozentual einen höheren Anteil (17 von 45 = 37,8%) dieser Blutdruckabfälle gegenüber Stadium-I-Patienten (7 von 28 = 25%). Im  $\chi^2$ -Test nach Person bestand mit  $p= 0,258$  allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem solchen RR-Abfall und der Zugehörigkeit zu einem der beiden Stadien (s. Tabelle 17).

Auch war der Unterschied der Mittelwerte der Leukozytenzahlen im Liquor der Gruppe von Patienten ohne den erwähnten Blutdruckabfall (Mittelwert 55,86 Zellen/mm<sup>3</sup> mit einem 95%-KI: von 23,83 – 87,88 und einem Median von 9) zu derjenigen, die einen Abfall des systolischen Blutdruckes von mindestens 10% nach dem Aufstehen zeigten (Mittelwert 108,75 Zellen/mm<sup>3</sup> mit einem 95%-KI von 28,49 – 189,01 und einem Median von 14) nicht signifikant: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben war  $p= 0,2$  mit  $Z= -1,271$ .

**Tabelle 17: Systolischer Blutdruckabfall von >10% nach Stadien**

|   |      | Stadium |    | Gesamt <sup>a</sup> | Signifikanz <sup>b</sup> |
|---|------|---------|----|---------------------|--------------------------|
|   |      | I       | II |                     |                          |
| Syst. RR-Abfall nach dem Aufstehen >10% | ja   | 7       | 17 | 24                  | p= 0,258                 |
|   | nein | 21      | 28 | 49                  |                          |
| Gesamt <sup>a</sup>                     |      | 28      | 45 | 73                  |                          |

<sup>a</sup> Nicht durchgeführte Blutdruckuntersuchungen (n= 24) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

<sup>b</sup> Signifikanz des Zusammenhanges eines systolischen Blutdruckabfalls von mindestens 10% nach dem Aufstehen und einer Stadienzugehörigkeit im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

Es fand sich kein signifikanter Unterschied der Titerhöhen von spezifischem IgG, IgA bzw. IgM im Serum von Patienten, die ein Absinken des systolischen Blutdruckabfalls von mindestens 10% nach dem Aufstehen zeigten, gegenüber solchen, die es nicht taten: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben ergab sich  $p= 0,701$  ( $Z= -0,385$ ) für IgG,  $p= 0,38$  ( $Z= -0,878$ ) für IgM sowie  $p= 0,713$  ( $Z= -0,368$ ) für IgA.

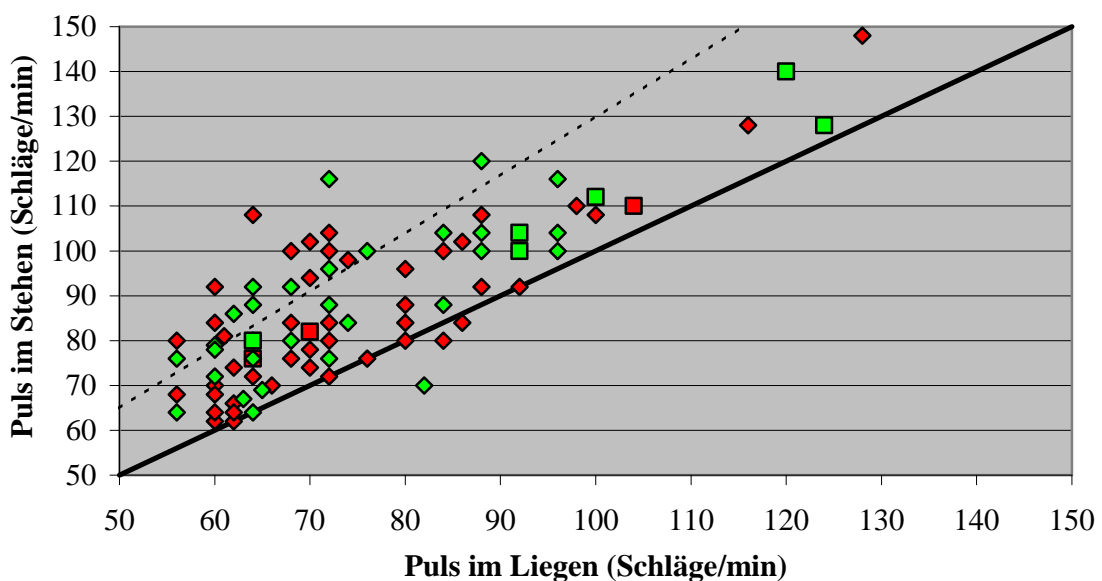
#### 4.4.1.6 Puls

Der Puls an der Arteria radialis wurde liegend bei 88 und stehend bei 84 Patienten palpirt. Neben den acht generell nicht untersuchten und der schwangeren Patientin (s. 4.4.1.1) fehlten außerdem die Werte im Stehen für die zwei beschriebenen bettlägerigen Patienten sowie für zwei weitere Patienten.

Für die Messung im Liegen lag der Median bei 72 Schlägen/min, für die im Stehen bei 84 Schlägen/min. Bei der Ruhe-Messung im Liegen waren von 79 Erwachsenen und Jugendlichen ( $\geq$  zehn Jahre) vier mit Pulsfrequenzen um 56 Schläge/min grenzwertig bradykard, wobei sich je zwei Patienten dem Stadium I bzw. II zuordnen ließen. Zusätzlich waren zwei von neun Kindern (5 und 8 Jahre) mit jeweils 64 Schlägen/min im Liegen altersbezogen bradykard, beide waren Stadium-II-Patienten. Bei zwei Erwachsenen (beide Stadium II) waren Tachykardien von >100 Schläge/min und bei einem 9-jährigen Kind (Stadium I) eine altersbezogene Tachykardie von 120 Schlägen/min festzustellen.



Bei der physiologischen Kreislaufreaktion kommt es nach dem Aufstehen zu einem leichten Ansteigen des Pulses, jedoch nicht um mehr als 30% [15]. In den hier durchgeführten Untersuchungen war bei 22 Patienten (26,2%) ein Pulsanstieg von über 30% nach dem Aufstehen zu messen. Hiervon befanden sich jeweils elf Patienten im Stadium I bzw. II. Bei fünf Stadium-I-Patienten und bei sechs Stadium-II-Patienten lag gleichfalls ein Abfall des systolischen Blutdruckes um mehr als 10% nach dem Aufstehen vor. Bei einer Person (Stadium I) kam es zu einem Pulsabfall von 12 Schlägen/min, während bei 21 Patienten (Sieben davon im Stadium I und 15 im Stadium II) ein in etwa gleich bleibender Puls ( $\pm 4$  Schläge/min) festgestellt wurde (s. Abbildung 19). Der Blutdruck des Patienten mit dem Abfall von 12 Schlägen/min veränderte sich leicht vom Liegen (120/90 mmHg) zum Stehen (110/90 mmHg).



**Abbildung 19: Lageabhängigkeit des Pulses.** Rote Karos: Erwachsene und Jugendliche ( $\geq$  zehn Jahre) im Stadium II; Rote Quadrate: Kinder unter zehn Jahren im Stadium II; Grüne Karos: Erwachsene und Jugendliche ( $\geq$  zehn Jahre) im Stadium I; Grüne Quadrate: Kinder unter zehn Jahren im Stadium I; Dicke Linie: Steigungsgerade mit Steigungsfaktor = 1,0; Gestrichelte Linie: Steigungsgerade mit Steigungsfaktor = 1,3.

Insgesamt wiesen 30 von 84 Patienten (35,7%) abnorme Pulsfrequenzen bzw. pathologische Pulsadaptationen nach dem Aufstehen auf. Diese standen jedoch weder im Zusammenhang mit der Stadienangehörigkeit der Patienten ( $p = 0,248$   $\chi^2$ -Test nach Pearson) noch mit der Höhe der spezifischen Immunglobuline im Serum: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben war für IgG  $p = 0,969$  ( $Z = -0,39$ ), für IgM  $p = 0,195$  ( $Z = -1,295$ ) und für IgA  $p = 0,604$  ( $Z = -0,519$ ).

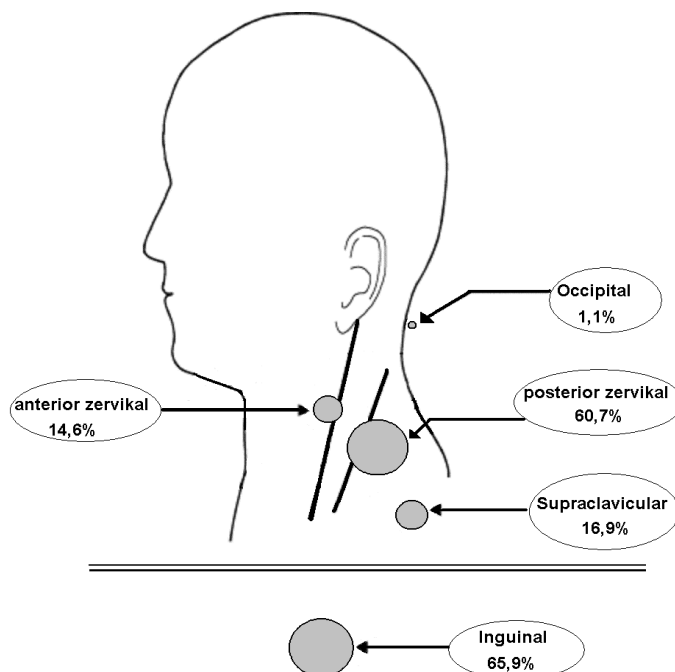
#### 4.4.1.7 Leber und Milz

Die Palpation von Leber und Milz wurde bei 88 Patienten durchgeführt. Wiederum fehlten die Daten der schwangeren Patientin und der acht generell nicht Untersuchten (s. 4.4.1.1). In 34 der 88 Fälle (38,9%) war die Leber tastbar. In 15 Fällen (17,1%) lag der kaudale Rand des Organs dabei mehr als 2 cm unter dem rechten Rippenbogen in der Medioklavikularlinie.

Das Maximum lag bei 7 cm und das 75%-Quartil bei 1,38 cm unter dem rechten Rippenbogen. Die Milz konnte in 27 von 88 Fällen (30,7%) palpiert werden, wobei sich das Maximum der Milzvergrößerung bei 6,5 cm fand. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Vergrößerungen beider Organe gefunden werden ( $p= 0,970$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Auch konnte kein signifikanter Unterschied der Titerhöhe der spezifischen Antikörper im Serum von Patienten mit oder ohne Hepato- bzw. Splenomegalie festgestellt werden: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben ergab sich bei Splenomegalie  $p= 0,559$  ( $Z= -0,585$ ) für IgG,  $p= 0,99$  ( $Z= -0,013$ ) für IgM sowie  $p= 0,741$  ( $Z= -0,331$ ) für IgA und bei Hepatomegalie  $p= 0,836$  ( $Z= -0,207$ ) für IgG,  $p= 0,544$  ( $Z= -0,607$ ) für IgM sowie  $p= 0,61$  ( $Z= -0,511$ ) für IgA.

#### 4.4.1.8 Lymphadenopathie

Bei der Palpation von Lymphadenopathien fehlten die Daten der acht nicht untersuchten Patienten (s. 4.4.1.1). Die Untersuchung der inguinalen LK wurde nur bei 41 Patienten durchgeführt. Von 89 Patienten hatten 72 (80,9%) palpable Lymphadenopathien. Besonders oft waren dabei die posterior zervikalen (54 von 89 = 60,7%) und die inguinalen (27 von 41 = 65,9%) LK betroffen. Die supraclavikulär gelegenen LK zeigten sich in 16,9% (15 von 89) und die anterior zervikal lokalisierten in 14,6% (13 von 89) tastbar vergrößert. Occipital fand sich nur in einem Fall eine Lymphadenopathie (s. Abbildung 20).



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Verteilung der Lymphadenopathien.** Schwarze Linien: Verlauf des Musculus sternocleidomastoideus; Kreise: Sitz der Lymphknoten (Größe ist proportional zum Prozentsatz).

Stadium-II-Patienten wiesen einen höheren Anteil von Lymphadenopathien auf als Stadium-I-Patienten. Die 51 Kranken im fortgeschrittenen Stadium, bei denen der Lymphknotenstatus

erhoben wurde, hatten anterior zervikal in neun (17,7%), supraklavikulär in zwölf (23,5%) und occipital in einem (1,9%) Fall vergrößerte LK, während dies nur bei vier (10,3%), drei (8,1%) bzw. keinem von 37 Stadium-I-Patienten der Fall war. Inguinale Lymphadenopathien wurden in 19 von 28 (67,8%) Fällen bei Stadium-II-Patienten bzw. bei acht von 13 (61,5%) Stadium-I-Patienten gefunden (s. Tabelle 18). Bezogen auf die Stadienverteilung ergab sich an keiner der erwähnten Lokalisationen ein auf dem 5%-Niveau signifikanter Unterschied der Anzahlen vergrößerter LK. Hingegen fanden sich bei 37 von 51 (72,3%) Patienten im fortgeschrittenen Stadium posterior zervikal vergrößerte LK, während dies nur bei 16 von 37 (43,2%) der Stadium-I-Patienten der Fall war (s. Tabelle 18). Dieser Unterschied war auf dem 1%-Niveau signifikant ( $p=0,006$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson).

**Tabelle 18: Lokalisation der Lymphadenopathien nach Stadien**

|                    | <i>Gesamt</i><br>( <i>n</i> = 88) <sup>a</sup> | <i>Stadium I</i><br>( <i>n</i> = 37) | <i>Stadium II</i><br>( <i>n</i> = 51) | <i>Signifikanz</i> <sup>b</sup> |
|--------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Posterior zervikal | 53 (60,2%)                                     | 16 (43,2%)                           | 37 (72,3%)                            | $p=0,006$                       |
| Anterior zervikal  | 13 (14,8%)                                     | 4 (10,8%)                            | 9 (17,7%)                             | $p=0,372$                       |
| Supraclavicular    | 15 (17,1%)                                     | 3 (8,1%)                             | 12 (23,5%)                            | $p=0,058$                       |
| Occipital          | 1 (1,1%)                                       | 0 (0%)                               | 1 (1,9%)                              | $p=0,478$                       |
| Inguinal           | 27/41 (65,9%) <sup>c</sup>                     | 8/13 (61,5%) <sup>c</sup>            | 19/28 (67,8%) <sup>c</sup>            | $p=0,691$                       |

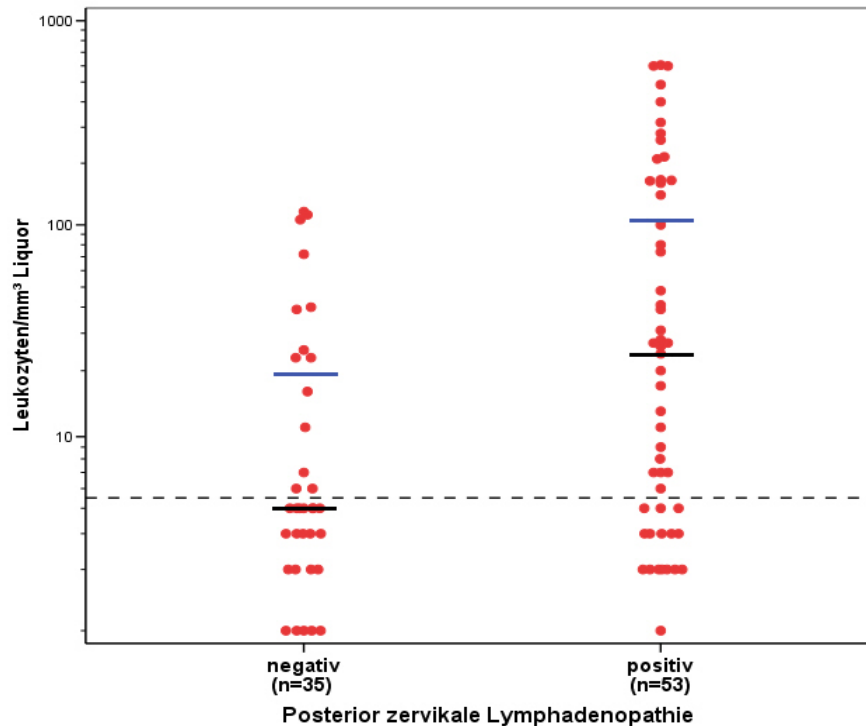
<sup>a</sup> Nicht durchgeführte Untersuchungen der Lymphadenopathien ( $n=9$ ) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

<sup>b</sup> Signifikanz des Zusammenhanges einer Lymphadenopathie an entsprechender Lokalisation und einer Stadienzugehörigkeit im  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

<sup>c</sup> Nicht durchgeführte Untersuchungen der inguinalen Lymphadenopathien ( $n=56$ ) nicht berücksichtigt. Erklärungen im Text.

Der Mittelwert der Leukozytenzahlen im Liquor der Gruppe von Patienten mit vergrößerten posterior zervikalen LK lag bei 103,34 Zellen/mm<sup>3</sup> (95%-KI: 57,88 – 148,8) und ihr Median bei 24 Zellen/mm<sup>3</sup> gegenüber einem Mittelwert von 19,4 Zellen/mm<sup>3</sup> (95%-KI: von 8,4 – 30,4) und einem Median von 5 Zellen/mm<sup>3</sup> derjenigen Patienten ohne diese Lymphadenopathie (s. Abbildung 21). Dieser Unterschied der Mittelwerte der Leukozyten im Liquor war im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben auf dem 1%-Niveau signifikant ( $p=0,002$  mit  $Z=-3,09$ ).

Kein signifikanter Zusammenhang bestand hingegen zwischen dem Auftreten von posterior zervikalen Lymphadenopathien und der Titerhöhe der spezifischen Immunglobuline im Serum der zugehörigen Patienten. Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben war  $p=0,25$  ( $Z=-1,149$ ) für IgG,  $p=0,823$  ( $Z=-0,224$ ) für IgM sowie  $p=0,489$  ( $Z=-0,692$ ) für IgA.



**Abbildung 21: Auftreten von posterior zervikalen Lymphadenopathien nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Blaue Linien: Mittelwert; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II (> 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor).

#### 4.4.1.9 Bauchschmerz

Das Vorliegen von Bauchschmerz konnte bei den acht nicht untersuchten Patienten nicht erfragt werden (s. 4.4.1.1). Bei 19 der verbleibenden 89 Patienten (21,3%) wurde auf Befragen Bauchschmerz angegeben. Die Lokalisationen verteilten sich dabei auf die Regiones hypochondrica sinistra (3), epigastrica (2), umbilicalis (5), pubica (4), inguinalis sinistra (2), inguinalis dextra (2) und eine nicht näher spezifizierte Angabe. 10 der 19 Patienten, die Bauchschmerzen angaben, waren Kinder. Umgekehrt gaben nur 12 Kinder, aber 58 Erwachsene an, nicht unter abdominalem Schmerz zu leiden. Ein Unterschied der Titerhöhen der spezifischen Antikörperspiegel im Serum von Patienten mit gegenüber solchen ohne Bauchschmerzen bestand nicht: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben war  $p=0,156$  ( $Z= -1,419$ ) für IgG,  $p=0,129$  ( $Z= -1,519$ ) für IgM sowie  $p=0,358$  ( $Z= -0,92$ ) für IgA.

## 4.4.1.10 Übersicht über die klinischen Untersuchungsergebnisse

Zusammenfassend werden die Untersuchungsergebnisse in Tabelle 19 abgebildet.

