

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT DIERGENEESKUNDE
Academiejaar 2010-2011

Resistentie bij *T. congolense* in de Ghibe vallei, Ethiopië

door

Jana PAUWELS

Promotor: Dr. Vincent Delespaux

[Medepromotor: Prof. Dr. Ir. Luc Duchateau]

Literatuurstudie in het kader

van de Masterproef

De auteur en de promotor geven de toelating deze literatuurstudie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen hiervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van gegevens uit deze studie. Het auteursrecht betreffende de gegevens vermeld in deze literatuurstudie berust bij de promotor(en). De auteur en de promotor(en) zijn niet verantwoordelijk voor de behandeling en eventuele doseringen die in deze studie geciteerd en beschreven zijn.

Voorwoord

Graag had ik hier even de mogelijkheid aangegrepen om enkele mensen te bedanken. Mensen zonder wie die werk nooit was geworden zoals het nu voor u ligt.

Eerst en vooral zou ik uw herinnering aan prof. Peter Van den Bossche willen oproepen. Deze man gaf mij niet alleen de kans om tot in Ethiopië te reizen, hij stond mij ook ten aller tijde bij met informatieve en bijna vaderlijke raad, altijd vergezeld van de correcte dosis humor uiteraard. Ik zal nooit vergeten dat hij mij, voor wij naar het veld vertrokken, de raad gaf om “ver uit de buurt van die koeien te blijven”, “en dan vooral uit de buurt van hun gigantische hoornen”. Professor Peter, bedankt!

Dr. Vincent Delespaux, de man die verantwoordelijk is voor een groot deel van de referenties in dit werk en die mij bovendien met nooit aflatend enthousiasme nóg eens wou uitleggen hoe dat nu precies zat met die PCR's. Ondanks het feit dat hij het heel druk had en vaak aan de andere kant van de wereld vertoefde, eindigden zijn mails steeds met “en wees niet bang om nog eens te mailen als je het niet begrijpt”. Vincent, hartelijk bedankt!

Dr. Moti, the best fisherman I've ever known. Always busy, always taking care and never too tired for a joke. If I think back to the baby mice, to “Moti's playground “ and to all your hard work, I can see the man who was a friend and a teacher for me at a time when I needed them the most. Moti, God bless you. Amasakkenelluh!

Prof. Dr. Ir. Duchateau, als verantwoordelijke voor het “Tryps project” in Merelbeke. Bedankt dat u voor mij prof. Peter gecontacteerd hebt, zelfs al was ik eigenlijk al te laat met mijn aanvraag. Uw verhalen over malaria en “met de rugzak naar Afrika” hebben mijn interesse, ook op niet academisch niveau, zeker gewekt.

Prof. Dr. Ir. Janssens, zonder wie het allemaal zelfs nooit begonnen zou zijn. En simpele mail van u bezorgde mij een grootse ervaring. Bedankt!

Prof. Dorny, prof. Vercruysse en prof. Büscher, zij het in het veld of in Jimma zelf. Het was duidelijk dat hard werk en ontspanning perfect combineerbaar waren. De relatie prof-student kreeg voor mij een nieuwe dimensie.

Prof. Büscher and dr. Fikru, thank you for the Debre Zeit coöperation. Thank you for your work in the field and for helping us when we were short in material.

En ten slotte, maar zeker niet in het minst: beste leden van de “Jimma crew”, Belgen en Ethiopiërs, bedankt voor de steun, voor het plezier, voor de ervaring! Dit was nog eens wat he? Onze rondtrek-reisjes, onze cultuurverschillen en -gelijkenissen, ik koester de mooiste herinneringen aan ons Afrikaans avontuur.

Inhoudsopgave

Samenvatting	
1. Inleiding	3
2. Literatuurstudie	4
2.1. Trypanosomiasis algemeen	4
2.1.1. Voorkomen en belang van trypanosomiasis in Afrika	4
2.1.2. Symptomen van trypanosomiasis in runderen	6
2.1.3. Prevalentie van de verschillende <i>Trypanosoma</i> species in runderen	7
2.2. Ethiopië, de Ghibe vallei	7
2.2.1. Trypanosomiasis in Ethiopië	7
2.2.2. Runderen in Ethiopië	8
2.2.2.1. Belang	8
2.2.2.2. Rassen	8
2.2.3. De Ghibe vallei	10
2.2.3.1. Het gebied	10
2.2.3.2. Klimaat	10
2.2.3.3. Tseetseevliegen in de Ghibe vallei	11
2.2.3.4. <i>T. congolense</i> in de Ghibe vallei	12
2.2.3.5. Invloed van klimaat op de vectoren en op trypanosomiasis	13
2.3. Diagnose trypanosomiasis	14
2.3.1. Microscopisch	14
2.3.2. Serologisch	15
2.3.3. Moleculaire testen	15
2.4. De bestrijding van dierlijke trypanosomiasis	16
2.4.1. Preventief	16
2.4.1.1. Tseetsee-vallen	17
2.4.1.2. Pour-on	17
2.4.1.3. SIT (steriele insecten techniek)	18
2.4.1.4. Trypanotolerante rassen	19
2.4.1.5. Vaccineren?	20
2.4.2. Curatief	22
2.5. Resistentie bij de trypanosomen	23
2.5.1. Schetsen van het probleem	23
2.5.2. Mogelijke oplossingen	26
2.5.2.1. Trypanociden combineren	26
2.5.2.2. Combinatie van het trypanocide en een antibioticum gebruiken	27
2.5.2.3. Controle van de tseetsee-populatie	28
2.5.2.4. Trypanotolerante dieren	28
2.5.2.5. Trypanociden correct gebruiken	28
2.5.2.6. Een nieuw product	29
3. Doelstelling van het onderzoek	30
4. Materiaal en methode	31
4.1. Tijd en plaats van staalname	31
4.2. Data collectie in het veld	33
4.2.1. Collectie runderbloed	33
4.2.2. Microscopische controle runderbloed	34
4.2.3. Maatregelen in geval van trypanosomiasis	37
4.3. Data verwerking in het labo	38
4.3.1. PCR-RFLP-controle van het runderbloed	38

4.3.2.	Opvolging van de muizen.....	38
4.3.3.	Collectie positief muizenbloed.....	39
4.3.3.1.	Collectie bloed uit het hart van de muis.....	39
4.3.3.2.	Stabilaatproductie voor bewaring in vloeibare stikstof.....	40
4.3.4.	Resistentietesten.....	42
4.3.5.	PCR testen.....	43
4.3.6.	RFLP: Restriction Fragment Length Polymorfism.....	44
5.	Resultaten.....	46
5.1.	Bloedname runderen.....	46
5.2.	Positieve muizen.....	49
5.3.	Resistentietesten.....	49
5.4.	PCR-RFLP.....	51
6.	Discussie.....	54
6.1.	<i>T. congolense</i> in runderen.....	54
6.2.	<i>T. congolense</i> in de muizen.....	56
6.3.	Conclusie.....	58
7.	Referenties.....	59

Samenvatting

Het doel van deze studie was om, aan de hand van muismodellen, de prevalentie van resistente *T. congolense* te achterhalen bij besmette runderen in het gebied van de Ghibe vallei, Ethiopië.

In verschillende gebieden binnen deze vallei werd van 411 runderen bloed verzameld. Dit bloed werd in het veld microscopisch gecontroleerd en indien men dacht dat er *T. congolense* aanwezig was, werden drie muizen intraperitoneaal met het runderbloed ingespoten. De stammen die bij de muizen infectie veroorzaakten werden geïsoleerd en gebruikt om a) stabilaten van te maken die bewaard werden in vloeibare stikstof en later gebruikt kunnen worden voor verder onderzoek en b) om resistentietesten op te zetten.

Microscopisch werd in het runderbloed een prevalentie van 6.1% voor *T. congolense* gevonden. Echter, latere PCR analyse van deze 411 bloedstalen toonde voor dit species een prevalentie van 17.8%.

Uit de resultaten van resistentietesten die nadien op de muizen uitgevoerd werden, bleek dat slechts 3.7% van de behandelde muizen genas. Maar aangezien het nooit gebeurde dat de zes muizen, die geïnoculeerd waren met hetzelfde bloed en dezelfde behandeling hadden ondergaan, allen genazen, werden alle stammen uit de proef als resistent beschouwd. Ook op PCR-RFLP analyse bleek dat alle trypanosomen die infectie veroorzaakten bij de muizen a) van het *T. congolense* savannah type waren en b) dat zij allen resistent waren tegen diminazene.