**Tabelle 19: Ergebnisse der körperlichen Untersuchung**

| <i>Klinischer Parameter</i>  | <i>Anzahl<sup>a</sup></i> | <i>Ergebnis<sup>b</sup></i>                   |
|--|---------------------------|---|
| AZ (gut / reduziert / stark reduziert / moribund) <sup>c</sup>     | n= 87                     | 52 (59,8%) / 32 (36,8%) / 2 (2,3%) / 1 (1,2%) |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ): Erwachsene (≥ 18 Jahre)                  | n= 66                     | 18,08 (2,53)                                  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ): Kinder und Jugendliche (< 18 Jahre)      | n= 22                     | 15,22 (1,94)                                  |
| Untergewicht (ja / nein) <sup>c</sup>                              | n= 88                     | 50 (56,8%) / 38 (43,2%)                       |
| Axilläre Temperatur (°C)   | n= 88                     | 36,3 (33,9 - 38,7)                            |
| Puls stehend (Schläge/min)   | n= 84                     | 84 (64 - 148)                                 |
| Puls liegend (Schläge/min)   | n= 88                     | 72 (56 - 128)                                 |
| Tachykardie (ja / nein) <sup>c</sup>                               | n= 88                     | 3 (3,4%) / 85 (96,6%)                         |
| Bradykardie (ja / nein) <sup>c</sup>                               | n= 88                     | 6 (6,8%) / 82 (93,2%)                         |
| Pulsanstieg nach Aufstehen >30% (ja / nein) <sup>c</sup>           | n= 84                     | 22 (26,2%) / 62 (73,8%)                       |
| Puls-Pathologie insgesamt (ja / nein) <sup>c</sup>                 | n= 84                     | 30 (35,7%) / 54 (64,3%)                       |
| RR systolisch / diastolisch stehend (mm Hg)                        | n= 73                     | 110 (80 -180) / 80 (55 - 105)                 |
| RR systolisch / diastolisch liegend (mm Hg)                        | n= 75                     | 115 (65 - 210) / 80 (50 - 105)                |
| Syst. RR-Abfall nach Aufstehen (ja / nein) <sup>c</sup>            | n= 73                     | 37 (50,7%) / 36 (49,3%)                       |
| Syst. RR-Abfall >10% nach Aufstehen (ja / nein) <sup>c</sup>       | n= 73                     | 24 (32,9%) / 49 (67,1%)                       |
| Syst. RR-Abfall < 105 mmHg nach Aufstehen (ja / nein) <sup>c</sup> | n= 73                     | 16 (21,9%) / 57 (78,1%)                       |
| Hepatomegalie (ja / nein) <sup>c, d</sup>                          | n= 88                     | 15 (17%) / 73 (83%)                           |
| Splenomegalie (ja / nein) <sup>c, d</sup>                          | n= 88                     | 27 (30,7%) / 61 (69,3%)                       |
| Lymphadenopathie (ja / nein) <sup>c, e</sup>                       | n= 89                     | 64 (71,9%) / 25 (28,1%)                       |
| Posterior zervikale Lymphadenopathie (ja / nein) <sup>c</sup>      | n= 89                     | 54 (60,7%) / 35 (39,3%)                       |
| Bauchschmerz (ja / nein) <sup>c</sup>                              | n= 89                     | 19 (21,3%) / 70 (78,7%)                       |

<sup>a</sup> Abweichungen von der Gesamtzahl der Patienten (n= 97) werden im Text erläutert.

<sup>b</sup> Angaben in Mittelwert (Standardabweichung) oder Median (Minimum - Maximum), falls nicht anders bezeichnet.

<sup>c</sup> Angaben in absoluten Zahlen (Prozent).

<sup>d</sup> Palpierbar unterhalb des linken (Milz) bzw. ≥ 2 cm unterhalb des rechten (Leber) Rippenbogens in der Medioklavikularlinie.

<sup>e</sup> Lymphadenopathie in mindestens einer der untersuchten Regionen.

#### 4.4.2 Ergebnisse der Stand- und Ganguntersuchungen

Es wurde an 87 Patienten eine Untersuchung des Standes, des normalen Ganges und des Seiltänzeranges vorgenommen. Neben den acht generell nicht untersuchten Patienten (s. 4.4.1.1) fehlten bei zwei Kindern (beide fünf Jahre) die Daten dieser Untersuchungen. Die Untersuchungen des Standes und des Ganges werden nachfolgend in verschiedene Untersuchungsstufen untergliedert, die jeweils mit der Zahl ihrer Rangfolge bezeichnet werden: Bei der Prüfung des Standes (U1) waren 4 Patienten (4,6%) aufgrund ihres stark reduzierten AZ nicht in der Lage über die notwendige Zeit zu stehen. Je zwei dieser Patienten befanden sich im Stadium I bzw. II. Von den 83 danach Untersuchten waren vier weitere (4,6%) nicht in der Lage ohne Stütze zu stehen (U2). Drei von ihnen waren Stadium-II-Patienten, jeweils mit einer Zellzahl von  $\geq 100/\text{mm}^3$  Lumbalflüssigkeit. Die vierte Patientin befand sich im Stadium I. Dabei handelte es sich um eine 55-jährige Frau, die bis auf einen reduzierten AZ und Untergewicht keine weiteren Krankheitszeichen aufwies. Der Gangversuch (U3) erbrachte in zehn der verbleibenden 79 Fälle (11,5%) ein abnormes Ergebnis. Von diesen zehn Patienten befanden sich acht im Stadium II und zwei im Stadium I. Letztere sowie zwei Patienten des Stadiums II wurden erst zwei Tage nach dem Behandlungsbeginn mit Pentamidin bzw. Melarsoprol untersucht. Bei der Beurteilung des Seiltänzeranges (U4) fiel bei acht der verbleibenden 69 Patienten (9,2%) das Ergebnis pathologisch aus, wobei sich sieben Kranke dieser Gruppe im Stadium II und ein Patient im Stadium I befanden. Wiederum fand die Untersuchung bei zwei der Patienten im Stadium II erst zwei Tage nach Behandlungsbeginn statt. Insgesamt 61 Patienten (70,1%) führten alle Untersuchungen durch, ohne dass ein krankhaftes Resultat auftrat. Hierbei waren jeweils 30 Patienten den beiden Stadien zugeordnet, während in einem Fall (schwängere Patientin) wie erwähnt keine Stadienzuteilung vorgenommen werden konnte. Ein Überblick über die Ergebnisse der Stand- und Ganguntersuchungen wird in Tabelle 20 gegeben.

**Tabelle 20: Ergebnisse der Stand- und Ganguntersuchungen**

| <i>Rangfolge der Untersuchung</i> | <i>Untersuchungsergebnis</i>    | <i>Anzahl</i> <sup>a</sup> | <i>Stadium I / II</i> <sup>b</sup> |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| U1                                | Nicht aufstehfähig              | 4 (4,6%)                   | 2 (5,6%) / 2 (4%)                  |
| U2                                | Aufstehfähig, aber standunfähig | 4 (4,6%)                   | 1 (2,8%) / 3 (6%)                  |
| U3                                | Erst beim Gang unsicher         | 10 (11,5%)                 | 2 (5,6%) / 8 (16%)                 |
| U4.1                              | Erst beim STZG unsicher         | 8 (9,2%)                   | 1 (2,8%) / 7 (14%)                 |
| U4.2                              | Selbst beim STZG sicher         | 61 (70,1%)                 | 30 (83,3%) / 30 (60%) <sup>c</sup> |
| Gesamt                            |                                 | 87 (100%)                  | 36 (100%) / 50 (100%) <sup>c</sup> |

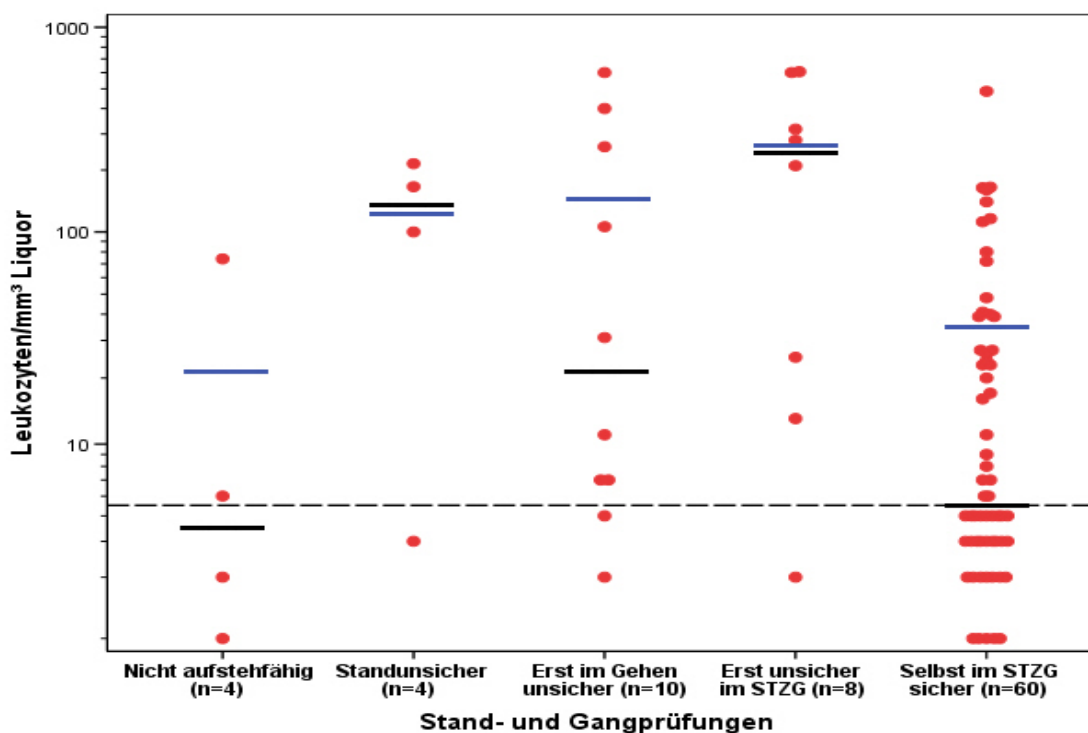
<sup>a</sup> Angaben in absoluten Zahlen (Prozent an allen Patienten).

<sup>b</sup> Angaben in absoluten Zahlen (Prozent an allen Patienten des jeweiligen Stadiums).

<sup>c</sup> Bei der schwängeren Patientin konnte keine Stadienzuteilung vorgenommen werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse nach der Stadienzugehörigkeit der Patienten ist zu bemerken, dass nur 60% (30 von 50) der Stadium-II-Patienten alle Untersuchungen ohne patholo-

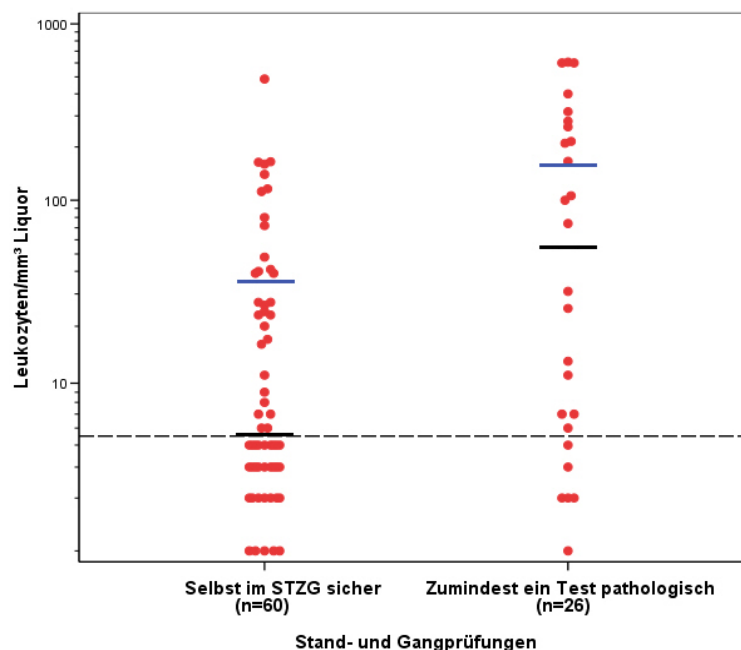
gisches Resultat durchführen konnten, gegenüber 83,3% (30 von 36) der Stadium-I-Patienten. Es bestand ein auf dem 5%-Niveau signifikanter Zusammenhang von Stadienzugehörigkeit und einem pathologischen Resultat in mindestens einem der Stand- und Gangversuche ( $p=0,02$  im  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Mit Ausnahme der vier Patienten, die nicht aufstehfähig waren (U1), zeigten alle anderen Gruppen von Kranken mit pathologischen Stand- oder Gangtests höhere Zellzahlen im Liquor als diejenigen Patienten, die selbst den STZG korrekt ausführen konnten. Die jeweiligen Mediane und Mittelwerte von Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor lagen bei 4,5 und 21,25 (Patienten, die nicht aufstehfähig waren: U1), 133 und 121,25 (Patientengruppe, welche Standunsicherheiten zeigte: U2), 21 und 143 (Kranke, welche beim Gangtest pathologische Untersuchungsergebnisse aufwiesen: U3) bzw. 256,75 und 245 (Patienten, welche erst in der Untersuchung des STZG Auffälligkeiten zeigten: U4.1) gegenüber einem Median von 5,5 und einem Mittelwert von 34,52 Zellen/mm<sup>3</sup> derjenigen Untersuchten, welche in keinem Stand- oder Gangtests ein pathologisches Ergebnis zeigten (U4.2). Dies wird graphisch in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Ergebnisse der einzelnen Stand- und Gangversuche nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Blaue Linien: Mittelwert; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II (> 5 Leukozyten/mm<sup>3</sup> Liquor).

Werden die Patientengruppen, welche klinische Auffälligkeiten in zumindest einem Stand- oder Gangtest zeigen (U1 – U4.1) zusammengefasst, so liegt der gemeinsame Median bei 52,5 und der gemeinsame Mittelwert bei 155,92 mit einem 95%-KI von 74,81 – 237,04 Zellen/mm<sup>3</sup> (s. Abbildung 23). Gegenüber dem bereits erwähnten Mittelwert derjenigen Patienten ohne Stand- oder Gangpathologien (U4.2) von 34,52 Zellen/mm<sup>3</sup> (95%-KI: 15,62 – 53,42)

existierte ein im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben auf dem 1%-Niveau signifikanter Unterschied ( $p= 0,005$  mit  $Z= -2,833$ ).



**Abbildung 23: Ergebnisse der zusammengefassten Stand- und Gangversuche nach Pleozytose.** Rote Punkte: Einzelne Patienten; Schwarze Linien: Median; Blaue Linien: Mittelwert; Gestrichelte Linie: Grenzwert zum Stadium II ( $> 5$  Leukozyten/ $\text{mm}^3$  Liquor).

Bei den 20 Stadium-II-Patienten mit pathologischem Stand- bzw. Gangtest (U1 – U4.1) konnte spezifisches IgG in 6 Fällen (30%) nachgewiesen werden. Bei den 30 Stadium-II-Patienten, welche keine Stand- oder Gangauffälligkeiten zeigten (U4.2), war dies nur in 2 Fällen (6,7%) möglich (s. Tabelle 21). Der Unterschied der Titerhöhe von spezifischem IgG im Liquor von Stadium-II-Patienten mit normalen gegenüber denen mit pathologischen Resultaten in den Stand- und Gangversuchen war auf dem 5%-Niveau signifikant: Im Wilcoxon-Test von zwei unabhängigen Stichproben war  $p= 0,025$  ( $Z= -2,239$ ).

**Tabelle 21: Stand- und Gangteste nach Titern von spezifischem IgG im Liquor**

| Stadium-II-Patienten              |       | <i>Stand- und Gangprüfungen<sup>a</sup></i>     |                               | Gesamt          |
|-----------------------------------|-------|---|-------------------------------|-----------------|
|                                   |       | Pathologisch in zumindest einem Test (U1 – 4.1) | in allen Testen normal (U4.2) |                 |
| <i>Spezifisches IgG im Liquor</i> | <1:10 | 14  | 28                            | 42              |
|                                   | 1:10  | 4   | 2                             | 6               |
|                                   | 1:20  | 2   | 0                             | 2               |
| Gesamt                            |       | 20  | 30                            | 50 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> Angabe in absoluten Zahlen.

<sup>b</sup>  $n= 50$  ist die Gesamtheit der Stadium-II-Patienten, bei denen Stand- und Gangprüfungen vorgenommen wurden.



Bei drei der sechs Stadium-II-Patienten mit Titern von spezifischem IgG im Liquor  $\geq 1:10$  und pathologischem Ergebnis in den Stand- oder Gangversuchen waren in der Liquor-Mikroskopie Trypanosomen nachweisbar (Studiennummern SR 77, SR 112 und SR 135), während dieser Nachweis bei den anderen drei Kranken nicht erbracht werden konnte (Studiennummern SR 51, SR 57 und SR 131). Von den beiden Stadium-II-Patienten mit einem Titer an spezifischem IgG im Liquor von 1:10 und normalen Ergebnissen in den Stand- und Gangversuchen wies je einer Trypanosomen im Liquor (Studiennummer SR 72) auf und einer (Studiennummer SR 54) nicht (siehe 4.3.2.2 bzw. Tabelle 16).

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion des Studienkollektives

Die Daten der Verwaltungsbücher der Studienzentren wiesen für die Provinz Uíge eine über den Zeitraum September bis Oktober 2002 gemittelte CATT-Prävalenz von 5,9% aus. Diese liegt somit in einem Bereich wie sie auch in anderen Foci in Angola (4,9%), Sudan (3 bis 9%) oder Uganda (6,5%) gefunden werden kann [35, 63, 85].

Die 97 Teilnehmer der Studie waren die Gesamtheit der einwilligungsfähigen und die Einschlusskriterien erfüllenden Patienten zum Zeitpunkt der Erhebung. Der Ansicht des Autors nach stellen sie somit ein repräsentatives Kollektiv der Schlafkrankheitspatienten aus der untersuchten Region dar. Das Geschlechterverhältnis und die Altersstruktur der Studienteilnehmer waren vergleichbar mit jenen von über 2500 Stadium-II-Patienten einer internationalen Studie von Blum *et al.* [11]. Der relativ niedrige Altersmedian erklärt sich einerseits durch das niedrige Durchschnittsalter der Gesamtbevölkerung (Bürgerkrieg, niedrige Lebenserwartung und hohe Geburtenrate) und andererseits durch die Transmissionsart (an Wasserläufen, wo Kinder spielen und junge Erwachsene Arbeiten wie Wasser holen, waschen etc. verrichten).

### 5.2 Diskussion der PCR-Versuche

#### 5.2.1 Methodik und Vorversuche der PCR

Ein diagnostischer Routine-Test sollte reproduzierbar sein und gleichzeitig eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die von Kabiri *et al.* (1999) beschriebene PCR versprach neben der Spezifität des Genabschnittes für *T.b. spp.* mit einer analytischen Nachweisgrenze von 0,1 Trypanosom/10 µl auch eine hohe Sensitivität [36]. In den hier durchgeführten Versuchen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden: Die analytische Nachweisgrenze lag mit  $10^3$  Trypanosomen/10 µl selbst unter Variation der Testbedingungen im günstigsten Fall vier Zehnerpotenzen über dem von den genannten Autoren publizierten Bereich (s. 4.2.1.1). Daher wurde dieser Ansatz aufgegeben und der Parasitenachweis durch Amplifikation eines anderen Gen-Abschnittes angestrebt. Auf Basis der von Moser *et al.* (1989) entwickelten PCR gaben mehrere Autoren mit bis zu 0,1 Trypanosome-näquivalent/10 µl ebenfalls äußerst niedrige analytische Nachweisgrenzen an (s. 2.1.1) [37, 71]. Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch Inkonsistenzen der Ergebnisse und eine schlechte Reproduzierbarkeit dieser PCR-Methode auf [22, 31, 87]. Aus diesem Grund wurden die Versuche dieser Arbeit auf Basis einer weiteren, von Matovu *et al.* (2001) publizierten PCR durchgeführt (s. 3.2.5.4). Diese PCR diente der Amplifikation des TbAT1-Genes und wurde

bisher für Versuche über Melarsoprol-Resistenzen genutzt, wobei jedoch von den Autoren keine Angaben über die erreichte analytische Nachweisgrenze gemacht wurden.