Als conclusie zou men hier kunnen stellen dat resistentie van trypanosomen tegen dimenazene en isometamidium een feit is en dat verder onderzoek en investeringen nodig zijn om dit probleem onder controle te krijgen.

Sleutelwoorden: Ghibe vallei, Ethiopië – Prevalentie – Resistentie – Rundvee – *T. congolense*

Summary

The purpose of this study was to investigate the prevalence of resistant *T. congolense* in the infected cattle of the Ghibe valley, Ethiopia. This was done, based on mouse models.

In different regions of this valley, blood of 411 cows was taken. This blood was checked in the field under the microscope and if one thought that it was infected with *T. congolense*, three mice were injected intraperitoneally with the blood. The strains that were able to infect the mice, were isolated and used to a) make stabilates that were kept in liquid nitrogen and later on can be used for further investigation and b) to perform the resistance tests.

Microscopically a prevalence of 6.1% was found for *T. congolense*. Yet PCR analysis showed that, for this species, 17.8% of the cattle was positive.

The results of the resistancetests performed on the mice, showed that only 3.7% of the treated mice was able to recover from the infection. Since it never appeared that the six mice, inoculated with the same blood and treated with the same drug, healed all, none of the used strains was confirmed to be sensitive. PCR-RFLP analysis learned us that all the trypanosomes that caused infection in mice were a) of the *T. congolense* savannah type and b) were resistant for diminazene.

There can be concluded that resistance of *T. congolense* for dimenazene and isometamidium is a fact and that further investigation and investments are necessary to get this problem under control.

Key words: Cattle - Ghibe valley, Ethiopia - Prevalence - Resistance - *T. congolense*

1. Inleiding

Trypanosomiasis is een ziekte die veroorzaakt wordt door trypanosomen. Dit zijn flagellaire bloedparasieten die overgedragen worden door de tseetseevlieg. Deze ziekte komt voor bij mens en dier en veroorzaakt symptomen zoals lethargie, verminderde productie, bloedarmoede en uiteindelijk zelfs sterfte. Het *Trypanosoma* species dat in Afrika de meeste problemen veroorzaakt bij rundvee is *T. congolense*.

Er bestaan verschillende manieren om deze ziekte te bestrijden, preventieve en curatieve. Echter, de gebruikte geneesmiddelen, (1) isometamidium, (2) diminazene en (3) homidium, vertonen doorheen de geschiedenis een afnemende werking. Dit is een gevolg van het ontstaan van resistentie bij de trypanosomen tegen deze courant gebruikte trypanociden.

In deze studie wordt het probleem bestudeerd in de Ghibe vallei, Ethiopië. In dit gebied worden voornamelijk runderen gehouden die verwant zijn aan het trypanosensitieve Zebu ras. De mensen in dit gebied leven voornamelijk van de veehouderij, waardoor dit probleem voor hen van zeer groot belang is.

Er bestaan alternatieve manieren om deze ziekte te bestrijden, maar geen van hen is zonder nadeel. Het inkruisen van trypanotolerant vee zou een duurzame oplossing kunnen brengen, ware het niet dat de lokale veehouders hier weigerachtig tegenover staan. Een betere preventieve aanpak door een reductie van de tseetsee-populatie zou de grootte van het probleem terug kunnen schroeven, maar voor de dieren die toch nog aangetast worden, blijft het probleem bestaan.

Het ontwikkelen van een nieuw curatief product, dat goedkoop genoeg is en waartegen nog geen resistentie bestaat, zou voor deze mensen waarschijnlijk de meest wenselijke oplossing zijn. Echter, farmaceutische bedrijven zien geen potentieel in de Afrikaanse afzetmarkt en laten dit probleem links liggen.

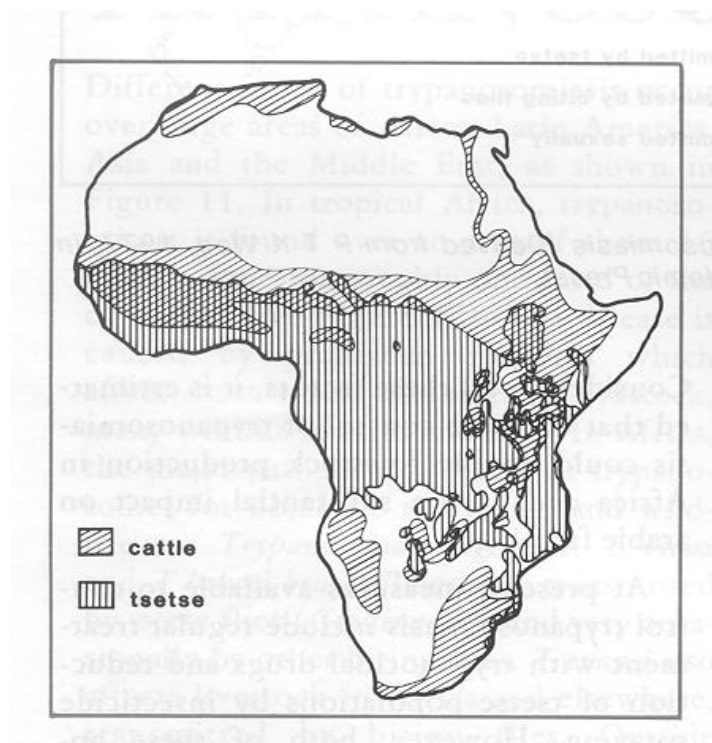
2. Literatuurstudie

2.1. Trypanosomiasis algemeen

2.1.1. Voorkomen en belang van trypanosomiasis in Afrika

Trypanosomiasis zorgt jaarlijks voor grote verliezen op de inkomsten van de Afrikaanse veehouders. In **1999** zorgde deze ziekte in Afrika, zowel bij producenten als bij consumenten, voor een verlies van 1,34 miljard US\$ (Kristjanson *et al.*, 1999). Budd raamde de jaarlijkse economische verliezen ten gevolge van deze ziekte veel hoger, namelijk op 4,5 miljard US\$ (1999). Deze parasiet kwam toen voor in 37 Afrikaanse landen, samen 7 miljoen km². Binnen dit grote gebied vormde trypanosomiasis een bedreiging voor ongeveer 60 miljoen runderen (Kristjanson *et al.*, 1999).

Tien jaar later rapporteert Ilemobade een risicogebied van 10 miljoen km² (wat een derde is van het hele Afrikaanse continent) waarin 48 miljoen runderen een kans op infectie lopen (Fig. 1). Hij schrijft dat alleen al de productieverliezen ten gevolge van deze ziekte, 1 à 1,2 miljard US\$ per jaar bedragen (2009).