Wegen PCR-inhibitorischen Komponenten im Blut sollte keine direkte Amplifikation von Gen-Abschnitten aus Vollblut erfolgen, sondern vorab eine Purifizierung der DNA vorgenommen werden [33]. Aufgrund der ungewissen Energieversorgung und Kühlmöglichkeiten in Angola wurde unter Verwendung des Lysis-Puffers AS eine Methode zur DNA-Purifizierung benutzt, welche bereits Kabiri *et al.* (1999) angewendet hatten, um DNA-haltige Proben bei Raumtemperatur zu lagern [36]. Nach Herstellerangaben verändert sich hierbei der DNA-Gehalt von Blut- und Körperflüssigkeitsproben bei einer bis zu 12-wöchigen Lagerung bei bis zu 37 °C weder qualitativ noch quantitativ signifikant [75]. Die Ergebnisse der Probenlagerungsversuche (s. 4.2.1.3 und 4.2.1.4) zeigten jedoch mit zunehmender Lagerungszeit sukzessiv eine Verschlechterung der Nachweisgrenze. Obwohl somit mit einem Verlust an parasitärer DNA bei Raumlagerung gerechnet werden musste, fiel der Entscheid zur Anwendung dennoch auf dieses System, da von der Möglichkeit, eine Kühlkette durchgehend führen zu können, nicht ausgegangen werden konnte. Falls verfügbar, sollten die Proben jedoch – wie geschehen – eingefroren werden.

Warum die Blutproben nach dem Auftauen in einem gelatinösen Zustand waren, ist unklar. Eine Koagulation erscheint unwahrscheinlich, da das Blut durch die Abnahme in EDTA-Monovetten® ungerinnbar gemacht wurde (s. 3.2.2). Dass die bis zu einer Stunde verlängerte Inkubationszeit (s. 3.2.5.4.1) zu einem erheblichen DNA-Verlust geführt hat, erscheint wenig wahrscheinlich, da die unter 4.2.2.2 beschriebenen Versuche keinen Abfall der Nachweisgrenze unter diesen Bedingungen zeigten. Auch wird in einem Qiagen-Protokoll zur Behandlung von koaguliertem Blut eine Inkubation über Nacht empfohlen [77].

Auf Basis der von Matovu *et al.* (2001) veröffentlichten PCR wurde unter Variation und Optimierung der Testbedingungen eine analytische Nachweisgrenze von 10 Trypanosomen/10 µl erreicht, wenn die Parasiten-DNA aus Baltz-Medium mit dem original Qiagen-Kit isoliert wurde. Sobald die DNA-Purifizierung aus Blut- oder Liquorproben mit dem modifizierten Puffersystem zur Stabilisierung der Proben bei Lagerung bei Raumtemperatur vorgenommen wurde, lag die analytische Nachweisgrenze um eine Zehnerpotenz höher (s. 4.2.2.2). Ein Grund für diesen Abfall der Nachweisgrenze könnte die Verwendung des *buffy coat* der Blutproben sein (s. 3.2.2): Obwohl hier fast 100% der Trypanosomen zu finden sind [65], beschrieben Solano *et al.* (2002) einen leichten Sensitivitätsverlust, wenn statt reinen Blutproben *buffy coat*-Proben der DNA-Purifizierung und anschließenden PCR zugeführt werden [87]. So könnte eine zu hohe Konzentration von parasitärer und humaner DNA einen höheren prozentualen Verlust an DNA während der Purifizierung nach sich ziehen oder zu einer Beeinträchtigung des PCR-Prozesses durch „Konkurrenz-DNA“ führen. Dies erklärt jedoch nicht, warum die Nachweisgrenze für PCR-Versuche mit DNA-Isolaten aus Liquor gegenüber sol-

chen aus Kulturmedium höher liegt. Denkbar ist, dass sich Hemmstoffe der PCR in Körperflüssigkeiten von HAT-Patienten nicht vollständig durch die hier angewendete DNA-Purifikationsmethode eliminieren lassen. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass das Puffersystem zur Probenlagerung bei Raumtemperatur eine schlechtere DNA-Ausbeute brachte als das Original-Kit. Dies kann hier jedoch nicht geklärt werden, da kein direkter Vergleich der beiden angewendeten Systeme untersucht wurde. Der Grund für den Sensitivitätsverlust aus den untersuchten Körperflüssigkeiten von HAT-Patienten gegenüber Kulturmedium bleibt also ungeklärt. Schwankungen der Nachweisgrenze trotz Verwendung derselben PCR-Technik sind jedoch auch zuvor beschrieben worden: So beobachteten Kanmogne *et al.* (1996) im Vergleich zu Masiga *et al.* (1992) eine Erhöhung der analytischen Nachweisgrenze um eine 10er Potenz, obwohl identisch vorgegangen wurde und an beiden Studien Mitglieder derselben Arbeitsgruppe arbeiteten [37, 58].

### 5.2.2 Rechnerische Nachweisgrenze der PCR

Um die rechnerische Nachweisgrenze der PCR für Blut und Liquor zu bestimmen, ist es nötig, die einzelnen Schritte der DNA-Konzentrierung und -Purifikation zurückzuverfolgen: Aus insgesamt 2,7 ml Vollblut wurden durch Zentrifugation 0,75 ml *buffy coat* gewonnen. Hiervon wurden 180 µl in das DNA-Purifikations-Kit eingesetzt und so DNA isoliert. Es erfolgte eine Elution in 200 µl Puffer AE, wovon 10 µl in die PCR eingesetzt wurden (s. 3.2.5.4.1).

Da es bei der Schlafkrankheit zu keinen wesentlichen Veränderungen der Leukozytenzahlen im Blut kommt und die afrikanische Population häufig niedrigere Leukozytenzahlen im Vergleich zu Europäern aufweist, kann von einer durchschnittlichen Menge von 5.000 Leukozyten/µl Blut ausgegangen werden [13]. In 2,7 ml Vollblut befanden sich dementsprechend durchschnittlich  $5 \times 10^6 \times 2,7 = 1,35 \times 10^7$  Leukozyten. Wie erwähnt enthält der *buffy coat* nahezu 100% der Trypanosomen und der Leukozyten. Daher ergab sich eine durchschnittliche Konzentration von  $1,35 \times 10^7 \times 1000/750 = 1,8 \times 10^7$  Leukozyten pro ml *buffy coat*. Nach Herstellerangaben werden bei Proben mit erhöhten Zellzahlen von über  $1,5 \times 10^7$  Leukozyten/ml ca. 60% der DNA im ersten 200-µl-Eluat wieder gefunden [76]. Bei einer analytischen Nachweisgrenze von  $10^2$  Trypanosomen/10 µl entspricht dies einem Mindestgehalt von ca. 5000 Trypanosomen/ml Vollblut der Patienten (Rechenweg s. unten).

Von den unkonzentrierten Liquorproben wurden 180 µl der DNA-Purifikation zugeführt und schließlich in 50 µl eluiert (s. 3.2.5.4.1). Da die höchste Pleozytose bei 606 Leukozyten/mm<sup>3</sup> (also 606 Leukozyten/µl =  $0,6 \times 10^6$  Leukozyten/ml) festgestellt wurde, lag die Zellzahl einer Durchschnittsprobe unter  $10^7$  Zellen/ml. Beim Einsatz einer solchen Probe in die DNA-Purifikation werden nach Herstellerangaben 86% der aufgetragenen DNA in 50 µl Eluat wiedergefunden [76].

Für aus Baltz-Medium isolierte Trypanosomen-DNA erfolgte die Elution in 200 µl, wobei 200 µl auf die Spinsäule aufgetragen wurden (s. 3.2.5.2.1). Bei einer Probe mit einem Zellgehalt von unter  $10^7$  Zellen/ml und diesem Elutionsvolumen werden nahezu 100% der aufgetragenen DNA im Eluat wiedergefunden [76]. In Tabelle 22 wird ein Überblick über die DNA-Ausbeute nach Probengut bzw. Medien in Abhängigkeit des Elutionsvolumens gegeben. Mit Hilfe dieser Angaben konnte die rechnerische Nachweisgrenze für die einzelnen Probengüter bzw. Medien bestimmt werden. Die Rechenwege und Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 22: DNA-Ausbeute nach Probengut**

| Zellzahl der Probe/ml | Beispiel  | Elutionsvolumen |        |
|-----------------------|---|-----------------|--------|
|                       |   | 50 µl           | 200 µl |
| $< 10^7$              | Liquor / Vollblut ohne Leukozytose / Baltz-Medium | 86%             | 100%   |
| $1 - 1,5 \times 10^7$ | Vollblut mit Leukozytose                          | -               | 80%    |
| $> 1,5 \times 10^7$   | Buffy coat  | -               | 60%    |

Quelle: Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits [76].

**Tabelle 23: Berechnung der PCR-Nachweisgrenzen**

|                                   | Blut (B)   | Liquor (L)  | Baltz-Medium (M)  |
|-----------------------------------|--|---|---|
| <b>N-PCR<sup>a</sup></b>          | $10^2 T.b. / 10 \mu\text{l}$<br>$= 2 \times 10^3 T.b. / 200 \mu\text{l}$   | $10^2 T.b. / 10 \mu\text{l}$<br>$= 5 \times 10^2 T.b. / 50 \mu\text{l}$   | $10 T.b. / 10 \mu\text{l}$<br>$= 2 \times 10^2 T.b. / 200 \mu\text{l}$  |
| <b>DNA-Verlust durch Elution</b>  | 40%  | 14%   | 0%  |
| <b>N-Purifikation<sup>b</sup></b> | $N\text{-PCR-B} \times \frac{100}{60} / 180 \mu\text{l}$<br>$= 2 \times 10^3 T.b. \times \frac{100}{60} / 180 \mu\text{l}$<br>$= 3,33 \times 10^3 T.b. / 180 \mu\text{l}$                  | $N\text{-PCR-L} \times \frac{100}{86} / 180 \mu\text{l}$<br>$= 5 \times 10^2 T.b. \times \frac{100}{86} / 180 \mu\text{l}$<br>$= 5 \times 10^2 T.b. \times \frac{100}{86} \times \frac{1000}{180} / \text{ml}$<br>$= 3,23 \times 10^3 T.b. / \text{ml}$ | $N\text{-PCR-M} / 200 \mu\text{l}$<br>$= 2 \times 10^2 T.b. / 200 \mu\text{l}$<br>$= 2 \times 10^2 T.b. \times \frac{1000}{200} / \text{ml}$<br>$= 10^3 T.b. / \text{ml}$ |
| <b>N-Buffy coat<sup>c</sup></b>   | $N\text{-Purifikation-(B)} \times \frac{750}{180} / 750 \mu\text{l}$<br>$= 3,33 \times 10^3 T.b. \times \frac{750}{180} / 750 \mu\text{l}$<br>$= 1,389 \times 10^4 T.b. / 750 \mu\text{l}$ |   |   |
| <b>N-Probe<sup>d</sup></b>        | $N\text{-Buffy coat-(B)} / 2,7 \text{ ml}$<br>$= 1,389 \times 10^4 T.b. / 2,7 \text{ ml}$<br>$= 5,14 \times 10^3 T.b. / \text{ml}$   | $N\text{-Purifikation-(L)} / \text{ml}$<br>$= 3,23 \times 10^3 T.b. / \text{ml}$  | $N\text{-Purifikation-(M)} / \text{ml}$<br>$= 10^3 T.b. / \text{ml}$  |

<sup>a</sup> Nachweisgrenze bezogen auf das Eluat, das in die PCR eingesetzt wurde (analytische Nachweisgrenze).

<sup>b</sup> Nachweisgrenze bezogen auf das jeweilige Medium, das der DNA-Purifikation zugeführt wurde.

<sup>c</sup> Nachweisgrenze bezogen auf den *buffy coat*.

<sup>d</sup> Nachweisgrenze bezogen auf Ursprungsprobengut (rechnerische Nachweisgrenze).

Für ein positives PCR-Ergebnis mussten sich also in einem Milliliter Vollblut mindestens 5140 Trypanosomen befunden haben. Selbst wenn im Einzelfall von einer Leukozytenzahl

zwischen 1 bis  $1,5 \times 10^7$  pro ml *buffy coat* (entsprechend Leukozytenzahlen von 2780 bis 4170/ $\mu$ l Vollblut der Patienten) ausgegangen wird, mussten für den Nachweis mittels der angewandten PCR noch 3858 Trypanosomen/ml Vollblut vorhanden sein (Rechenweg nicht gezeigt). Je Milliliter Liquor reichten hierzu 3230 Parasiten aus. Die rechnerische Nachweisgrenze der seminested-PCR der Liquorproben lag dementsprechend um eine 10er-Potenz niedriger: 323 Trypanosomen/ml Liquor. Für ein positives Ergebnis von Baltz-Medium-Proben reichte es aus, wenn sich wenigstens 1000 Trypanosomen in einem Milliliter befanden. Bei diesen Rechnungen ist zu berücksichtigen, dass die analytischen Nachweisgrenzen in Zehnerpotenzen ausgetestet und dazwischen liegende Werte nicht erfasst wurden.

### 5.2.3 Ergebnisse der PCR

#### 5.2.3.1 Ergebnisse der PCR der Blutproben

Ein Hauptproblem bei der Beurteilung von diagnostischen Methoden bei der HAT ist, dass kein „Gold-Standard“ existiert, an dem sich bereits existierende oder neu entwickelte Methoden messen ließen. Da bei serologischen Tests nicht selten falsch-positive Ergebnisse beobachtet wurden [85, 98], was somit auch in den hier eingeschlossenen Fällen (Gruppe II) nicht auszuschließen ist, ist der Vergleich zu den Direktnachweismethoden (LKP und HCT) wichtig. Wurden die Ergebnisse dieser Tests zu Grunde gelegt (Gruppe I), konnten die PCR-Ergebnisse in richtig- und falsch-positive bzw. -negative eingeteilt werden, woraus sich eine Sensitivität von 31,1% und eine Spezifität von 92,3% ergaben. Zur Untersuchung der Spezifität wurde auch eine PCR-Testung auf parasitäre DNA von *Toxoplasma gondii* durchgeführt, welche wie erwartet negativ blieb. Während die Höhe der Spezifität vergleichbar zu anderen PCR-Techniken war, in denen Werte zwischen 85,5% und 97% gefunden wurden, lag die Sensitivität gegenüber Vergleichswerten von ca. 85 bis 90% deutlich niedriger [36, 43].

Die hohe Anzahl der falsch-negativen PCR-Ergebnisse, welche zur niedrigen Sensitivität führte, ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt. Ein Hauptgrund ist sicherlich, dass die rechnerische Nachweisgrenze der PCR für Blutproben mit ca. 5000 Trypanosomen/ml deutlich unter jener der HCT lag, die mit 500 Trypanosomen/ml angegeben wird (s. 2.1.1). Da die Parasitenzahl bei der westafrikanischen HAT zwischen über 10.000 *T.b.g.*/ml und unter 100 *T.b.g.*/ml schwankt [18], erscheint es wahrscheinlich, dass sie in einigen Fällen unter der Nachweisgrenze der PCR lag. Neben der hohen Spezifität der PCR sprechen auch die Ergebnisse der seminested-PCR (s. 4.2.3.3) für diese Hypothese. Diese enorme Fluktuation der Parasitämie ist u. a. durch die Immunantwort des Wirtes und die Neigung zur Sequestration der Trypanosomen in RES-Gewebe und anderen Organen erklärbar [53, 62].

Im Gegensatz zu den oft für PCR-Techniken verwendeten repetitiven Gensequenzen liegt das TbAT1-Gen nicht in multipler Kopie im Genom von Trypanosomen vor. Dies könnte ein Grund für die hohe Zahl der falsch-negativen Ergebnisse der hier angewendeten PCR sein.

Jedoch wiesen auch selbst als sehr sensitiv publizierte PCR-Techniken falsch-negative Resultate auf: So konnten Karibi *et al.* (1999) mit einer analytischen Nachweisgrenze von 0,1 Trypanosom/10 µl in nur 15 von 18 parasitologisch bestätigten Fällen ein positives PCR Ergebnis erzielen [36]. Desquesnes (1997) wies in einer longitudinalen Studie den wellenförmigen Verlauf der Parasitämie mittels PCR nach, in der sich Perioden mit positivem an solche mit negativem PCR-Ergebnis anschlossen [23]. Auch dieser Autor beobachtete dabei also einige offensichtlich falsch-negative PCR-Ergebnisse.

Denkbar ist aber auch, dass eine Deletion des TbAT1-Genes zu einem falsch-negativen Ergebnis in der PCR führte, denn Matovu *et al.* (2001) beschrieben Fälle solcher Deletionen für angolanische Trypanosomenstämme [60]. Dokumentationsfehler – gerade seitens des nur angelernten angolanischen Personals – können natürlich nicht mit letzter Konsequenz ausgeschlossen werden (s. 5.3.2.2), so dass einzelne der als mikroskopisch positiv dokumentierten Ergebnisse tatsächlich negativ waren und die PCR somit ein richtig-negatives Ergebnis angezeigt hat. Diese Überlegung basiert allerdings auf einer sehr spekulativen Grundlage und soll nicht weiter verfolgt werden.

Bei den wenigen falsch-positiven PCR-Ergebnissen muss diskutiert werden, dass es sich entweder um wirklich falsch-positive oder um nicht erkannte richtig-positive Resultate handeln könnte: Der Umstand, dass Trypanosomen im Blut und Liquor innerhalb weniger Minuten lysieren [18], könnte dazu geführt haben, dass die Parasiten in den mikroskopischen Nachweismethoden übersehen wurden, ihre DNA jedoch noch in den Proben erhalten blieb und mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Kabiri *et al.* (1999) beschrieben diesen Fall für immerhin fünf von sechs Fällen, bei denen erst nach einem viertel bis halbem Jahr der mikroskopische Nachweis von PCR-positiven Individuen erbracht werden konnte [36]. Dies erscheint plausibel, da die Sensitivität der LKP von der WHO beispielsweise mit schwankenden Werten von 30 bis 70% angegeben wird [106]. Die Tatsache, dass gerade vor dem Bürgerkriegshintergrund keine Ringversuche oder dauerhaften Kontrollen durchgeführt wurden und es zu Referenzlaboren kaum oder keinen Kontakt gab, könnte zu einem Absinken der Sensitivität dieser Technik beigetragen haben. Ebenso könnte die Notwendigkeit, angelernten Hilfskräften schwierige diagnostische Aufgaben anzuvertrauen, einen gewissen Qualitätsverlust begünstigt haben. Über das Zutreffen dieser Hypothesen kann hier jedoch nur gemutmaßt werden. Wiederum sind falsch dokumentierte Laborergebnisse als Grund für als „falsch-positiv“ eingestufte PCR-Ergebnisse nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen.

Einem echten falsch-positiven PCR-Resultat könnte eine Kontamination der Proben bei der DNA-Aufarbeitung zu Grunde liegen. Dies erscheint jedoch extrem unwahrscheinlich, zumal Positiv- und Negativkontrollen systematisch mitgeführt wurden und die Ergebnisse zu 100% reproduzierbar waren. Dass es zu einer Kontamination vor der DNA-Aufarbeitung der Proben gekommen ist, ist ebenfalls nicht anzunehmen, zumal eine große Menge an Parasiten hätte

übertragen werden müssen. Falsch-positive PCR-Ergebnisse von Individuen, die in endemischen HAT-Regionen leben, sind bereits 2002 von Solano *et al.* beschrieben worden [87]. Eine „Kreuzreaktion“ mit apathogenen Trypanosomen wäre eine mögliche Erklärung hierfür. Nach wie vor stellt die Gruppe der Patienten mit rein serologischer Diagnose (Gruppe II) ein großes Problem dar: Die einfache CATT-Testung birgt viele falsch-positive Resultate und selbst unter Verwendung von 1:8-verdünntem Blut werden mit dieser Methode noch einige falsch-positive Fälle erfasst, da sie nicht zwischen akuter und abgelaufener Infektion unterscheidet [85]. Die hohe Anzahl der „falsch-negativen“ PCR-Ergebnisse der Blutproben dieser Gruppe passt ins Bild der bisherigen Forschungsergebnisse: Dass in der vorliegenden Arbeit lediglich 5,9% der Patienten mit serologisch gestellter Diagnose ein positives Resultat in der PCR aufwiesen, stimmt weitgehend mit den Funden von Karibi *et al.* (1999) (1 von 36 = 2,8%) und Kyambadde *et al.* (2000) (0 von 13) überein [36, 43]. Einschränkend muss erwähnt werden, dass diese Autoren nur Blut von Individuen untersuchten, welche lediglich im einfachen CATT positiv waren. Das positive PCR-Ergebnis bei diesen drei Fällen kann als weiterer Hinweis, darf jedoch – wie oben beschrieben – nicht als Beweis für das Vorliegen der Infektion angesehen werden. Das negative PCR-Resultat der übrigen 48 Patienten der Gruppe II könnte durch die gleichen Mechanismen wie die der oben beschriebenen „falsch-negativen“ Testergebnisse zustande gekommen oder durch den Umstand bedingt sein, dass diese Individuen falsch-positiv diagnostiziert wurden: So wurde bei insgesamt 27 dieser Patienten die Diagnose durch einen CATT-Titer von genau 1:8 gestellt, ohne dass Trypanosomen in irgendeinem Kompartiment nachgewiesen wurden. Gerade von solchen Konstellationen ist bekannt, dass es sich in etlichen Fällen nicht um echte HAT-Patienten handelt [85]. Über das Zutreffen dieser Hypothese in den hier vorliegenden Versuchen kann jedoch wiederum nur spekuliert werden. Es ist anzunehmen, dass die Parasitämie zumindest einiger dieser Individuen unter der rechnerischen Nachweisgrenze der PCR lag und auch zu niedrig für die mikroskopische Diagnostik war.