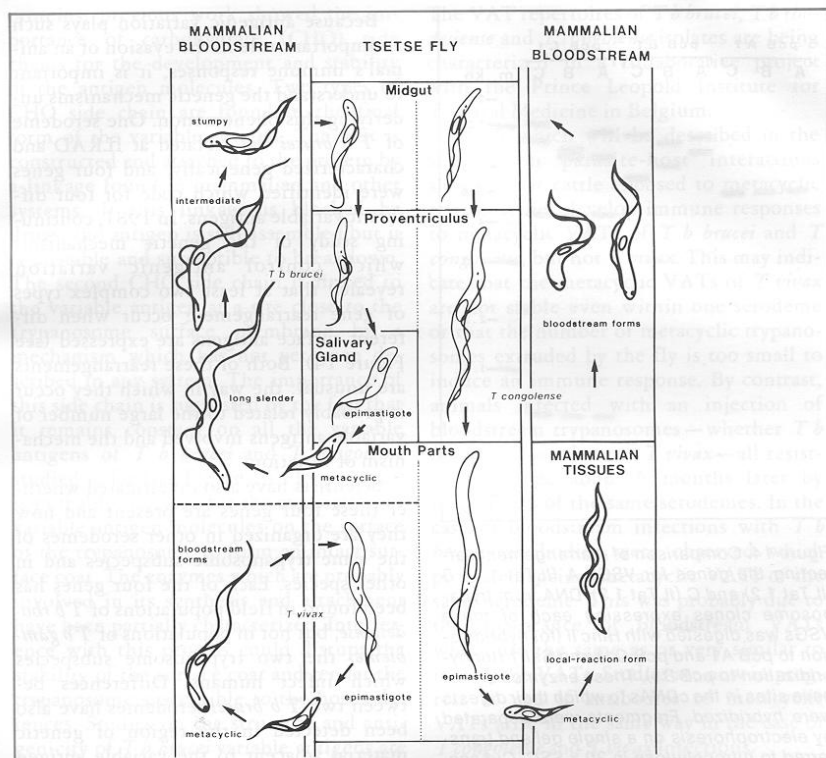


Figuur 1: Verdeling van gebieden met een hoge veeproductie enerzijds en van gebieden waarin tsetseevliegen voorkomen anderzijds. Slechts in enkele gebieden van West en Centraal Afrika gaan beide samen. Dit is mogelijk doordat hier trypanotolerante rassen, zoals N'Dama en West African Shorthorn, gehoed worden (ILRI (a), n.d.).

Het totaal verlies dat door deze ziekte veroorzaakt wordt, blijkt vooral een gevolg van kosten voor diagnose en behandeling, het terugvallen van de melk-, kalf- en vleesproductie, verminderde trekkracht, reductie van de beschikbare productiegebieden en ten slotte sterfte in de veestapel. Jaarlijks sterven zo een 3 miljoen runderen aan trypanosomiasis (Mattioli *et al.*, 2004).

Vooral *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, en *T. brucei brucei* zijn, in volgorde van belang, hiervoor verantwoordelijk. Alle drie deze **species** (uitgezonderd enkele *T. vivax* soorten die ook mechanisch kunnen overgedragen worden) worden overgedragen door tsetseevliegen (*Glossina spp.*), waarin zij obligaat enkele stadia van hun levenscyclus doorlopen (Fig. 2) (Geerts, 2001).

Op basis van moleculaire verschillen kan *T. congolense* in vier verschillende **subgroepen** ingedeeld worden: Savannah, Forest, Kilifi en Tsavo (Hide en Tait, 2004). Van deze vier toont *T. congolense* savannah zich de meest virulente, zowel voor runderen als voor muizen (Bengaly, 2002a,b). Echter, uit onderzoek van Masumu *et al.* (2006) bleek dat binnen deze subgroep de virulentieniveaus even uiteenlopend kunnen zijn als tussen twee verschillende subgroepen.



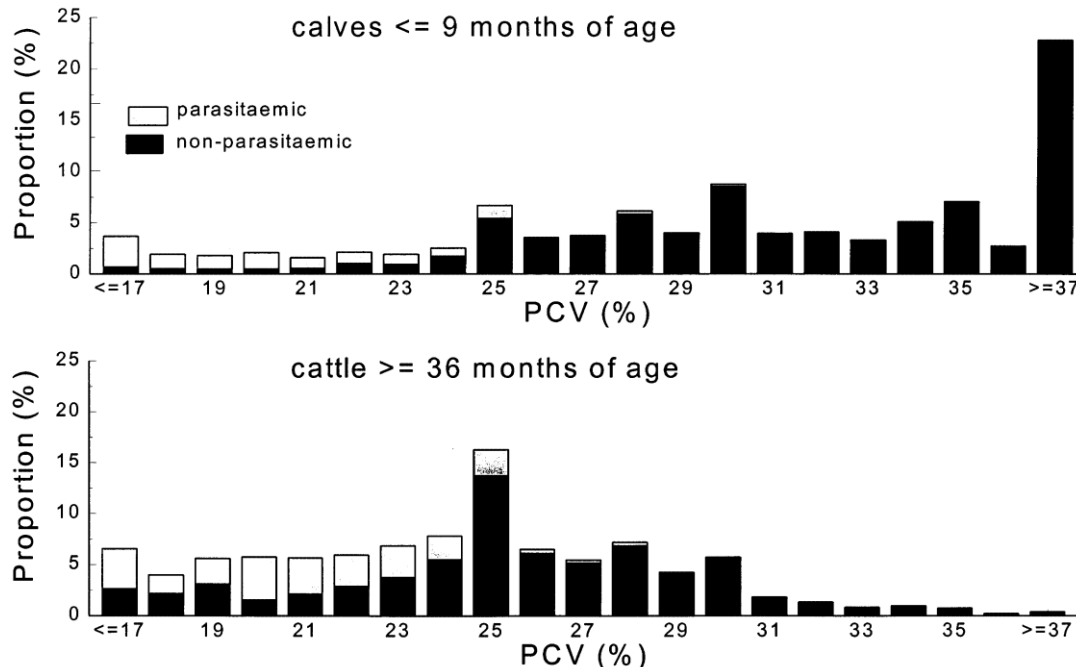
Figuur 2: Levenscyclus van *T. congolense*, *T. vivax* en *T. brucei brucei* (ILRI(a), n.d.).

Toch veroorzaken deze parasieten niet overal in Afrika problemen. Sommige West Afrikaanse rassen, zoals N'Dama en Baoulé (*Bos taurus*), zijn **trypanotolerant**. Dit wil zeggen dat deze dieren, op voorwaarde dat zij continu blootgesteld blijven aan *Trypanosoma* infectie, minder uitgesproken symptomen vertonen. Vooral de anemie blijft bij deze dieren beter gecontroleerd (d'Ieteren *et al.*, 1998) en zij kunnen ook langer hun productieniveau behouden. Dit in tegenstelling tot **trypanosensitieve** rassen zoals de Zebu en de Boran (*Bos indicus*) (Courtin *et al.*, 2008). Toch worden ook bij sommige rassen uit het zuidwesten van Ethiopië soms individuen met trypanotolerante eigenschappen gezien (Lemesha *et al.*, 2006).

2.1.2. Symptomen van trypanosomiasis in runderen

Een groot deel van de natuurlijke *Trypanosoma* infecties verloopt **asymptomatisch** en veel van de besmette dieren functioneren louter als carrier voor één of meerdere parasieten die pathogeen zijn voor andere diersoorten (Cox *et al.*, 2010). Echter, *T. congolense* en *T. vivax* (en in verwaarloosbare mate *T. brucei brucei*), de pathogene species voor vee, veroorzaken **symptomen** die samengaan met algemeen wegwijnen zoals: lethargie, verlies van eetlust, gewichtsverlies,... (Rowlands *et al.*, 2001). Deze symptomen kunnen, indien deze dieren niet adequaat geholpen worden, resulteren in verminderde melk- en vleesproductie, minder vruchtbaarheid en uiteindelijk sterfte (Courtin *et al.*, 2008; Delespaux *et al.*, 2010).

Een ander symptoom, waar diagnostisch veel waarde aan gehecht wordt, is het dalen van de PCV (Packed Cell Volume), die de verhouding tussen het volume erythrocyten en het totale bloedvolume weergeeft. Normaal verwachten we voor Zebu runderen een PCV **tussen 24 en 46%** (Mihret en Mamo, 2007). Hoe lager de PCV in de kudde, hoe groter het percentage parasitemische dieren (Van den Bossche en Rowlands, 2001). Zo is, bij de volwassen dieren die geïnfecteerd zijn met *T. congolense*, de PCV gemiddeld **20,9%**. Voor dieren geïnfecteerd met *T. vivax* is dit gemiddeld **22,4%**. Aan de andere kant hadden 92% van de dieren, die besmet waren met *T. congolense*, een PCV onder de 26% (Rowlands *et al.*, 2001). Hieronder wordt, bij verschillende PCV waarden, weergegeven hoeveel procent van die dieren besmet zijn met trypanosomiasis (Fig. 3).



Figuur 3: De verdeling van de PCV's voor kalveren jonger dan negen maand en runderen ouder dan drie jaar. Binnen elke PCV waarde is de verhouding tussen parasitemische en niet-parasitemische dieren weergegeven. De bloedstalen werden verzameld in de Ghibe vallei, Ethiopië tussen april 1994 en februari 1998 (Rowlands *et al.*, 2001).

2.1.3. Prevalentie van de verschillende *Trypanosoma* species in runderen

Uit verschillende artikels blijkt duidelijk dat trypanosomiasis een vaak voorkomend probleem is in vele streken in Afrika en dat *T. congolense*, doorheen de jaren, de meest voorkomende pathogene species is voor vee (Robson en Ashkar, 1972; Leak, 1996; Rowlands *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2010).

Enkele voorbeelden:

Op basis van bloeditstrijkjes onder de microscoop vonden Robson en Ashkar tussen augustus 1967 en april 1968 de volgende prevalenties in de Lambwe vallei in **Kenia**: 17% van de runderen was besmet met één of meerdere pathogene trypanosomen species, waarvan 9,6% met *T. congolense*, 6,6% met *T. vivax* en 4,8% met *T. brucei brucei* (Robson en Ashkar, 1972).