Dass die PCR-Ergebnisse der Blutproben einen signifikanten Zusammenhang mit den Resultaten der LKP, jedoch nicht mit denen der HCT aufwiesen, erscheint auf den ersten Blick erstaunlich, da per LKP Trypanosomen aus einem anderen Kompartiment (Lymphe) und per HCT Parasiten aus dem gleichen Kompartiment (Blut) wie per PCR nachgewiesen wurden. Bei der Interpretation dieses vordergründig nicht bestehenden Zusammenhanges mit den Resultaten der HCT muss allerdings die Reihenfolge der Diagnostik (s. 2.2) beachtet werden: Es wurde keine HCT durchgeführt, sobald mittels LKP Trypanosomen und damit die Infektion nachgewiesen wurde. So ist denkbar, dass auch einige dieser Patienten ein positives HCT-Resultat aufgewiesen hätten, wären sie darauf untersucht worden. Einen Zusammenhang zwischen HCT und PCR wurde von Kyambadde *et al.* (2000) und von Desquesnes (1997) beschrieben, während Kanmogne *et al.* (1996) dies nicht feststellen konnten [23, 37,



43]. Die Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen diesen beiden Methoden war aufgrund fehlender Daten hier nicht möglich, daher kann der Zusammenhang der zusammengefassten Ergebnisse von LKP und HCT mit den Resultaten der PCR der Blutproben nur als Hinweis darauf verstanden werden. Die hohe Fallzahl von Patienten mit negativem Ergebnis in allen drei Diagnostikmethoden kann einerseits auf die allgemein niedrige Parasitämie bei diesen Kranken hindeuten, zeigt auf der anderen Seite aber auch klar, dass diese PCR keine wesentliche Bereicherung in der Frage des Parasitennachweises darstellt.

Der Zusammenhang von positivem PCR-Nachweis trypanosomaler DNA und Zugehörigkeit zum Stadium II und die Tatsache, dass Blutproben von Patienten mit hoher Pleozytose eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, in der PCR positiv zu sein, sind bemerkenswerte Funde, denn bisher wurde angenommen, dass mit dem Fortschreiten der Krankheit die Trypanosomen an Zahl im Blut abnehmen [13]. Da jedoch die Nachweisgrenze der PCR für alle Blutproben gleich war, geben die vorliegenden Ergebnisse Hinweise darauf, dass Patienten im fortgeschrittenen Stadium durchaus eine höhere Parasitenlast im Blut haben könnten (und somit ein positives Resultat in der PCR aufweisen, da bei ihnen die Parasitämie über der Nachweisgrenze liegt) als jene im Stadium I. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache gestützt, dass bei vier der fünf Patienten, welche mehr als 100 Leukozyten/mm<sup>3</sup> im Liquor hatten und deren Blutproben in der PCR negativ waren, ein direkter Parasitennachweis per LKP oder HCT erbracht wurde. Eine mögliche Erklärung könnten immunsuppressive Mechanismen sein, welche den Trypanosomen längere Überlebenszeiten und bessere Vermehrungschancen im Blut ermöglichen. Gegen diese Erklärungsmöglichkeit spricht allerdings die im Durchschnitt erhöhte Pleozytose dieser Patienten gegenüber solchen mit negativen PCR-Resultaten. Dieser Umstand deutet vielmehr darauf hin, dass die PCR-positiven Blutproben von Patienten mit einer massiven (ZNS-)Infektion stammten, die auch zu einer frühzeitigen Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke geführt haben könnte. Unabhängig von der Ursache liegt ein Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Krankheit und einer Zunahme der Parasitenlast im Blut nahe. Hier ergibt sich somit möglicherweise eine Fragestellung für Folgeuntersuchungen.

### 5.2.3.2 Ergebnisse der PCR der Liquorproben

Auch diese Versuche zeichneten sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit (98,1%) aus. Der Inkonsistenz des Ergebnisses der einen Liquorprobe lag am ehesten ein einmaliger Pipetierfehler zu Grunde, zumal durch die kontinuierliche Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen systematische Fehlbestimmungen ausgeschlossen wurden und jene Probe in beiden Folgeuntersuchungen ein konsistentes (positives) Ergebnis zeigte, welches ebenfalls konsistent zum positiven Parasitennachweis in der Liquor-Mikroskopie war.

Die hohe Anzahl der falsch-negativen Resultate ist wie in 5.2.3.1 erläutert wahrscheinlich multifaktoriell bedingt, wobei die geringe analytische Nachweisgrenze jedoch die größte Rolle spielen dürfte. Die mit 97,6% sehr hohe Spezifität, die Ergebnisse der seminested-PCR (s. 4.2.3.3) und die Tatsache, dass alle vier PCR-positiven Liquorproben von Patienten stammten, deren Blutproben ebenfalls PCR-positiv waren, sprechen für diese Hypothese. Bereits Matovu *et al.* (2001) äußerten den Verdacht, dass die von ihnen durchgeführte PCR für die geringe Parasitenlast im Liquor eine zu hohe Nachweisgrenze aufwies [60]. Und auch in der übrigen Literatur finden sich Hinweise für diese Annahme: So erzielten sowohl Kyambadde *et al.* (2000), als auch Truc *et al.* (1999) mehr positive PCR-Ergebnisse aus Liquorproben von HAT-Patienten des Stadiums II als per Doppelzentrifugation und Mikroskopie Trypanosomen entdeckt werden konnten [43, 93]. Beide Autorengruppen wendeten jedoch die von Moser *et al.* (1989) [64] beschriebene PCR an, welche wie erwähnt als schwer reproduzierbar beschrieben wurde und zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Dass die PCR der Liquorproben ein negatives Resultat erbrachte, könnte jedoch in manchen Fällen daran gelegen haben, dass immerhin 18 Patienten ebenfalls ein negatives Resultat in der Liquor-Mikroskopie und eine Pleozytose von unter 20 Leukozyten/mm<sup>3</sup> aufwiesen (elf Patienten hatten weniger als 10 Zellen/mm<sup>3</sup> Liquor). Von diesen Konstellationen ist bekannt, dass nicht immer ein echtes Stadium II vorliegen muss [48].

Vor dem Hintergrund der sehr geringen Sensitivität von 21,4% erscheint abermals die durchschnittlich relativ hohe Pleozytose der PCR-positiven im Vergleich zu den PCR-negativen Liquorproben auffällig. Während Cattand *et al.* (1988) keinen Zusammenhang zwischen Pleozytose und der Existenz von Trypanosomen im Liquor feststellten [17], beschrieben Pépin & Milord (1991), dass Trypanosomen öfter im Liquor von Patienten gefunden werden, die über 100 Leukozyten/mm<sup>3</sup> im Liquor haben [72]. Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten zwar ebenfalls auf diesen Zusammenhang hin, aufgrund der geringen Fallzahlen ist jedoch auch eine zufällige Streuung möglich.

### 5.2.4 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der PCR und Ausblick

Bisherige PCR-Techniken für die Diagnose der HAT wiesen eine hohe Sensitivität auf, beinhalteten aber teilweise Probleme bei der Reproduzierbarkeit und dem Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen. Die hier angewendete PCR-Technik erwies sich als reproduzierbar und als äußerst spezifisch, zeigte jedoch eine sehr geringe Sensitivität. Im Vergleich mit den herkömmlichen parasitologischen Nachweistechiken ist sie insgesamt für Routinediagnostische Zwecke unterlegen. Eine Steigerung der Sensitivität ist zwar durch die Anwendung der seminested-PCR-Technik möglich. Diese Methode ist allerdings recht aufwendig und anfällig für Kontaminationen und Fehlbestimmungen.

Für zukünftige PCR-Studien in den Ländern des Südens ist das Problem der Probenkühlung nicht gelöst: Die Verwendung des speziellen Puffers AS1 zur Probenlagerung bei Raumtemperatur könnte zu einer Verschlechterung der analytischen Nachweisgrenze beigetragen haben. Als Standardmethode zur Probenkonservierung, falls vor Ort nicht auf Kühlmöglichkeiten zurückgegriffen werden kann, erscheint sie nicht optimal. Wünschenswert wäre die Entwicklung eines Stabilisators für solche Bedingungen, der keinen Verlust von DNA-Material nach sich zieht.

Ein Vorteil der PCR ist die Objektivität der Methode. Die Mikroskopie hingegen ist nicht zuletzt von Trainingsgrad, der Tagesform und der Motivation abhängig. Resümierend bleibt aber festzustellen, dass keine angewendete PCR bisher befriedigende Ergebnisse in der Felddiagnostik zeigte. Um Einzug in das Repertoire der Routine-Diagnostik zu erhalten, müsste die Sensitivität einer neuen PCR im Vergleich zu der hier angewendeten Methode deutlich erhöht werden (analytische Nachweisgrenze von 1 Trypanosomen/10 µl oder niedriger), dabei jedoch die Reproduzierbarkeit gewährleistet bleiben. Neue Ansätze hierzu könnte eine kürzlich entwickelte Trypanosomen-spezifische Primersequenz liefern [78]. Wie die Ergebnisse der beiden in dieser Arbeit verwendeten PCR-Methoden jedoch auch zeigen, ist ihre Standardisierbarkeit und somit auch ihre Übertragbarkeit auf die Länder des Südens problematisch.

Auch bleibt einer der zentralen Problemaspekte bei der Bekämpfung der HAT weiterhin bestehen: Die Fälle serologisch positiver, aber aparasitärer Personen werden auch in Zukunft nicht nur unter diagnostischen Gesichtspunkten, sondern auch unter ethischen Aspekten beim Festlegen der Entscheidungsgrenze für die Behandlung eine komplexe Herausforderung darstellen. Eine Verbesserung der diagnostischen Methoden ist also weiterhin dringend erforderlich, da auch der Nachweis des TbAT1-Genes mittels PCR für die Routine-Diagnose HAT keine wesentliche Verbesserung darstellt und speziellen Fragestellungen (wie Resistenzbestimmungen auf Melarsoprol) vorbehalten werden sollte.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt ein Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Krankheit und einer Zunahme der Parasitenlast im Blut nahe. Hier ergibt sich somit eine Fragestellung für Folgeuntersuchungen, welche z.B. mittels einer erst kürzlich veröffentlichten sensitiven *real-time* PCR beantwortet werden könnte [6].

## 5.3 Diskussion der IFT-Versuche und der klinischen Untersuchung

### 5.3.1 Methodik und Vorversuche des IFT

Der IFT wurde im Wesentlichen nach der von Wery *et al.* (1970) beschriebenen und von Frezil *et al.* (1974) modifizierten Methode durchgeführt [30, 102]. Die Fixierung der mit Trypanosomen beschichteten Objektträger mit Methanol wurde bereits erfolgreich von Weitz (1963) angewendet [99]. Durch das Einfrieren der so beschichteten Objektträger wurde die Haltbarkeit für die Immunfluoreszenz ohne Verlust der Antigenität bis zu einem Jahr gewährleistet [38]. Die Serumverdünnungen wurden mit einer 1:20-Verdünnung begonnen, wie es bereits in mehreren Studien zum Nachweis von polyvalenten und spezifischen Antikörpern bei der HAT zur Anwendung kam [29, 30, 67, 102]. Wie von den meisten Autoren empfohlen, erfolgte die Betrachtung innerhalb von 24 Stunden. Dank der freundlichen Bereitstellung eines Referenz-Serums durch das BNI konnte in einer Schachbrett-Titration nicht nur die geeignete Menge und Verdünnung des Konjugats bestimmt werden. Bei der Bestimmung der angegebenen IgG-Titerhöhe zeigte sich auch die hier angewendete Endpunkt-Titerlesung als geeignet. Da in dieser Studie keine Vergleichstestungen an nicht-HAT-Patienten vorgenommen wurden, kann über die Spezifität der hier festgestellten Titer keine eindeutige Aussage getroffen werden. Mit dem IFT wurde jedoch eine Methode zur Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter aus Serum gewählt, welche sich durch eine hohe Sensitivität (82 - 94,7%) und Spezifität (83 - 100%) auszeichnet [29, 39, 67].

Der wegen der ungewissen Energieversorgung in Angola durchgeführte Versuch zur Probenstabilisierung mittels Chloroformzugabe zeigte während der Lagerung bei Raumtemperatur über 30 Tage einen Abfall um eine Titerstufe. Dieses Vorgehen schien somit eine praktikable Methode für die Anwendung in Angola zu sein. Falls verfügbar, sollten jedoch die Patientenproben vor Ort – wie geschehen – gekühlt oder eingefroren werden, um ein bestmögliches Ergebnis zu erreichen.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Titer könnten die Summe der „echten“ Trypanosomen-spezifischen Antikörper darstellen. Es könnte aber auch durch mindestens drei verschiedene Mechanismen zu einer falsch-hohen Titerlesung gekommen sein:

1. Die enge antigenetische Beziehung zwischen einzelnen Trypanosoma spp. wird ausführlich beschrieben [21, 80, 102, 103]. In der Konsequenz finden sich wiederholt Hinweise und Vermutungen, dass z.B. mehrmalige Inokulationen von nicht humanpathogenen Trypanosomen zu Kreuzreaktionen (DXSR) führen können, welche das Resultat von Immun-Essays beeinflussen [29, 39, 67]. Diese Hypothese erscheint insofern äußerst plausibel, da in der vorliegenden Arbeit *T.b.b.* als Antigen benutzt wurde. Auch die mit 26% bis 39% hohe Prävalenz von Trypanosomen-spezifischen Antikörpern bei gesunden Individuen aus endemischen und nicht endemischen Gebieten passt in dieses Bild [3, 41].

2. Gleichzeitig bestehende Infektionen mit anderen Erregern wie z.B. Filarien, welche zu Kreuzreaktionen (DXSR) in der Immunodiagnose führen können [67, 80], können nicht ausgeschlossen werden.
3. Da Einfrier- und Auftauprozesse Aggregate von Makroglobulinen generieren können [45], insgesamt eine hohe Prävalenz von Immunkomplexen in der Afrikanischen Bevölkerung vorherrscht [34, 46] und Immunkomplexe insbesondere auch bei HAT-Patienten entstehen [44], sind auch nicht spezifische Reaktionen (NSR) beim IFT denkbar.

Das Auftreten von ungewünschten spezifischen Reaktionen (UDSR) in den hier durchgeführten Versuchen kann aufgrund der Absorption von Rheumafaktoren hingegen ausgeschlossen werden. Auch dass Trypanosomen-spezifische AK aus vorangegangenen Infektionen, welche bis zu drei Jahre nach Heilung im Blut verbleiben können [70], zu falsch-hohen Titern geführt haben, kann in der vorliegenden Arbeit mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da kein Studienteilnehmer in den letzten drei Jahren wegen einer HAT-Infektion behandelt wurde.

Andererseits kann die tatsächliche Höhe der spezifischen Antikörper durch ein technisches Problem aber auch zu tief bestimmt worden sein: Obwohl die Verwendung von *T.b.b.* gegenüber der von *T.b.g.* sich im IFT nicht in Spezifität oder Sensitivität unterscheidet (s. 2.1.3), kann nicht mit letzter Konsequenz angenommen werden, dass alle AK, die von *T.b.g.*-infizierten Patienten induziert wurden, antigenetische Affinität auf die verwendeten *T.b.b.* zeigten. Falls die benutzten *T.b.b.* nicht zumindest antigenetisch ähnliche VSG ausbildeten wie die *T.b.g.*, welche zur Infektion des einzelnen Patienten führten, so könnte dies eine falsch-negative Reaktion bzw. einen zu niedrig bestimmten Titer im IFT nach sich ziehen. Schließlich ist die VSG-Variation der Mechanismus, mit dem sich eine Trypanosomen-Population der Immunantwort der Patienten entzieht. Bereits mehrere Autoren äußerten die Vermutung, dass nur eine Fraktion der präsenten Immunglobuline gegen die jeweils benutzten Antigene gerichtet seien [41, 44, 49]. Es ist also denkbar, dass sowohl für einzelne Patienten als auch für die Gesamtheit des Studienkollektives nicht die wirkliche Gesamtheit der HAT-spezifischen AK erfasst wurde.

### 5.3.2 Ergebnisse des IFT und der klinischen Untersuchung

#### 5.3.2.1 Ergebnisse des IFT mit Serum

Die durchschnittlichen Titer der spezifischen Immunglobuline wurden im Vergleich zu bisherigen IFT-Versuchen etwas höher bestimmt (s. Tabelle 24). Diese Unterschiede könnten Ausdruck einer anderen Endpunktlese sein. Die Tatsache, dass die Größenverhältnisse (Titer von IgG > IgM > IgA) mit den bisher in der Literatur publizierten übereinstimmen [41, 49], stützt diese Vermutung.

**Tabelle 24: Vergleich von Serum-Titern spezifischer AK zur Literatur**

| <i>Antikörper<br/>im Serum</i> <sup>a</sup> | <i>Vorliegende<br/>Arbeit</i> | <i>Knobloch et al.<br/>(1984) [41]</i> | <i>Felgner et al.<br/>(1981) [29]</i> | <i>Lejon et al.<br/>(1998) [49]</i> |
|---|-------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Polyvalenter Titer                          | n. d. <sup>b</sup>            | n. d. <sup>b</sup>                     | 160 (< 20 - 1280)                     | n. d. <sup>b</sup>                  |
| IgG   | 320 (20 - 2560)               | 160 (20 - 640)                         | n. d. <sup>b</sup>                    | 44 (24,8 - 86,4) <sup>c</sup>       |
| IgM   | 160 (< 20 - 640)              | 20 (< 5 - 20)                          | n. d. <sup>b</sup>                    | 11 (4,01 - 34,6) <sup>c</sup>       |
| IgA   | < 20 (< 20 - 80)              | n. d. <sup>b</sup>                     | n. d. <sup>b</sup>                    | 3,3 (1,58– 9,99) <sup>c</sup>       |

<sup>a</sup> Angaben in Medianen der reziproken Titer im IFT (Minimum - Maximum).

<sup>b</sup> n. d.: Nicht durchgeführt.

<sup>c</sup> Angaben in g/l im ELISA.

Dass sich bei weniger als 30% der Patienten ein IgA-Serumspiegel von  $\geq 1:20$  finden ließ, ist dadurch erklärbar, dass die HAT zumindest nicht zum überwiegenden Teil eine Pathologie der Schleimhäute ist, wo die Konzentration von IgA am größten ist. Auch die geringen maximalen IgA-Titer passen in dieses Bild.