Na herhaaldelijk testen van vijfendertig bloedstalen uit **Oeganda** door middel van PCR analyse, bekwamen Cox *et al.* een prevalentie van 42,9% voor *T. congolense*, 34,3% voor *T. brucei brucei* en 22,9% voor *T. vivax*. Zij wijten deze hoge prevalenties aan het feit dat in andere testen telkens slechts één test per staal werd uitgevoerd en dat de prevalenties aldus onderschat werden (zie later) (Cox *et al.*, 2010).

De prevalentie van *Trypanosoma* in een kudde is niet enkel afhankelijk van de **infectiedruk**, maar ook van de leeftijd van de dieren, het geslacht, het ras en de periode (jaar en seizoen) (Rowlands *et al.*, 2001; Lemesha *et al.*, 2006). **Stieren** werden vaker positief getest voor *T. congolense* dan koeien, maar er was geen verschil merkbaar tussen de geslachten voor *T. vivax*. De reden hiervoor wordt niet gegeven in het artikel. Het was duidelijk dat kalveren, jonger dan negen maand, minder vaak besmet waren met *T. congolense* of met *T. vivax*, dan **oudere dieren**. Dit verschil is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de dieren pas op deze leeftijd bij de kudde op het grasland komen (Rowlands *et al.*, 2001). Het verschil in prevalentie tussen de **rassen** is te wijten aan de verschillende niveaus van trypanotolerantie (zie later) (Lemesha *et al.*, 2006). En ten slotte is de variatie over de **seizoenen** te wijten aan het feit dat de prevalentie van de tseetseevliegen varieert met de regenval in een bepaalde maand (zie later) (Leak, 1996).

2.2. Ethiopië, de Ghibe vallei

2.2.1. Trypanosomiasis in Ethiopië

Trypanosomiasis is één van de grootste hindernissen op de ontwikkeling van vee- en landbouwproductie in Ethiopië. Dit heeft zowel zijn weerslag op de capaciteit van het land om zelf in zijn voedselproductie te voorzien als op de algemene ontwikkeling. Tseetsee-overdraagbare trypanosomen komen voor op 180000 tot 200000 km² (dit komt overeen met een zesde van heel Ethiopië) van de beschikbare landbouwgebieden in het westen en het zuidwesten van dit land. Hierin lopen 14 miljoen runderen, evenveel kleine herkauwers, bijna 7 miljoen paarden en 1,8 miljoen kamelen risico op infectie met deze parasiet (Lemesha *et al.*, 2006).

Uit de resultaten van een vragenlijst aan de veehouders in het zuidwesten van Ethiopië, blijkt dat de grote meerderheid “ziekten” als voornaamste bedreiging voor hun runderen ziet. En binnen de frequent voorkomende ziekten wordt “trypanosomiasis” meestal als voornaamste ziekte aangehaald (Stein *et al.*, 2009).

2.2.2. Runderen in Ethiopië

2.2.2.1. Belang

Vee speelt een zeer belangrijke rol in het Ethiopisch leven. In 1987 werd geschat dat veehouderij één derde van het landbouwaandeel in het Bruto Binnenlands Product (BBP) uitmaakte. Wat overeenkomt met 15% van het totale BBP. Dit getal onderschat waarschijnlijk sterk de werkelijke waarde. In de rurale gebieden heeft immers bijna elk individu met vee te maken. Het is niet moeilijk te geloven dat vele belangen van vee over het hoofd gezien werden. Zij zorgen niet alleen voor vlees en melk, maar ook voor trekkracht, transport, brandstof en, in sommige gebieden, voor sociaal aanzien (Ofcansky en LaVerle, 1991).