Obwohl die Studienteilnehmer im Durchschnitt hohe Serumspiegel an spezifischem IgM zeigten, konnte dennoch in drei Fällen (3,1%) kein Titer dieses Immunglobulins von  $\geq 1:20$  nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde auch schon von Knobloch *et al.* (1984) beschrieben [41]. In einigen anderen Studien lag sogar der Titer für polyvalentes Konjugat einiger HAT-Patienten unter der jeweiligen Testgrenze [29, 67, 80, 103]. Für die hier beschriebenen Fälle sind drei Erklärungsmöglichkeiten denkbar:

1. Die drei Patienten haben wirklich Trypanosomen-spezifische IgM-Titer von unter 1:20. Dies wäre nur in einem extrem frühen Stadium der Infektion nicht pathologisch. Dass jedoch zumindest einer von ihnen dem Stadium II zugeordnet war und der Zeitpunkt zwischen Infektionszeitpunkt und Diagnosestellung nicht zuletzt aufgrund der lokalen Infrastruktur oft mehrere Wochen dauert, spricht eher für eine nicht adäquate Immunantwort der Patienten. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache gestützt, dass bei den erwähnten drei Kranken im Vergleich zum Studienkollektiv mit IgG-Titern von  $\leq 1:80$  eher geringe Konzentrationen dieses Immunglobulins gemessen wurden. Eine Rolle könnte hierbei die im Laufe der Krankheit einsetzende Immunsuppression spielen [89].
2. Die Patienten zeigten in Wirklichkeit eine adäquate Immunantwort, die tatsächliche Höhe ihrer spezifischen Antikörper wurde aber durch das in 5.3.1 beschriebene technische Problem zu tief bestimmt.
3. Bei den Patienten lag keine aktuelle Infektion mit *T.b.g.* vor, sondern es kam zu vorhergehendem Kontakt mit Trypanosomen. Dieser Kontakt führte mittels DXSR zur Induktion von IgG und einem falsch-positiven Ergebnis in der CATT-Titration. Für diese Hypothese spricht, dass bei keinem von den drei Patienten ein Parasitennachweis gelang und keine HAT in der Anamnese dieser Patienten erhoben werden konnte.

Die von Kegels *et al.* (1992) beobachtete Auswirkung steigenden Alters auf die Seropositivität [39] konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden (s. 4.3.2.1). Es ist jedoch denkbar, dass die Serumspiegel der spezifischen Antikörper durch eine längere Krankheitsdauer und der damit verbundenen kontinuierlichen Exposition von sich ständig ändernden Antigenen bedingt sind. Dass spezifisches IgG die höchsten Serum-Titer aller bestimmten Immunglobuline aufwies, passt in dieses Bild. Letztlich wird die Hypothese einer Akkumulation von AK gegen verschiedene VAT auch durch den Zusammenhang zwischen der mittleren Titerhöhe der Immunglobuline IgG, IgM und IgA im Serum und der Stadienzugehörigkeit der Patienten gestützt (s. 4.3.2.1). Da für diese Arbeit keine genauen Angaben über die Dauer der Krankheit bis zur Diagnosestellung vorlagen, war die Stadienzugehörigkeit das einzige Kriterium für die Infektionsdauer. Somit scheint ein Zusammenhang zwischen Dauer der Infektion und Seropositivität der Patienten wahrscheinlich.

Für die Tatsache, dass Patienten mit direktem Parasitennachweis (Gruppe I) gegenüber solchen mit serologischer Diagnose (Gruppe II) einen erhöhten Serumspiegel an spezifischem IgM aufweisen, kommen mehrere Erklärungen in Betracht:

1. Bei den Patienten der Gruppe I liegt eine gesteigerte Immunantwort vor, welche durch eine erhöhte Parasitenlast ausgelöst wird. Umgekehrt könnte aber erwartet werden, dass eine massive Immunantwort auch zu einer Reduzierung der Parasitenlast führt bzw. bei Patienten mit einer hohen Parasitämie offensichtlich keine ausreichende Immunantwort stattgefunden hat. Diese Überlegungen sind also widersprüchlich zueinander und werfen Fragen für Folgeuntersuchungen auf.
2. Die Immunantworten beider Patientengruppen sind gleich. Der hier vorliegende Unterschied wäre somit durch falsch-positive serologisch gestellte Diagnosen im CATT erklärbar. Durch einen der in 5.3.1 genannten Mechanismen kam es anschließend auch zu einem falsch-positiven Ergebnis im IFT, wobei der falsch-positive Titer jedoch niedriger ausfiel als der von Patienten mit echten HAT-Infektionen.

Dass dieser Zusammenhang nicht mit spezifischen Serum-Immunglobulinen der Klasse G und A bestand, ist insofern plausibel, da zumindest IgG nicht direkt an der Elimination der Trypanosomen aus dem Blut beteiligt zu sein scheint [96].

### 5.3.2.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchung unter Bezugnahme auf die Ergebnisse des IFT der Serumproben

Bei der Bewertung der klinischen Untersuchung ist zu beachten, dass die Symptome der HAT extrem unspezifisch sind und die meisten der hier aufgeführten klinischen Zeichen auch anderen Krankheiten zu Grunde liegen könnten [11, 25] oder es sogar zu einer HAT-ähnlichen Klinik im Sinne eines benignen febrilen und selbstheilenden Verlaufs trotz alleiniger „Infektion“ mit „apathogenen“ Trypanosomen kommen kann [10]. Besonders vor diesem Hintergrund ist die Interpretation der Ergebnisse in sofern generell einzuschränken, dass kein Vergleichskollektiv untersucht wurde.

In Tabelle 25 wird ein Vergleich von klinischen Parametern der vorliegenden Arbeit zu zwei Studien gezeigt, welche die Klinik von 500 aus Angola [14] bzw. über 2500 aus mehreren afrikanischen Ländern [11] stammenden Stadium-II-Patienten beschreiben.

**Tabelle 25: Vergleich klinischer Untersuchungsergebnisse zur Literatur**

| <i>Klinischer Parameter</i>          | <i>Vorliegende Arbeit</i> | <i>Burri et al. (2000) [14]</i> | <i>Blum et al. (2006) [11] <sup>e</sup></i> |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|
| Posterior zervikale Lymphadenopathie | 60,7%                     | 85%                             | 56,1% (34 - 85%)                            |
| Inguinale Lymphadenopathie           | 65,9%                     | k. A. <sup>d</sup>              | k. A. <sup>d</sup>                          |
| Splenomegalie                        | 30,7% <sup>a</sup>        | 5%                              | 42,5% (14 - 80%)                            |
| Hepatomegalie                        | 17% <sup>b</sup>          | 7%                              | 25,5% (1 - 70%)                             |
| Fieber (Temp. > 37,5 °C)             | 3,4%                      | 9,4%                            | 16,1% (9,4 - 38%)                           |
| Untergewicht                         | 56,8%                     | k. A. <sup>d</sup>              | 25,2% (k. A. <sup>d</sup> - 71%)            |
| Bauchschmerz                         | 21,3%                     | k. A. <sup>d</sup>              | k. A. <sup>d</sup>                          |
| Syst. RR-Abfall nach Aufstehen       | 50,7%                     | k. A. <sup>d</sup>              | k. A. <sup>d</sup>                          |
| Syst. RR-Abfall > 10% nach Aufstehen | 32,9%                     |                                 |   |
| Tachykardie                          | 3,4%                      |                                 |   |
| Bradykardie                          | 6,8%                      | k. A. <sup>d</sup>              | k. A. <sup>d</sup>                          |
| Pulsanstieg nach dem Aufstehen > 30% | 26,2%                     |                                 |   |
| Puls-Pathologie insgesamt            | 35,7%                     |                                 |   |
| Gehen ohne Hilfe nicht möglich       | ≥ 4,6% <sup>c</sup>       | 1,2%                            | k. A. <sup>d</sup>                          |
| Pathologischer Gang                  | ≥ 11,5% <sup>c</sup>      | k. A. <sup>d</sup>              | 21,7% (18 - 50%) <sup>f</sup>               |
| Pathologischer STZG                  | 9,2%                      | k. A. <sup>d</sup>              | k. A. <sup>d</sup>                          |

<sup>a</sup> Palpierbarkeit des Organs unter dem linken Rippenbogen in der linken Medioklavikularlinie.

<sup>b</sup> Palpierbarkeit des Organs ≥ 2cm unter dem rechten Rippenbogen in der rechten Medioklavikularlinie.

<sup>c</sup> soweit Untersuchung bei Patienten durchführbar, daher Angabe mit „≥“ (mindestens).

<sup>d</sup> k. A.: Keine Angabe.

<sup>e</sup> Angaben in Prozent der Studiendaten (niedrigste und höchste Inzidenz in der Literatur nach Blum *et al.* (2006) [11]).

<sup>f</sup> *walking difficulties*; keine genaue Spezifizierung der einzelnen Untersuchungen.

Die Differenzen der Ergebnisse spiegeln die große interindividuelle Unterschiedlichkeit des klinischen Bildes bei der Schlafkrankheit wider, können jedoch auch durch den subjektiven Charakter mancher Untersuchungen bedingt sein. Auch Blum *et al.* (2006) beschrieben, dass in ihrer multizentrischen und internationalen Studie besonders die subjektiven Daten einer hohen Variabilität unterlagen [11].



So wurde in der hier vorliegenden Arbeit zwar die gängige bimanuelle Technik der Leberpalpation angewendet. Diese Methode ist jedoch keineswegs spezifisch und neben der großen subjektiven Komponente in der Beurteilung ist auch der Zusammenhang zwischen Palpierbarkeit des Organs und dem Vorliegen einer Hepatomegalie nur sehr gering [66]. Eine genaue Messung der Lebergröße erfolgte nicht, da bildgebende Verfahren wie die Sonographie oder die Szintigraphie nicht zu Verfügung standen. Da selbst die perkutorische Abschätzung des Leberoberrandes nur sehr ungenaue Ergebnisse über die Leberspannweite liefert, kann aus der alleinigen Palpation nur sehr vage ein Rückschluss auf die tatsächliche Lebergröße gezogen werden [66]. Für die Palpation der Milz gilt Ähnliches. Insgesamt lag die hier abgeschätzte Prävalenz der Organomegalie von Leber und Milz aber im mittleren Bereich der Angaben der Referenzliteratur. Ein Zusammenhang der Vergrößerung beider Organe mit der mittleren Titerhöhe der spezifischen AK bestand in dieser Arbeit nicht, kann jedoch aufgrund der bisherigen Ausführungen nicht ausgeschlossen werden.

Untersucherabhängige Unterschiede in der Beurteilung klinischer Parameter werden auch in Bezug auf die Feststellung von Lymphadenopathien deutlich: Bei neun Patienten, bei denen vom angolanischen Personal Lymphadenopathien in der (posterioren u/o anterioren) zervikalen Region verzeichnet worden waren, konnten in der klinischen Untersuchung dieser Studie keine Lymphknotenschwellungen entdeckt werden; in 27 Fällen war es umgekehrt. Diese Diskrepanz lässt sich im letzteren Fall durch eine adäquatere Untersuchungstechnik (ausführliche, bimanuelle Palpation von dorsal) des Autors gegenüber der Methode des angeleiteten Hilfspersonals (kurzer, einhändiger Griff von vorne an den seitlichen Hals) erklären. Im ersten Fall kann hingegen von Dokumentationsfehlern ausgegangen werden, zumal acht dieser neun Fälle im Studienort Negage auftraten, in dem während der Studiendauer zweimal derartige Dokumentationsfehler beobachtet und korrigiert wurden. Von der WHO wird zu Recht darauf hingewiesen, dass diese Untersuchung enorm vom Ausbildungsstand und der Motivation des Untersuchers abhängt [106].

Wiederum lag die Prävalenz der posterior zervikalen Lymphadenopathie der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Angaben in der Literatur im mittleren Bereich. Stadium-II-Patienten wiesen generell einen höheren Anteil von Lymphadenopathien auf als Stadium-I-Patienten. Dass Stadium-II-Patienten allerdings gerade signifikant mehr posterior zervikale LK-Vergrößerungen zeigten, ist insofern bemerkenswert, da dieses Symptom als typisches Frühzeichen der Erkrankung angesehen wird. Gleichfalls lag auch der Mittelwert der Pleozytose der Kranken mit posterior zervikaler Lymphadenopathien signifikant höher als derjenige der Erkrankten ohne solche LK-Schwellungen. Ob eine zunehmende Pleozytose ein Marker für den zeitlichen Krankheitsfortschritt ist, ist nicht bekannt. Da aber anzunehmen ist, dass die durchschnittliche Krankheitsdauer der Patienten im Stadium II länger ist als diejenige der Stadium-I-Patienten, können die genannten Unterschiede als Hinweis darauf gedeutet wer-

den, dass es mit zunehmender Krankheitsdauer häufiger zur Entwicklung von posterior zervikalen Lymphadenopathien kommt. Auch Burri *et al.* (2000) wiesen eine hohe Anzahl von Lymphadenopathien bei Stadium-II-Patienten nach (s. Tabelle 25), ausführliche Vergleichsdaten zu Stadium-I-Patienten werden leider nicht beschrieben. Die eben genannte Hypothese erscheint besonders dann plausibel, wenn das Stadium II nicht als Stadium mit vornehmlicher ZNS-Inflammation, sondern als Generalisierung der Erkrankung mit zusätzlicher ZNS-Beteiligung angesehen wird. Bezogen auf die einzelnen Patienten hieße dies, dass das Vorliegen des Winterbottom-Zeichens möglicherweise als Risikofaktor für eine bereits fortgeschrittene Krankheit bzw. das Vorliegen des Stadiums II angesehen werden kann. Ein Zusammenhang dieses Symptoms mit der Höhe der spezifischen Immunglobuline im Serum konnte nicht gefunden werden.

Die häufigste Lokalisation von Lymphadenopathien in der vorliegenden Arbeit, die inguinale Region (65,9%), wird zwar nicht als pathognomonisch für die HAT angesehen und kann auch durch andere (insbesondere Geschlechts-) Krankheiten hervorgerufen werden, weswegen ihre differentialdiagnostische Aussagekraft eher gering ist. Andererseits kann die Lokalisation der Lymphknotenschwellung aber auch durch den Ort der Einstichstelle und der sich davon ableitenden Lymphwege abhängen. So könnten Lymphadenopathien dieser Region ebenfalls als Hinweise auf das Vorliegen der HAT verstanden werden und den Erregernachweis mittels LKP ermöglichen. Diese Hypothesen sind in ihrer Aussagekraft jedoch abermals insofern einzuschränken, als dass kein Vergleichskollektiv von nicht HAT-Probanden untersucht wurde.

Die Angabe von Bauchschmerzen besitzt einen sehr subjektiven Charakter und ist nicht spezifisch für die HAT: Das Auftreten dieses Symptoms ist ebenfalls bei anderen (Infektions-) Krankheiten wie bei der Malaria beschrieben [84], kann aber möglicherweise auch auf die Schlafkrankheit hindeuten. Ein Zusammenhang der Höhe der spezifischen Antikörperspiegel im Serum scheint jedoch weder mit diesem Parameter noch mit dem Auftreten von Fieber zu bestehen. Dass Fieber bei dieser allgemein hin als „fieberhaft“ bekannten Krankheit in der überwiegenden Mehrheit der Fälle fehlte, deutet erneut auf die hohe Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes hin.

Das Absinken des systolischen Blutdruckes nach dem Aufstehen einiger HAT-Patienten ist bemerkenswert, weil der systolische Blutdruck beim Aufstehen normalerweise nicht abfällt [15]. Da bei der vorliegenden Arbeit jedoch keine Folgezeitmessungen (wie z.B. beim Schellong-Test) und keine Untersuchungen an einem Vergleichskollektiv durchgeführt wurden, können die hier bestimmten Werte nur Hinweise auf Kreislaufregulationsstörungen geben. Ein Abfall des systolischen Blutdruckes nach dem Aufstehen um mehr als 10% des Ausgangswertes scheint jedoch nicht mit den Titern spezifischer AK im Serum zusammenzuhängen. Ein relevanter Abfall des systolischen Wertes nach dem Aufstehen trat prozentual

häufiger bei Stadium-II-Patienten auf, ohne dass jedoch ein signifikanter Zusammenhang mit einer zunehmenden Pleozytose erkennbar war. Dieses Symptom könnte sowohl als Resultat der fortgeschrittenen Trypanosomeninfektion mit konsekutiver vegetativer Neuropathie, aber auch als allgemeine Folge einer schweren Infektionskrankheit (wie z.B. längere Liegezeiten) interpretiert werden. Jedoch könnten auch andere Faktoren wie z.B. primäre Erkrankungen des Herzkreislaufsystems denkbare Ursachen dieser Funde sein.

Der hohe Anteil pathologischer Pulsfrequenzen bzw. abnormer Pulsadaptationen nach dem Aufstehen erklärt sich am ehesten multifaktoriell. Eine sekundäre Wirkung auf die Pulswerte bei den Patienten mit pathologischen Blutdruckverhalten erscheint wahrscheinlich. Jedoch wies nur ca. die Hälfte der Patienten mit Pulspathologien eine Blutdruckregulationsstörung in oben genanntem Sinne auf, so dass auch andere Faktoren in der Genese dieser Pulspathologien eine Rolle spielen müssen. Tachy- bzw. Bradykardien können generell Ausdruck einer Infektion (bzw. Superinfektion) sein oder anderen Ursachen zu Grunde liegen bzw. von diesen mit beeinflusst werden (z.B. primäre Herzkreislauf-Pathologien, Trainingszustand, Weiß-Kittel-Phänomen). Der fehlende Zusammenhang mit der Stadienzugehörigkeit der Patienten bzw. der Höhe der spezifischen Immunglobuline im Serum deutet zumindest nicht primär auf eine direkte Beeinflussung durch die Trypanosomeninfektion hin. Aufgrund des Fehlens eines Vergleichskollektives verbleiben diese Annahmen jedoch spekulativ.

Bei der Beurteilung des Untergewichtes wurden internationale Referenzkriterien verwendet, da aus Angola keine Referenz-Daten einer „Normalpopulation“ veröffentlicht sind bzw. auch nicht beim Nationalen Statistischen Institut Angolas erhältlich waren. Die hohe Prävalenz von Untergewicht in der vorliegenden Studie erklärt sich wiederum am ehesten multifaktoriell: Einerseits kann aus den Folgen des Bürgerkrieges, der niedrigen sozialen Stellung und der Armut der Betroffenen auf eine qualitative und quantitative Mangelernährung geschlossen werden (kein Erwachsener hatte einen BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>). Andererseits verstärken sich Mangel- und Unterernährung durch den wechselseitigen Zusammenhang von Armut und Krankheit. Schließlich könnten auch andere Pathologien (z.B. Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, Tumor- oder Schilddrüsenleiden, besonders in Kombination mit stark eingeschränktem Zugang zu öffentlichen Gesundheitsleistungen) den Gewichtszustand der Studienteilnehmer bedingen. Zwar wurde ein gehäuftes Auftreten von Untergewicht bei HAT-Patienten auch von anderen Autoren beschrieben [11] bzw. in Zusammenhang mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumor Nekrose Faktor alpha gebracht [54]. Die Tatsache, dass sich der Anteil der Untergewichtigen gleichmäßig auf beide Stadien verteilt, spricht jedoch für eine eher untergeordnete Rolle der fortgeschrittenen HAT bei der Entstehung von Untergewicht. Auch scheinen Trypanosomen-spezifische Serum-AK nicht mit dem Vorliegen von Untergewicht in Zusammenhang zu stehen. Das von Blum *et al.* (2006) festgestellte gehäufte Vorkommen von Untergewicht bei Kindern mit HAT-Infektionen [11] konnte in der hier vorlie-

genden Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden. In den eben erwähnten Punkten wird jedoch abermals die Wertigkeit der Beobachtungen der vorliegenden Arbeit durch das Fehlen einer Kontrollgruppe eingeschränkt.

### 5.3.2.3 Ergebnisse des IFT der Liquorproben

Durch die Ergebnisse der exemplarischen Versuche mit niedrigeren Verdünnungen bzw. unverdünntem Liquor wird angedeutet, dass bei mehreren Patienten nur niedrigste Spiegel von spezifischem IgG und IgM im Liquor vorliegen. Ergebnisse aus der Literatur werden hierdurch bestätigt: Dass einerseits hier nur geringste AK-Spiegel bestehen und andererseits auch die Relation der Titer (IgG > IgM > IgA) mit der im Serum übereinstimmt, beschrieben auch Lejon *et al.* (1998) [49]. Auch Knobloch *et al.* (1984) konnten in nur 1 von 7 Fällen einen spezifischen IgG-Titer im Liquor von 1:4 finden [41].

Die Präsenz von spezifischen Immunglobulinen im Liquor kann durch lokale Synthese oder durch die Passage aus dem Serum durch die normale (IgG) oder pathologisch veränderte (alle Immunglobuline) Blut-Hirnschranke entstanden sein. Über eine intrathekale Synthese von spezifischen AK bei HAT-Patienten wird in verschiedenen Studien berichtet [9, 51, 55]. Obwohl IgM das vorherrschende intrathekal produzierte Immunglobulin im Liquor ist, scheint es gleichwohl eine niedrigere Affinität für die trypanosomalen Antigene zu haben als IgG [51, 52]. Diese Hypothese und der Umstand, dass Blut-Hirnschranken-Störungen bei der HAT erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium auftreten und dabei moderat bleiben [48, 74, 97], könnten erklären, dass nicht generell höhere Liquor-Antikörperspiegel für IgM (oder IgA) im IFT gefunden werden. Da IgG jedoch die normale Blut-Hirnschranke passiert, könnten in zumindest zwei Fällen von Stadium-II-Patienten die IgG-Liquor-Titer von  $\geq 1:10$  auch die Konsequenz aus ihren extrem hohen IgG-Serumspiegeln von 1:2560 sein. Dass fünf von acht Patienten mit einem IgG-Liquor-Titer von  $\geq 1:10$  eher niedrigere IgG-Serum-Titer ( $\leq 1:320$ ) hatten und selbst bei einem Stadium-II-Patienten mit einem IgG-Serum-Titer von 1:2560 kein spezifisches IgG im Liquor nachgewiesen werden konnte, deutet jedoch wiederum auf die Hypothese einer intrathekalen Synthese hin.

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Phänomen, dass teilweise kein spezifisches IgM im Liquor nachgewiesen werden konnte, obwohl zuvor Trypanosomen in diesem Kompartiment entdeckt worden waren, wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben [41, 49]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Ausbildung Trypanosomen-spezifischer Antikörper nicht zwangsläufig an die Präsenz der Parasiten gekoppelt ist. Mögliche Erklärungen hierfür sind die Vernichtung von Trypanosomen durch die wirtseigene Immunantwort (so dass zum Zeitpunkt der Untersuchung keine oder sehr geringe Parasitenmengen, aber höhere Antikörperspiegel vorliegen) oder nicht adäquate Immunantworten der Patienten mit „ungestörter“ Vermehrungsmöglichkeit der Trypanosomen. Auch das in 5.3.1 geschilderte tech-

nische Problem der unterschiedlichen Antigenität verschiedener VAT-Populationen könnte diesen Umstand teilweise miterklären. Dass sich trotz starker Erhöhung der Gesamtimmunoglobuline nur geringste Spiegel an spezifischen AK im Liquor finden lassen, kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass hier Immunglobuline mit anderen Spezifitäten wie z.B. Auto-AK gebildet werden [3, 4, 32].

### 5.3.2.4 Ergebnisse der klinischen Untersuchung unter Bezugnahme auf die Ergebnisse des IFT der Liquorproben

Es wurde lediglich der Zusammenhang von spezifischen AK im Liquor mit den Ergebnissen der Stand- und Gangüberprüfung beleuchtet, da dies die einzige Untersuchung der vorliegenden Arbeit war, deren Resultate durch Meningoenzephalitiden beeinflussbar sind.

Wenn auch die Daten wegen der geringen Fallzahl nur vorsichtig interpretierbar sind, so gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von spezifischem IgG im Liquor und dem Nichtbestehen der Stand- oder Gangprüfungen. Ein möglicher Grund für so einen Zusammenhang könnte die progressive Neuroinflammation beim Fortschritt der Krankheit sein [48, 52], besonders wenn diese im Bereich des Zerebellums, des Gleichgewichtorgans oder an deren afferenten oder efferenten Bahnen auftritt. Hierbei sind sowohl direkte als auch indirekte Schädigungen des ZNS-Gewebes bei der Immunantwort durch z.B. Kreuzreaktionen der spezifischen Antikörper denkbar. Dass pathologische Resultate in dieser Untersuchung auch mit der Zugehörigkeit zum Stadium II zusammenhängen, scheint nur logische Konsequenz dieser Annahme zu sein. Gestützt wird die Hypothese des Zusammenhangs von progressiver Neuroinflammation und dem Nichtbestehen der Stand- und Gangteste auch durch die Tatsache, dass die Kranken mit pathologischen Stand- oder Gangtests höhere Zellzahlen im Liquor aufwiesen als diejenigen Patienten, die selbst den STZG korrekt ausführen konnten. Dass in einigen Fällen dabei keine Trypanosomen in der Liquor-Mikroskopie nachweisbar waren, könnte wiederum durch die geringe Parasitenlast im Liquor verbunden mit der relativ niedrigen Sensitivität dieser Untersuchungsmethode erklärt werden.

Ursache eines pathologischen Ergebnisses könnten allerdings auch andere Faktoren wie weitere Krankheiten, welche ZNS-Schädigungen hervorrufen (z.B. zerebrale Insulte oder bakterielle oder virale Enzephalitiden) sowie otogener oder medikamentös ausgelöster Schwindel sein. In immerhin zwei (Stadium I) bzw. fünf (Stadium II, hierunter auch der Patient mit der Studiennummer SR 57, bei dem ein Titer von spezifischem IgG im Liquor von 1:10 nachgewiesen wurde) Fällen mit pathologischem Ergebnis in den Stand- und Gangtests wurde die Untersuchung erst zwei Tage nach dem Behandlungsbeginn mit Pentamidin bzw. Melarsoprol durchgeführt. Von diesen Medikamenten ist bekannt, dass sie zu Übelkeit und Schwindel führen können [13].

### 5.3.3 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des IFT und der klinischen Untersuchung und Ausblick

Der IFT erwies sich als einfacher und schnell zu praktizierender Test, birgt jedoch das Problem in sich, dass falsch hohe und falsch niedrige Titerbestimmungen vorkommen können. Da in der vorliegenden Arbeit kein Kontrollkollektiv untersucht wurde, kann über die Spezifität der Antikörperspiegel keine Aussage getroffen werden. Ein Schwachpunkt des IFT ist sicherlich die subjektive Komponente bei der Beurteilung des Endtiters. Falls jedoch die Bestimmung durch nur eine Person durchgeführt wird oder ein exakter Laborstandard mit Referenzseren existiert, an dem die jeweilige Ableseschwelle „geeicht“ werden kann, so bleibt die Relation der Titerhöhen unter den verschiedenen Seren gewahrt.

Die vorliegenden Versuche bestätigen die aus der Literatur bekannten Größenverhältnisse der spezifischen Antikörperspiegel im Serum von HAT-Patienten. Die im Durchschnitt geringeren Serum-AK-Spiegel der Patienten mit serologischer Diagnose weisen ebenso auf die Komplexität der Serologie hin wie auch der fehlende Zusammenhang zwischen Trypanosomen-Präsenz und Höhe der AK-Titer im Liquor. Umgekehrt wirft die Tatsache, dass Patienten mit direktem Parasitennachweis signifikant höhere Serumspiegel an spezifischem IgM aufwiesen, zueinander widersprüchliche Überlegungen auf und sollte in Folgeuntersuchungen evaluiert werden. Ebenso sollte das Fehlen von jeglichem spezifischem IgM im Serum oder Liquor trotz Trypanosomen-Präsenz in weiteren Studien verfolgt werden, da es Ausdruck einer nicht adäquaten Immunantwort bei manchen Patienten sein könnte.

Dass Patienten im fortgeschrittenen Stadium durchschnittlich signifikant höhere Titer von spezifischen Antikörpern im Serum aufweisen, wurde bisher nicht beschrieben. Dies kann als Zusammenhang zwischen Dauer der Infektion und Seropositivität der Patienten interpretiert werden, wobei dieses Phänomen auf einer Akkumulation von spezifischen Antikörpern gegen die ständig wechselnden Oberflächenantigene der Trypanosomen im Laufe der Infektion beruhen könnte. Nach dieser Hypothese müssten die Titer mit der Dauer der Infektion stetig steigen. Falls dies in Folgeuntersuchungen bestätigt werden kann, könnte der IFT nicht nur als ein weiteres Instrumentarium zur Stadieneinteilung genutzt werden. Gleichfalls sollte überprüft werden, ob sich die Titerhöhen der spezifischen Antikörper im Serum als Verlaufparameter eignen.

Wie bereits von mehreren Autoren beschrieben, sind die Liquorspiegel von spezifischen Immunglobulinen sehr niedrig [41, 49]. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen liefern besonders die Bestimmung von spezifischem IgA und IgM keine Anhaltspunkte für eine sinnvolle Verwendung als Diagnostik- oder Verlaufparameter. Falls dennoch weitere Untersuchungen vorgenommen werden, sollte die Titerbestimmung mit unverdünntem Liquor begonnen werden.

Zwischen der Titerhöhe der spezifischen Antikörper im Serum war zwar kein Zusammenhang mit einzelnen klinischen Parametern wie Lymphadenopathien, Untergewicht, Fieber, Kreislaufregulationsstörungen oder Hepatosplenomegalie feststellbar. Obwohl einschränkend erwähnt werden muss, dass eine Objektivierung des klinischen Zustandes nicht zuletzt aufgrund der Subjektivität mancher Untersuchungsmethoden erschwert wurde, erscheint eine unmittelbare Beeinflussung des klinischen Bildes durch die Quantität spezifischer Antikörper äußerst unwahrscheinlich. Da die Pleozytose bei der HAT vornehmlich aus B-Zellen besteht [48], passt zu dieser Annahme auch, dass Blum *et al.* (2006) keinen Zusammenhang diverser Symptome mit der Quantität der Pleozytose von HAT-Patienten feststellen konnten [11]. So scheinen eher andere Faktoren wie die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine [54], autoimmune Prozesse [3, 4, 32] oder möglicherweise eine direkt schädigende Wirkung der Trypanosomen eine Rolle für den klinischen Zustand der Patienten zu spielen.

Es wurden jedoch einige interessante Entdeckungen bezüglich des klinischen Bildes gemacht: So kann das Vorliegen des Winterbottom-Zeichens möglicherweise als Risikofaktor für eine bereits fortgeschrittene Krankheit bzw. das Vorliegen des Stadiums II verstanden werden, da Stadium-II-Patienten signifikant mehr posterior zervikale LK-Vergrößerungen als Stadium-I-Patienten aufwiesen. Folgeuntersuchungen mit einem Vergleichskollektiv sollten diese Hypothesen überprüfen. Auch die hohe Prävalenz an vergrößerten inguinalen LK, welche mit der HAT-Infektion zusammenhängen und den Erregernachweis mittels LKP ermöglichen könnte, bietet Substanz für weitere Untersuchungen.

Haltungsbedingte Blutdruckabfälle bzw. Kreislaufregulationsstörungen bei HAT-Patienten wurden zuvor nicht beschrieben. Ohne Zeitfolgemessungen dieser Parameter (wie mittels Schellong-Test), auch an einer entsprechenden Vergleichsgruppe, können die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nur als Hinweise auf einen Einfluss der HAT-Infektion auf diese Symptome gewertet werden. Da auch deren Genese ungeklärt bleibt, stellen diese Funde sicherlich eine interessante Materie für weitere Untersuchungen dar.

Gleichfalls ist die hohe Prävalenz von Untergewicht von Schlafkrankheitspatienten bemerkenswert und bisher noch nicht befriedigend erklärt. Da jedoch kein Vergleichskollektiv untersucht wurde, kann nicht genau beantwortet werden, ob diese Symptome wirklich durch die HAT-Infektion verursacht werden. Auch hier ergeben sich somit mögliche Fragestellungen für Folgeuntersuchungen.

In Zukunft könnten sich Stand- und Ganguntersuchungen als ein sinnvolles zusätzliches Instrumentarium zur Detektion von Neuroinflammation und somit zur Mithilfe in der Stadieneinteilung bei der Schlafkrankheit erweisen. Dieser nicht invasive, kostengünstige und schnell und einfach anzuwendende Test bringt viele Voraussetzungen mit, die ein Routine-Test in den Ländern des Südens aufweisen sollte. Dieser Test sollte nach Meinung des Autors unbedingt Gegenstand weiterer klinischer Untersuchungen bei der Schlafkrankheit sein.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein repräsentatives Kollektiv von 97 Schlafkrankheitspatienten aus Angola klinisch untersucht und von je 96 Patienten Blut- und Liquorproben gewonnen. Hauptfragestellungen waren, ob die PCR-Technik zur Diagnose und Stadieneinteilung der HAT beiträgt und ob sich aus dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Immunglobulinen Zusammenhänge mit dem klinischen Bild der Krankheit herstellen lassen.

Da mehrfach von Inkonsistenzen bei den Ergebnissen einer von Moser *et al.* (1989) als sehr sensitiv publizierten PCR [64] berichtet wurde und die viel versprechenden Resultate der von Kabiri *et al.* (1999) beschriebenen PCR [36] nicht reproduziert werden konnten, wurde eine von Matovu *et al.* (2001) publizierte PCR [60] zum Nachweis von trypanosomaler DNA (TbAT1-Gen) verwendet. Je nach analysiertem Medium und verwendetem Purifikations-Kit ergaben sich analytische Nachweisgrenzen von 10 bis  $10^2$  Parasiten/10  $\mu$ l PCR-Ansatz, entsprechend rechnerischer Nachweisgrenzen von ca. 5000 Trypanosomen/ml Blut und ca. 3000 Trypanosomen/ml Liquor. Von 96 Blutproben waren 20 positiv in der PCR (20,8%). Gemessen an den jeweiligen mikroskopischen Diagnostikmethoden kam dies einer Sensitivität von 31,1% und einer Spezifität von 92,3% gleich. Die Liquorproben von 55 Stadium-II-Patienten zeigten in 4 Fällen ein positives Resultat in der PCR (7,3%), entsprechend einer Sensitivität von 21,4% und einer Spezifität von 97,6%. Alle Liquorproben von Stadium-I-Patienten waren negativ in der PCR. Die Ergebnisse der Blut- und Liquorproben waren in über 99% der Fälle reproduzierbar. Es bestanden jeweils Zusammenhänge zwischen den Resultaten der PCR mit denen der herkömmlichen mikroskopischen Nachweismethoden wie LKP und Liquor-Mikroskopie. Neben der offensichtlich zu geringen analytischen Nachweisgrenze bei gleichzeitig niedriger Parasitämie der Patienten kommen auch Faktoren wie DNA-Verlust durch das benutzte DNA-Purifikationskit oder Gen-Deletionen der Trypanosomen als Ursache für die hohe Anzahl der falsch-negativen PCR Ergebnisse in Betracht.

Die Resultate der hier angewendeten PCR trugen nicht zur Lösung des diagnostischen Problems der serologisch positiven, aber aparasitämen Patienten bei, lieferten jedoch Hinweise, dass die Parasitenlast im Blut bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium höher ist als bei solchen im Anfangsstadium. Insgesamt stellt diese Methode aber keine Bereicherung in der Diagnosestellung oder der Stadieneinteilung bei der HAT dar und sollte speziellen Fragestellungen wie Melarsoprol-Resistenzbestimmungen vorbehalten werden.

Der IFT wurde nach der von Wery *et al.* (1970) beschriebenen Methode [102] in modifizierter Form durchgeführt und erwies sich als einfacher und schnell zu praktizierender Test. Die Benutzung von VSG-Antigenen ist jedoch wegen der Möglichkeit von Kreuzreaktionen einerseits und falsch-negativen Resultaten bzw. falsch-tiefen Titern andererseits problembehaftet. Im Serum fanden sich für spezifisches IgG hohe, für spezifisches IgM mittlere und für spezi-



fisches IgA niedrige Titer. Die jeweiligen Titer waren in der vorliegenden Arbeit höher als in der Referenzliteratur, wahrscheinlich bedingt durch die Subjektivität der Endpunktlese. Während insgesamt Patienten mit direktem Parasitennachweis signifikant höhere Serumspiegel an spezifischem IgM aufwiesen, konnte bei manchen Kranken trotz Trypanosomen-Präsenz kein spezifisches IgM im Serum oder Liquor nachgewiesen werden. Bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium waren die Spiegel der einzelnen Antikörperklassen im Serum gegenüber denen von Patienten im Anfangsstadium signifikant höher. Dieses Phänomen könnte auf einer Akkumulation der spezifischen Immunglobuline gegen die ständig wechselnden Oberflächenantigene der Trypanosomen im Laufe der Krankheit beruhen. Eine Eignung als Verlaufsparemeter sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Die Höhen der jeweiligen spezifischen Antikörperspiegel im Serum standen nicht in Zusammenhang mit pathologischen Befunden bei der Untersuchung von Körpertemperatur, Blutdruck, Puls, Lymphadenopathien, Hepato- oder Splenomegalien, Bauchschmerz und Untergewicht. Das Fehlen eines Vergleichskollektives, die große Symptom-Variabilität und die Subjektivität einiger Untersuchungsmethoden erschwerten dabei allerdings die Objektivierung des klinischen Zustandes im Hinblick auf allgemeingültige Aussagen. Interessante Nebenfunde in dieser Arbeit waren die nach wie vor ungeklärt hohe Prävalenz von Untergewicht, Hinweise auf Kreislaufregulationsstörungen und der Zusammenhang des Auftretens des Winterbottom-Zeichens mit der Zugehörigkeit zum Stadium II.

Im Liquor konnte nur in wenigen Fällen bei Stadium-II-Patienten spezifisches IgG nachgewiesen werden. Das Vorkommen dieses Immunglobulins stand jedoch im Zusammenhang mit pathologischen Ergebnissen der Patienten in den Stand- und Gangversuchen. Aufgrund des Vorteils der einfachen und schnellen Durchführbarkeit könnten sich diese Untersuchungen als sinnvolle Diagnostikergänzung in der Neuroinflammationsdetektion bei der HAT erweisen. Spezifisches IgM und IgA lagen im Liquor bei allen Proben unter der Testgrenze und bieten keine Anhaltspunkte für eine sinnvolle Verwendung als Diagnostik- oder Verlaufsparemeter.

## 7 Literaturverzeichnis

1. *GenomeNet Database 2002*, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University.
2. Abel, P.M., Kiala, G., Loa, V., Behrend, M., Musolf, J., Fleischmann, H., Theophile, J., Krishna, S. und Stich, A., *Retaking sleeping sickness control in Angola*. Trop Med Int Health, 2004. 9(1): S. 141-8.
3. Amevigbe, M.D., Jauberteau-Marchan, M.O., Bouteille, B., Doua, F., Breton, J.C., Nicolas, J.A. und Dumas, M., *Human African trypanosomiasis: presence of antibodies to galactocerebroside*. Am J Trop Med Hyg, 1992. 47(5): S. 652-62.
4. Ayed, Z., Brindel, I., Bouteille, B., Van Meirvenne, N., Doua, F., Houinato, D., Dumas, M. und Jauberteau, M.O., *Detection and characterization of autoantibodies directed against neurofilament proteins in human African trypanosomiasis*. Am J Trop Med Hyg, 1997. 57(1): S. 1-6.
5. Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C. und Crockett, J., *Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of Trypanosoma brucei, T. equiperdum, T. evansi, T. rhodesiense and T. gambiense*. Embo J, 1985. 4(5): S. 1273-7.
6. Becker, S., Franco, J.R., Simarro, P.P., Stich, A., Abel, P.M. und Steverding, D., *Real-time PCR for detection of Trypanosoma brucei in human blood samples*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004. 50(3): S. 193-9.
7. Beutner, E.H., *Defined immunofluorescent staining: past progress, present status, and future prospects for defined conjugates*. Ann N Y Acad Sci, 1971. 177: S. 506-26.
8. Binz, G., *Observations on levels of immunoglobulin M in confirmed cases of Trypanosoma rhodesiense infection in the Lambwe Valley*. Bull World Health Organ, 1972. 47(6): S. 751-5.
9. Bisser, S., Lejon, V., Preux, P.M., Bouteille, B., Stanghellini, A., Jauberteau, M.O., Buscher, P. und Dumas, M., *Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulins compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness*. J Neurol Sci, 2002. 193(2): S. 127-35.
10. Blum, J., Beck, B.R., Brun, R. und Hatz, C., *Clinical and serologic responses to human 'apathogenic' trypanosomes*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2005. 99(10): S. 795-7.
11. Blum, J., Schmid, C. und Burri, C., *Clinical aspects of 2541 patients with second stage human African trypanosomiasis*. Acta Trop, 2006. 97(1): S. 55-64.
12. Bromidge, T., Gibson, W., Hudson, K. und Dukes, P., *Identification of Trypanosoma brucei gambiense by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes*. Acta Trop, 1993. 53(2): S. 107-19.
13. Burri, C. und Brun, R., *Human African Trypanosomiasis*, in *Manson's Tropical Diseases*, G.C. Cook und A.I. Zumla (Hrsg.). 2002, W.B. Saunders: Philadelphia. S. 1303-1323.

14. Burri, C., Nkunku, S., Merolle, A., Smith, T., Blum, J. und Brun, R., *Efficacy of new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by Trypanosoma brucei gambiense: a randomised trial*. Lancet, 2000. 355(9213): S. 1419-25.
15. Busse, R., *Gefäßsysteme und Kreislauf in Physiologie des Menschen*, R.F. Schmidt und G. Thews (Hrsg.). 1997, Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg. S. 544-548.
16. Buxton, P., *Tsetse and climate; a consideration of the growth and knowledge*. Proceedings of the Royal Entomological Society of London, 1955. 19: S. 71.
17. Cattand, P., Miezán, B.T. und de Raadt, P., *Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes*. Bull World Health Organ, 1988. 66(1): S. 83-6.
18. Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V. und Buscher, P., *Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis*. Clin Microbiol Rev, 2005. 18(1): S. 133-46.
19. Chappuis, F., Stivanello, E., Adams, K., Kidane, S., Pittet, A. und Bovier, P.A., *Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African Trypanosomiasis (Trypanosoma brucei gambiense) among serologically suspected individuals in southern Sudan*. Am J Trop Med Hyg, 2004. 71(3): S. 313-7.
20. Chappuis, F., Udayraj, N., Stietenroth, K., Meussen, A. und Bovier, P.A., *Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage Trypanosoma brucei gambiense human African trypanosomiasis*. Clin Infect Dis, 2005. 41(5): S. 748-51.
21. Cross, G.A., *Crossreacting determinants in the C-terminal region of trypanosome variant surface antigens*. Nature, 1979. 277(5694): S. 310-2.
22. de Almeida, P.J., Ndao, M., Van Meirvenne, N. und Geerts, S., *Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with Trypanosoma vivax*. Acta Trop, 1997. 66(1): S. 45-50.
23. Desquesnes, M., *Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of Trypanosoma vivax infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immuno sorbent assay*. Acta Trop, 1997. 65(3): S. 139-48.
24. Doua, F., Miezán, T.W., Sanon Singaro, J.R., Boa Yapo, F. und Baltz, T., *The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis*. Am J Trop Med Hyg, 1996. 55(6): S. 586-8.
25. Dumas, M. und Bisser, S., *Clinical aspects of human African trypanosomiasis*, in *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness*, M. Dumas, B. Bouteille und A. Buguet (Hrsg.). 1999, Springer-Verlag: Paris. S. 215-233.
26. Dupouey, P. *Structure antigénique de T. gambiense* in *Proc. 8th Int. Congr. Trop. Med. Malaria*. 1968.
27. Ehrhardt, S., Lippert, U., Burchard, G.D. und Sudeck, H., *Orchitis as an unusual manifestation of human African trypanosomiasis*. J Infect, 2006. 52(1): S. e31-3.

28. Enyaru, J.C., Matovu, E., Akol, M., Sebikali, C., Kyambadde, J., Schmidt, C., Brun, R., Kaminsky, R., Ogwal, L.M. und Kanssiime, F., *Parasitological detection of Trypanosoma brucei gambiense in serologically negative sleeping-sickness suspects from north-western Uganda*. Ann Trop Med Parasitol, 1998. 92(8): S. 845-50.
29. Felgner, P., Brinkmann, U., Zillmann, U., Mehltitz, D. und Abu-Ishira, S., *Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. Part II. Parasitological and immunodiagnostic examination of the human population*. Tropenmed Parasitol, 1981. 32(3): S. 134-40.
30. Frezil, J.-L., Carrie, J. und Rio, F., *Application et valeur de la technique d'immunofluorescence indirecte au dépistage et à la surveillance épidémiologique de la trypanosomiase à Trypanosoma gambiense* Cahier ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie, 1974. 12: S. 111-126.
31. Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van Meirvenne, N. und Buscher, P., *Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population*. Trop Med Int Health, 2000. 5(11): S. 786-93.
32. Greenwood, B.M. und Whittle, H.C., *The pathogenesis of sleeping sickness*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1980. 74(6): S. 716-25.
33. Higuchi, R., *Simple and rapid preparation of samples for PCR*, in *PCR technology: principles and applications for DNA amplifications*, H.A. Erlich (Hrsg.). 1989, Stockton press. S. 31-38.
34. Houba, V. und Allison, A.C., *M-antiglobulins (rheumatoid-factor-like globulins) and other gamma-globulins in relation to tropical parasitic infections*. Lancet, 1966. 1(7442): S. 848-52.
35. Hutin, Y.J., Legros, D., Owini, V., Brown, V., Lee, E., Mbulamberi, D. und Paquet, C., *Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis in Terego county, northern Uganda, 1996: a lot quality assurance sampling survey*. Am J Trop Med Hyg, 2004. 70(4): S. 390-4.
36. Kabiri, M., Franco, J.R., Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Sarsa, M. und Steverding, D., *Detection of Trypanosoma brucei gambiense in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7*. Trop Med Int Health, 1999. 4(10): S. 658-61.
37. Kanmogne, G.D., Asonganyi, T. und Gibson, W.C., *Detection of Trypanosoma brucei gambiense, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR*. Ann Trop Med Parasitol, 1996. 90(5): S. 475-83.
38. Katende, J.M., Musoke, A.J., Nantulya, V.M. und Goddeeris, B.M., *A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis*. Trop Med Parasitol, 1987. 38(1): S. 41-4.
39. Kegels, G., Criel, B., van Lerberghe, W., Mentens, H., Magnus, E. und Van Balen, H., *Screening for Trypanosoma brucei gambiense antibodies with the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT). Effect of age and previous treatment*. Ann Soc Belg Med Trop, 1992. 72(4): S. 271-81.

40. Keiser, J., Stich, A. und Burri, C., *New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development*. Trends Parasitol, 2001. 17(1): S. 42-9.
41. Knobloch, J., Tischendorf, F., König, J. und Mehlitz, D., *Evaluation of immunoassays for diagnosis and management of sleeping sickness in Liberia*. Tropenmed Parasitol, 1984. 35(3): S. 137-40.
42. Kuczmarski, R.J., Ogden, C.L., Grummer-Strawn, L.M., Flegal, K.M., Guo, S.S., Wei, R., Mei, Z., Curtin, L.R., Roche, A.F. und Johnson, C.L., *CDC growth charts: United States*. Adv Data, 2000(314): S. 1-27.
43. Kyambadde, J.W., Enyaru, J.C., Matovu, E., Odiit, M. und Carasco, J.F., *Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction*. Bull World Health Organ, 2000. 78(1): S. 119-24.
44. Lambert, P.H., Berney, M. und Kazyumba, G., *Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis*. J Clin Invest, 1981. 67(1): S. 77-85.
45. Lambert, P.H., Dixon, F.J., Zubler, R.H., Agnello, V., Cambiaso, C., Casali, P., Clarke, J., Cowdery, J.S., McDuffie, F.C., Hay, F.C., MacLennan, I., Masson, P., Müller-Eberhard, H., Penttinen, K., Smith, M., Tappeiner, G., Theofilopoulos, A. und Verroust, P., *A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum*. J. Clin. Lab. Immunol., 1978. 1: S. 1-15.
46. Lambert, P.H. und Houba, V., *Immune complexes in parasitic diseases*. Prog. Immunol. , 1974. 5: S. 57-57.
47. Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J. und Buscher, P., *Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development*. Lancet Infect Dis, 2002. 2(7): S. 437-40.
48. Lejon, V. und Büscher, P., *Review Article: cerebrospinal fluid in human African trypanosomiasis: a key to diagnosis, therapeutic decision and post-treatment follow-up*. Trop Med Int Health, 2005. 10(5): S. 395-403.
49. Lejon, V., Buscher, P., Magnus, E., Moons, A., Wouters, I. und Van Meirvenne, N., *A semi-quantitative ELISA for detection of Trypanosoma brucei gambiense specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients*. Acta Trop, 1998. 69(2): S. 151-64.
50. Lejon, V., Buscher, P., Sema, N.H., Magnus, E. und Van Meirvenne, N., *Human African trypanosomiasis: a latex agglutination field test for quantifying IgM in cerebrospinal fluid*. Bull World Health Organ, 1998. 76(6): S. 553-8.
51. Lejon, V., Reiber, H., Legros, D., Dje, N., Magnus, E., Wouters, I., Sindic, C.J. und Buscher, P., *Intrathecal immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system involvement in trypanosomiasis*. J Infect Dis, 2003. 187(9): S. 1475-83.
52. Lejon, V., Sindic, C.J., Van Antwerpen, M.P., Doua, F., Dje, N., Solano, P., Jamonneau, V., Wouters, I. und Buscher, P., *Human African trypanosomiasis: quantitative and qualitative assessment of intrathecal immune response*. Eur J Neurol, 2003. 10(6): S. 711-9.

53. Losos, G. und Ikede, B.O., *Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by Trypanosoma congolense, T. vivax, T. brucei, T. rhodiense, and T. gambiense.* Veterinary Pathology 1972. 9(Suppl.): S. 1-71.
54. MacLean, L., Chisi, J.E., Odiit, M., Gibson, W.C., Ferris, V., Picozzi, K. und Sternberg, J.M., *Severity of human african trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype, and host inflammatory cytokine response profile.* Infect Immun, 2004. 72(12): S. 7040-4.
55. Maclean, L., Odiit, M. und Sternberg, J.M., *Intrathecal cytokine responses in Trypanosoma brucei rhodesiense sleeping sickness patients.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006. 100(3): S. 270-5.
56. Magnus, E., Vervoort, T. und Van Meirvenne, N., *A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. B. gambiense trypanosomiasis.* Ann Soc Belg Med Trop, 1978. 58(3): S. 169-76.
57. Mansfield, J.M., *T-cell responses to the trypanosome variant surface glycoprotein: a new paradigm?* Parasitol Today, 1994. 10(7): S. 267-70.
58. Masiga, D.K., *The development and application of a polymerase chain reaction methodology for the identification of African trypanosomes.* 1994, University of Bristol, U.K.
59. Mathieu-Daude, F., Bicart-See, A., Bosseno, M.F., Breniere, S.F. und Tibayrenc, M., *Identification of Trypanosoma brucei gambiense group I by a specific kinetoplast DNA probe.* Am J Trop Med Hyg, 1994. 50(1): S. 13-9.
60. Matovu, E., Geiser, F., Schneider, V., Maser, P., Enyaru, J.C., Kaminsky, R., Gallati, S. und Seebeck, T., *Genetic variants of the TbAT1 adenosine transporter from African trypanosomes in relapse infections following melarsoprol therapy.* Mol Biochem Parasitol, 2001. 117(1): S. 73-81.
61. Mattern, P., *[Technics and Epidemiological Value of the Diagnosis of Human African Trypanosomiasis by the Determination of Beta-2-Macroglobulin the Blood and Cerebrospinal Fluid.]* Ann Inst Pasteur (Paris), 1964. 107: S. 415-21.
62. Miezán, T.W., Meda, A.H., Doua, F. und Cattand, P., *[Evaluation of the parasitologic technics used in the diagnosis of human Trypanosoma gambiense trypanosomiasis in the Ivory Coast]*. Bull Soc Pathol Exot, 1994. 87(2): S. 101-4.
63. Moore, A. und Richer, M., *Re-emergence of epidemic sleeping sickness in southern Sudan.* Trop Med Int Health, 2001. 6(5): S. 342-7.
64. Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R. und Donelson, J.E., *Detection of Trypanosoma congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction.* Parasitology, 1989. 99 Pt 1: S. 57-66.
65. Murray, M., Murray, P.K. und McIntyre, W.I., *An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1977. 71(4): S. 325-6.
66. Naylor, C.D., *The rational clinical examination. Physical examination of the liver.* Jama, 1994. 271(23): S. 1859-65.

67. Noireau, F., Lemesre, J.L., Nzoukoudi, M.Y., Louembet, M.T., Gouteux, J.P. und Frezil, J.L., *Serodiagnosis of sleeping sickness in the Republic of the Congo: comparison of indirect immunofluorescent antibody test and card agglutination test*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1988. 82(2): S. 237-40.
68. Okomo-Assoumou, M.C., Daulouede, S., Lemesre, J.L., N'Zila-Mouanda, A. und Vincendeau, P., *Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis*. Am J Trop Med Hyg, 1995. 53(5): S. 539-43.
69. Papadopoulos, M.C., Abel, P.M., Agranoff, D., Stich, A., Tarelli, E., Bell, B.A., Planche, T., Loosemore, A., Saadoun, S., Wilkins, P. und Krishna, S., *A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis*. Lancet, 2004. 363(9418): S. 1358-63.
70. Paquet, C., Ancelle, T., Gastellu-Etchegorry, M., Castilla, J. und Harndt, I., *Persistence of antibodies to Trypanosoma brucei gambiense after treatment of human trypanosomiasis in Uganda*. Lancet, 1992. 340(8813): S. 250.
71. Penchenier, L., Simo, G., Grebaut, P., Nkinin, S., Laveissiere, C. und Herder, S., *Diagnosis of human trypanosomiasis, due to Trypanosoma brucei gambiense in central Africa, by the polymerase chain reaction*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. 94(4): S. 392-4.
72. Pepin, J. und Milord, F., *African trypanosomiasis and drug-induced encephalopathy: risk factors and pathogenesis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. 85(2): S. 222-4.
73. Pepin, J., Milord, F., Guern, C., Mpia, B., Ethier, L. und Mansinsa, D., *Trial of prednisolone for prevention of melarsoprol-induced encephalopathy in gambiense sleeping sickness*. Lancet, 1989. 1(8649): S. 1246-50.
74. Philip, K.A., Dascombe, M.J., Fraser, P.A. und Pentreath, V.W., *Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis*. Ann Trop Med Parasitol, 1994. 88(6): S. 607-16.
75. Qiagen, *User-Developed Protocol: Stabilization of DNA in whole blood by Buffer AS*. 2001, Qiagen GmbH: Hilden. S. 1-2.
76. Qiagen, *Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits*. 2002, Qiagen GmbH: Hilden. S. 28-31.
77. Qiagen, *User-Developed Protocol: Streptokinase treatment of clotted blood*. 2002. Qiagen <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/QA12.pdf>
78. Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Perez-Morga, D., Pays, E. und Buscher, P., *Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of Trypanosoma brucei gambiense*. Am J Trop Med Hyg, 2002. 67(3): S. 289-95.
79. Ramos, A., Maslov, D.A., Fernandes, O., Campbell, D.A. und Simpson, L., *Detection and identification of human pathogenic Leishmania and Trypanosoma species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats*. Exp Parasitol, 1996. 82(3): S. 242-50.
80. Ruitenbergh, E.J. und Buys, J., *Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)*. Am J Trop Med Hyg, 1977. 26(1): S. 31-6.

81. Sadun, E.H., Duxbury, R.E., Williams, J.S. und I., A.R., *Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in man*. J Parasit, 1963. 49: S. 385-388.
82. Schares, G. und Mehlitz, D., *Sleeping sickness in Zaire: a nested polymerase chain reaction improves the identification of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense by specific kinetoplast DNA probes*. Trop Med Int Health, 1996. 1(1): S. 59-70.
83. Schmid, C., Richer, M., Bilenge, C.M., Josenando, T., Chappuis, F., Manthelot, C.R., Nangouma, A., Doua, F., Asumu, P.N., Simarro, P.P. und Burri, C., *Effectiveness of a 10-day melarsoprol schedule for the treatment of late-stage human African trypanosomiasis: confirmation from a multinational study (IMPAMEL II)*. J Infect Dis, 2005. 191(11): S. 1922-31.
84. Serengbe, B.G., Gaudeuille, A., Soumouk, A., Gody, J.C., Yassibanda, S. und Mandaba, J.L., *[Acute abdominal pain in children at the Pediatric Hospital in Bangui (Central African Republic). Epidemiological, clinical, paraclinical, therapeutic and evolutive aspects]*. Arch Pediatr, 2002. 9(2): S. 136-41.
85. Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Franco, J.R. und Josenando, T., *Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African Trypanosomiasis (T.b. gambiense) focus of Quicama (Angola)*. Trop Med Int Health, 1999. 4(12): S. 858-61.
86. Smith, D.H., Pepin, J. und Stich, A.H., *Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis*. Br Med Bull, 1998. 54(2): S. 341-55.
87. Solano, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Dje, N.N., Miezán, T.W., Lejon, V., Buscher, P. und Garcia, A., *Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Cote d'Ivoire*. Acta Trop, 2002. 82(3): S. 349-56.
88. Stanghellini, A. und Josenando, T., *The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity*. Trop Med Int Health, 2001. 6(5): S. 330-4.
89. Sternberg, J.M., *Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response*. Parasite Immunol, 2004. 26(11-12): S. 469-76.
90. Stich, A., *Afrikanische Schlafkrankheit - Die Karriere eines Medikaments*. Deutsches Ärzteblatt, 2001. 98: S. 1735-1737.
91. Stich, A., Barrett, M.P. und Krishna, S., *Waking up to sleeping sickness*. Trends Parasitol, 2003. 19(5): S. 195-7.
92. Stich, A. und Steverding, D., *Trypanosomen – Die Rückkehr einer Seuche*. Biologie in unserer Zeit 2002. 32 (5): S. 294-302.
93. Truc, P., Jamonneau, V., Cuny, G. und Frezil, J.L., *Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up*. Bull World Health Organ, 1999. 77(9): S. 745-8.
94. UN, *The United Nations and the Situation in Angola*. 1995. UN Reproduction Section, New York. [DPI/1552/PKO/Rev.1]  
[http://www.un.org/Depts/german/sr/sr\\_95/srb95-04.pdf](http://www.un.org/Depts/german/sr/sr_95/srb95-04.pdf)



95. Van Meirvenne, N., *Biological diagnosis of human African trypanosomiasis*, in *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness*, M. Dumas, B. Bouteille und A. Buguet (Hrsg.). 1999, Springer-Verlag: Paris. S. 235-252.
96. Vincendeau, P., Jauberteau-Marchan, M.O., Dauloudède, S. und Ayed, Z., *Immunology of African trypanosomiasis*, in *Progress in human African trypanosomiasis, sleeping sickness*, M. Dumas, B. Bouteille und A. Buguet (Hrsg.). 1999, Springer-Verlag: Paris. S. 137-156.
97. Waitumbi, J.N., Sayer, P.D. und Gould, S.S., *Evidence of blood cerebrospinal fluid barrier permeability impairment in chronic Trypanosoma rhodesiense infection in a vervet monkey*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986. 80(5): S. 848.
98. Weiss, J.B., *DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections*. Clin Microbiol Rev, 1995. 8(1): S. 113-30.
99. Weitz, B., *The Specificity of Trypanosomal Antigens by Immunofluorescence*. J Gen Microbiol, 1963. 32: S. 145-9.
100. Wery, M. und Mulumba, M.P., *Detection of Trypanosoma brucei gambiense in the host and alternative sleeping sickness diagnostic approaches*. Ann Soc Belg Med Trop, 1989. 69 Suppl 1: S. 181-7; discussion 212-4.
101. Wery, M., Van Wettere, P., Wery-Paskoff, S., Van Meirvenne, N. und Mesatewa, M., *The diagnosis of human African trypanosomiasis (T. gambiense) by the use of the fluorescent antibody test. 2. First results of field application*. Ann Soc Belg Med Trop, 1970. 50(6): S. 711-30.
102. Wery, M., Wery-Paskoff, S. und Van Wettere, N., *The diagnosis of human African trypanosomiasis (T. gambiense) by the use of fluorescent antibody test. I. Standardization of an easy technique to be used in mass surveys*. Ann Soc Belg Med Trop, 1970. 50(5): S. 613-34.
103. Whittle, H.C., Greenwood, B.M., Bidwell, D.E., Bartlett, A. und Voller, A., *IgM and antibody measurement in the diagnosis and management of Gambian trypanosomiasis*. Am J Trop Med Hyg, 1977. 26: S. 1129-34.
104. WHO, *Epidemiology and control of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1986. 739: S. 1-127.
105. WHO, *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee*. WHO Tech Rep Ser., 1995. 854: S. 1-452.
106. WHO, *Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1998. 881: S. I-VI, 1-114.
107. WHO, *Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - African trypanosomiasis*. 2001  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR\\_ISR\\_2000\\_1tryps/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1tryps/en/index.html)
108. WHO, *Programme to Eliminate Sleeping Sickness - Building a Global Alliance*. 2002. [WHO/CDS/CSR/EPH/2002.13]  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.13.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.13.pdf)

## Abbildungsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Abbildung 1: Vorkommen der HAT in Afrika .....</i>  | <i>5</i>  |
| <i>Abbildung 2: Patientin im Stadium II. ....</i>  | <i>6</i>  |
| <i>Abbildung 3: Karte von Angola.....</i>  | <i>10</i> |
| <i>Abbildung 4: Wegbaum zur Diagnose der HAT.....</i>  | <i>18</i> |
| <i>Abbildung 5: Lumbalpunktion vor Ort.....</i>  | <i>19</i> |
| <i>Abbildung 6: Blutentnahme zur Probengewinnung.....</i>  | <i>24</i> |
| <i>Abbildung 7: Position der Primer ATF2 und ATR2 im TbAT1 Gen.....</i>                                | <i>30</i> |
| <i>Abbildung 8: Position der Primer ATF2, ATR2 und ATR3 im TbAT1-Gen. ....</i>                         | <i>32</i> |
| <i>Abbildung 9: Einteilung der Patienten in Gruppen nach Vollständigkeit der Laborergebnisse... ..</i> | <i>40</i> |
| <i>Abbildung 10: Beispiel eines Ergebnisses der PCR. ....</i>  | <i>42</i> |
| <i>Abbildung 11: Beispiel eines Ergebnisses der seminested-PCR .....</i>                               | <i>44</i> |
| <i>Abbildung 12: Ergebnisse der PCR der Blutproben nach Pleozytose.....</i>                            | <i>47</i> |
| <i>Abbildung 13: Ergebnisse der PCR der Liquorproben nach Pleozytose.....</i>                          | <i>50</i> |
| <i>Abbildung 14: Positiv- und Negativbeispiel der IFT-Versuche. ....</i>                               | <i>53</i> |
| <i>Abbildung 15: Ergebnisse der IFT mit Liquorproben nach Pleozytose.. ....</i>                        | <i>56</i> |
| <i>Abbildung 16: Vollständigkeit der Daten der körperlichen Untersuchung. ....</i>                     | <i>59</i> |
| <i>Abbildung 17: BMI nach Alter und Stadien .....</i>  | <i>60</i> |
| <i>Abbildung 18: Lageabhängigkeit des Blutdruckes.....</i>   | <i>61</i> |
| <i>Abbildung 19: Lageabhängigkeit des Pulses.....</i>  | <i>63</i> |
| <i>Abbildung 20: Schematische Darstellung der Verteilung der Lymphadenopathien. ....</i>               | <i>64</i> |
| <i>Abbildung 21: Auftreten von posterior zervikalen Lymphadenopathien nach Pleozytose. ....</i>        | <i>66</i> |
| <i>Abbildung 22: Ergebnisse der einzelnen Stand- und Gangversuche nach Pleozytose. ....</i>            | <i>69</i> |
| <i>Abbildung 23: Ergebnisse der zusammengefassten Stand- und Gangversuche nach Pleozytose... ..</i>    | <i>70</i> |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <i>Tabelle 1: Therapie der HAT</i> .....   | 8  |
| <i>Tabelle 2: Demographische Basisdaten des Studienkollektives</i> .....                 | 39 |
| <i>Tabelle 3: Laborergebnisse des Studienkollektives</i> .....                           | 40 |
| <i>Tabelle 4: Ergebnisse des PCR-Lagerungsversuches</i> .....                            | 43 |
| <i>Tabelle 5: Vergleich von LKP mit PCR der Blutproben</i> .....                         | 47 |
| <i>Tabelle 6: Vergleich von HCT mit PCR der Blutproben</i> .....                         | 48 |
| <i>Tabelle 7: Vergleich von HCT / LKP mit PCR der Blutproben</i> .....                   | 48 |
| <i>Tabelle 8: Vergleich von Liquor-Mikroskopie mit PCR der Liquorproben</i> .....        | 49 |
| <i>Tabelle 9: Ergebnisse PCR-Nachweise aus Blut- und Liquorproben</i> .....              | 50 |
| <i>Tabelle 10: Ergebnisse der seminested-PCR der Liquorproben</i> .....                  | 51 |
| <i>Tabelle 11: Ergebnisse der Schachbrett-Titration</i> .....                            | 52 |
| <i>Tabelle 12: Ergebnisse des IFT mit Serumproben</i> .....                              | 54 |
| <i>Tabelle 13: Serum-Antikörper nach Krankheitsstadien</i> .....                         | 54 |
| <i>Tabelle 14: Serum-Antikörper nach Parasitennachweis im Blut</i> .....                 | 55 |
| <i>Tabelle 15: Ergebnisse des IFT mit Liquorproben</i> .....                             | 55 |
| <i>Tabelle 16: Antikörper im Liquor von einzelnen Stadium-II-Patienten</i> .....         | 57 |
| <i>Tabelle 17: Systolischer Blutdruckabfall von &gt;10% nach Stadien</i> .....           | 62 |
| <i>Tabelle 18: Lokalisation der Lymphadenopathien nach Stadien</i> .....                 | 65 |
| <i>Tabelle 19: Ergebnisse der körperlichen Untersuchung</i> .....                        | 67 |
| <i>Tabelle 20: Ergebnisse der Stand- und Ganguntersuchungen</i> .....                    | 68 |
| <i>Tabelle 21: Stand- und Gangteste nach Titern von spezifischem IgG im Liquor</i> ..... | 70 |
| <i>Tabelle 22: DNA-Ausbeute nach Probengut</i> .....                                     | 75 |
| <i>Tabelle 23: Berechnung der PCR-Nachweisgrenzen</i> .....                              | 75 |
| <i>Tabelle 24: Vergleich von Serum-Titern spezifischer AK zur Literatur</i> .....        | 84 |
| <i>Tabelle 25: Vergleich klinischer Untersuchungsergebnisse zur Literatur</i> .....      | 86 |

## Annex I: Einverständniserklärungsformular

 **Instituto Médico Missioneiro  
Würzburg**

 **CARITAS DE  
ANGOLA**

### Declaração de consentimento de participação

- Eu li  
 me fiz ler

este formulário de consentimento e concordo em tomar parte desta pesquisa.

Traduzido  Sim  
 Não

Posso retirar mi consentimento de participação siempre, sem explicacoes e sem desvantagem pessoal.

Assinatura do voluntário,  
pais ou responsável legal \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Médico \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Testemunha \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

#### Responsavel

August Stich MD, MSc, DTMH  
Unit of Tropical Medicine and Epidemic Control  
Medical Mission Institute  
Hermann-Schell - Str. 7  
D - 97074 Würzburg  
Tel.: + 49 - 931 - 80 48 523  
Fax.: + 49 - 931 - 80 48 530  
e-mail: mi.tropmed @ mail.uni-wuerzburg.de

**Annex II: Liste der Chemikalien**

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Chloroform.....  | Merck, Darmstadt              |
| HEPES .....  | Gibco BRL, Karlsruhe          |
| Glucose-Monohydrat.....                                    | Roth, Karlsruhe               |
| Na-Pyruvat.....  | Roth, Karlsruhe               |
| Hypoxanthin.....   | Roth, Karlsruhe               |
| Thymidin .....   | Roth, Karlsruhe               |
| Adenosin.....  | Roth, Karlsruhe               |
| Bathocuproninsulfonat .....                                | Roth, Karlsruhe               |
| Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) mit L-Glutamin....   | BioWhittaker, Nottingham / UK |
| Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA).....                  | Biochrom, Berlin              |
| β-Mercaptoethanol.....                                     | Sigma, Deisenhofen            |
| fötales Rinderserum.....                                   | Biochrom, Berlin              |
| Penicillin .....   | Biochrom, Berlin              |
| Streptomycin.....  | Biochrom, Berlin              |
| Methanol pro analysi (> 99,8%) .....                       | Merck, Darmstadt              |
| Tween 20.....  | Roth, Karlsruhe               |
| Aceton .....   | Merck, Darmstadt              |
| HCl 32% .....  | Merck, Darmstadt              |
| NaOH (1 M) .....   | Merck, Darmstadt              |
| NaCl .....   | Merck, Darmstadt              |
| KCl.....   | Merck, Darmstadt              |
| MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O.....                  | Merck, Darmstadt              |
| CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O .....                 | Merck, Darmstadt              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O ..... | Merck, Darmstadt              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                      | Merck, Darmstadt              |
| Ethidiumbromid 1%.....                                     | Merck, Darmstadt              |
| Ethanol pro analysi (100%).....                            | Merck, Darmstadt              |
| MgCl <sub>2</sub> .....                                    | Roche, Mannheim               |
| Agarose NEEO (Ultra-Qualität) .....                        | Roth, Karlsruhe               |
| H <sub>2</sub> O für PCR .....                             | Sigma, Deisenhofen            |
| H <sub>2</sub> O bidest .....                              | Schubert, Schwandorf          |

## Annex III: Liste der Geräte

### a) Brut- und Inkubationsschränke:

|   |                |
|---|----------------|
| Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Zufuhr ..... | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank .....                             | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank Incubat.....                      | Melag, Berlin  |

### b) Gefrier- und Kühlschränke:

|                                   |                           |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Gefrierschrank Comfort plus ..... | Siemens, Deutschland      |
| Gefrierschrank Comfort.....       | Liebherr, Bulle / Schweiz |

### c) Mikroskope und Objektive:

|  |                  |
|--|------------------|
| Mikroskop Olympus CK-2 .....                           | Olympus, Hamburg |
| Objektiv Olympus ULWCD 0,30 .....                      | Olympus, Hamburg |
| Mikroskop CH-2 .....                                   | Olympus, Hamburg |
| Objektiv: E A40 0,65 160 / 0,17 .....                  | Olympus, Hamburg |
| Mikroskop Fluoreszenz Zeiss / HBO 50 .....             | Zeiss, Jena      |
| Objektiv Ph3 Plan-Neofluor 63x / 1,25 Oil / 0,17 ..... | Zeiss, Jena      |
| Fluoreszenz-System BH-2-RFCA .....                     | Olympus, Hamburg |

### d) Mikrowellen:

|                           |               |
|---------------------------|---------------|
| Mikrowelle KOR 63D7 ..... | Daewoo, Korea |
| Mikrowelle MW-800 .....   | Continent     |

### e) Photoanlagen für PCR-Gele:

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Photoanlage CS-1 .....                                  | CyberTech, Naperville / USA |
| Drucker Video copy processor .....                      | Mitsubishi, Japan           |
| UV-Beleuchtungsanlage TFX 20M.....                      | TFX, Jaffrey / USA          |
| Photoanlage für PCR-Gele Biodoc II .....                | Biometra, Göttingen         |
| Drucker Digital Graphic Printer UP-D890 Biodoc II ..... | Biometra, Göttingen         |

### f) Spannungsgeräte und Gelelektrophoresekammern:

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Power Supply EPS 500 / 400 .....                    | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Power Supply EPS 600.....                           | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Elektrophorese-Kammer (horizontal) Stratagene ..... | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Elektrophorese-Kammer GNA 100 (horizontal) .....    | Pharmacia Biotech, Freiburg |

g) Thermocycler:

Thermocycler: Programmable Thermal Control ..... MJ Research, Waltham / USA  
PCR-Thermocycler: Mastercycler Gradient..... Eppendorf, Hamburg

h) Vortex und Thermomixer:

Thermomixer Comfort..... Eppendorf, Hamburg  
Vortex..... Heidolph, Schwabach  
Vortex Reamix..... ASID, Unterschleißheim

i) Waagen:

Präzisionswaage 440-33..... Kern, Großmaiseid  
Präzisionswaage handy..... Sartorius, Göttingen

j) Zentrifugen:

Labofuge II..... Heraeus, Hanau  
Biofuge pico..... Heraeus, Hanau  
Biofuge 15..... Heraeus, Hanau

k) Sonstige Geräte:

Wasserbad Fisons W19..... Haake, Karlsruhe  
Blutdruckmessgerät STABIL 3 ..... Speidel & Keller, Jungingen  
pH-METER WTW pH320..... WTW, Mannheim

## Annex IV: Liste der Verbrauchsmaterialien

### a) Blutabnahmesysteme:

|  |                              |
|--|------------------------------|
| Spritzennadeln Sterican 20 G 1½“ 0,9 x 40 mm BL / LB ..... | Braun, Melsungen             |
| Venenpunktionsbesteck Venofix® 21G.....                    | Braun, Melsungen             |
| Serum-Monovette®.....                                      | Sarstedt, Nümbrecht          |
| EDTA-Monovette®.....                                       | Sarstedt, Nümbrecht          |
| Vacutainer®.....   | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Sterile Spritze Omnifix (10 ml) .....                      | Braun, Melsungen             |

### b) Reaktionsgefäße:

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Reaktionsgefäße (2 ml).....                   | Eppendorf, Hamburg    |
| Reaktionsgefäße Cryo Tube Vials (1,8 ml)..... | NUNC, Wiesbaden       |
| PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml) .....            | Hartenstein, Würzburg |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml).....                 | Hartenstein, Würzburg |
| Mini Spin Columns.....                        | Qiagen, Hilden        |
| Auffang-Gefäße für Filtrate (2 ml) .....      | Qiagen, Hilden        |

### c) Handschuhe:

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Einmal-Handschuh Glovex ultra tex.....      | Beiersdorf, Hamburg          |
| Einmal-Handschuh Nitra-Tex Tuch N Tuff..... | Ansell, Anderlecht / Belgien |

### d) Pipetten, Pipettenspitzen und Filter :

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Pasteur-Pipetten steril.....                                 | Bioster, Seriate / Italien |
| Spritzenfilter steril / gammabehandelt (0,22 µM) .....       | TPP, Trasadingen / Schweiz |
| Serologische Pipetten TD 20°C (1, 5, 10, 20 ml).....         | TPP, Trasadingen / Schweiz |
| Multikanal-Pipetten (20-200 µl) .....                        | Eppendorf, Hamburg         |
| Pipettenspitzen, gestopft (100 µl).....                      | Eppendorf, Hamburg         |
| Pipettenspitzen (100 µl, 1000 µl).....                       | Eppendorf, Hamburg         |
| Pipetten, verstellbar (2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)..... | Eppendorf, Hamburg         |

### e) Objektträger und Abdeckgläser:

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Objektträger für Immunofluoreszenz .....    | bioMérieux, Nürtingen |
| Objektträgerabdeckgläser (24 x 50 mm) ..... | Knittel, Fulda        |



f) Sonstige Verbrauchsmaterialien:

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Aufbewahrungsbox Mikroskopische Präparate Assistent .....   | Hecht KG, Sondheim          |
| Erlenmeyer-Kolben (250 ml) .....  | Witeg, Wertheim             |
| Filterpapier weiß .....   | Satorius, Göttingen         |
| Immersionsöl für die Mikroskopie.....   | Merck, Darmstadt            |
| Mikrotiter-(Elisa-)Platten 96 K in U-Form.....  | Greiner, Frickenhausen      |
| Neubauer-Zählkammer 0,1 mm Tiefe (bright-light).....  | Superior, Lauda-Königshofen |
| Parafilm .....  | American Can, Neenah / USA  |
| QIAamp DNA Mini Kit .....   | Qiagen, Hilden              |
| Waschküvetten aus Glas .....  | Witeg, Wertheim             |
| Zellkulturflaschen steril / gammabehandelt /<br>zellkulturbehandelt mit Filter im Deckel (25 / 75 cm <sup>2</sup> ) ..... | TPP, Trasadingen / Schweiz  |

# Curriculum Vitae

Alexander Pablo Querfurt

## Personalien

---

Geburtsort: Essen  
Geburtstag: 16.02.1976  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

---

1982 - 1986  
1986 - 1995

Grundschule am Ardeyplatz, Essen  
Stadtwald- und Grashof-Gymnasium, Essen  
Abschluss Abitur

## Zivildienst

---

1995 - 1997

Anderer Dienst im Ausland (§14b) in San Felipe, Chile

## Studium

---

1997 - 1999  
1998 - 2005  
2000, März  
2000 - 2001  
2001, August  
2004, März  
2004 - 2005

Studium der Geographie, Georg-August-Universität Göttingen  
Studium der Medizin, Georg-August-Universität Göttingen  
Physikum  
Studium an der Universität La Laguna, Spanien  
1. Staatsexamen  
2. Staatsexamen  
Praktisches Jahr:  
Chirurgie, Taranaki District Base Hospital, New Plymouth, NZ  
Innere Medizin, Regionalspital Emmental, Burgdorf, Schweiz  
Pädiatrie, Prof.-Hess-Kinderklinik, Bremen

2005, Oktober  
2005, Dezember

3. Staatsexamen  
Approbation

## Jetzige berufliche Tätigkeit

---

Seit 2006, Februar

Assistenzarzt in der Pädiatrie, Prof.-Hess-Kinderklinik, Bremen

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Priv.-Doz. Dr. August Stich für die gute und geduldige Betreuung, dauernde Ansprechbarkeit bei Problemen sowie die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Bei Prof. Dr. Klaus Brehm bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates, bei Prof. Dr. Uwe Groß für die Möglichkeit der Labornutzung in Göttingen und die wertvollen Anregungen hinsichtlich der inhaltlichen und formalen Darstellung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Fr. Hannelore Fleischmann für die sympathische Unterstützung, dauernde Ansprechbarkeit und die vielen flexiblen Problemlösungen. Ohne sie wäre die Arbeit in Angola und in Würzburg nicht möglich gewesen.

Dr. Raimond Lugert danke ich für die geduldige Anleitung bei der Methodik der PCR, die ständige (auch telefonische) Unterstützung und kritische Durchsicht von Teilen der Manuskripte. Bei Fr. Constanze Kunze bedanke ich mich für die Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung der PCR-Versuche in Göttingen. Ich danke Fr. Christiane Scholz und dem Team der Serologischen Abteilung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie für die freundliche Einarbeitung in die Methode des IFT und ständige (auch telefonische) Unterstützung.

„Thank you very much“, Prof. Dr. Sanjeev Krishna für die wertvollen Tipps hinsichtlich wissenschaftlichen Arbeitens und klinischen Untersuchens sowie für die Unterstützung in der statistischen Auswertung. „Muito obrigado“, Dr. Paulo Abel und Dr. Kiala für die freundliche Unterstützung und Mitarbeit in Angola.

Ein Dank gilt ebenso Andrea Rogers für all die vielen kleinen, aber doch so wichtigen Dinge, deren man oft zu wenig gedenkt. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Reinhard Hilgers von der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen für die Hilfe bei der statistischen Auswertung, Priv.-Doz. Dr. Carsten Lüder für die Anfertigung der IFT-Fotos, Fr. Carola Fiedler von Olympus für die technische Unterstützung und der Abteilung Serologie des BNI für die freundliche Bereitstellung eines Schlafkrankheitserums.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Familie für das „Für-mich-da-sein“ und das Auffinden des Fehlerleufels im Manuskript. Speziell danke ich meinem Bruder Florian und seiner Freundin Anne für die Unterstützung in statistischen Fragen. Mein letzter und tiefster Dank gebührt meiner Partnerin Andrea für alles, was sie für mich getan hat. Sie half mir auch an Tagen mit Regen viel Sonne zu sehen.