2.2.2.2. Rassen

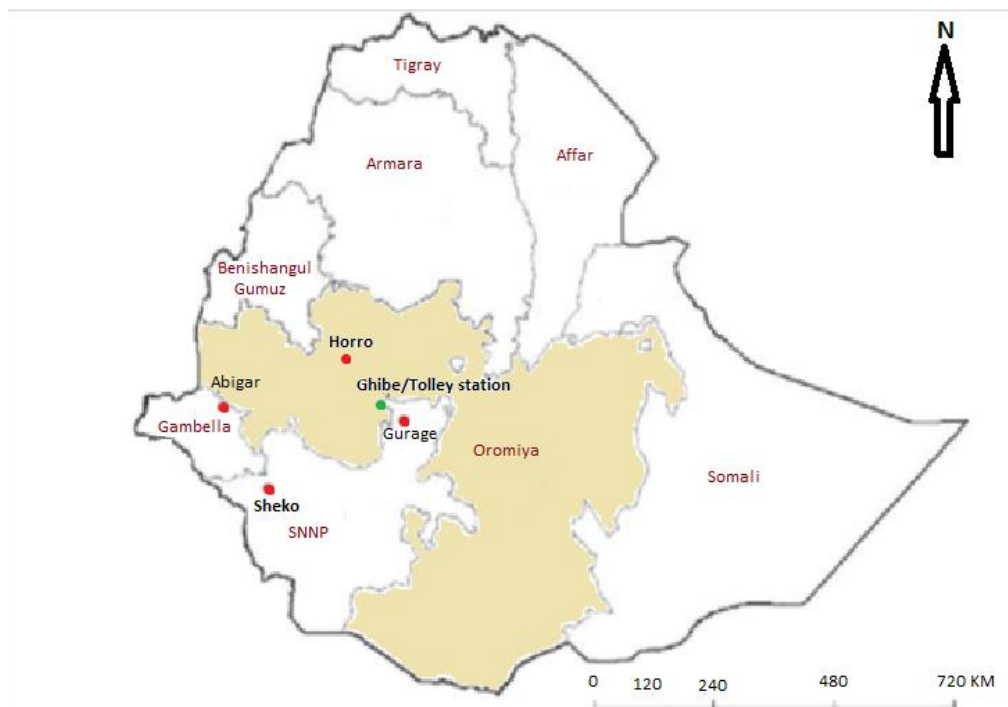
Er zijn vier rassen die het overgrote deel van het vee in zuidwest Ethiopië uitmaken. Ten eerste is er de **Abigar**, waarbij af en toe trypanotolerantie waargenomen wordt. Vervolgens is er de **Sheko**, dit ras is van hetzelfde type als de trypanotolerante N'Dama, wat de hypothese dat de Sheko zelf ook trypanotolerant zou zijn, in zeker mate bijvalt. Ten derde is er de **Horro**, een kruising tussen de Sanga en de Zebu. Deze dieren zijn door de band gevoelig voor trypanosomiasis, maar soms vindt men toch een dier dat trypanotolerante eigenschappen vertoont. En ten slotte is er de **Gurage**, een Oost Afrikaans Zebu ras. Gurage runderen zijn ook gevoelig voor trypanosomiasis, zeker als er een hoge infectiedruk heerst. De runderen in de Ghibe vallei zijn een mengeling van deze vier, maar vooral het Horro en het Gurage ras zijn hier aanwezig (Fig. 4) (Lemecha *et al.*, 2006).



Figuur 4: Runderen in de Ghibe vallei.

Uit de antwoorden op een vragenlijst van Stein *et al.* blijkt dat 88% van de Horro veehouders en 65% van de Gurage veehouders, “**ziekten**” onder de dieren als grootste belemmering van de productie ziet. Een minderheid van de Horro-houders noemde “voedseltekort” of “overbevolking” van het beschikbare grasland de grootste belemmering voor de productie. Doch, voor 28% van de Gurage houders was dit te wijten aan voedsel- of watertekort (Stein *et al.*; 2009). In hoeverre dit overlapt met overbevolking wordt in het artikel niet vermeld. Vervolgens geeft 72% van de Horro bezitters en 78% van de Gurage bezitters aan dat “**trypanosomen**” het grootste probleem binnen de “veelvoorkomende ziekten” veroorzaken (in vergelijking met 53% bij de Sheko houders en 33% bij de Abigar houders). Verder werden ook “plotselinge dood”, “ectoparasieten” en “miltvuur” als belangrijke aandoeningen gemeld (Stein *et al.*, 2009). In Fig. 5 worden de verschillende plaatsen waar de vragen gesteld werden weergegeven. Er werden enkel veehouders geïnterviewd die geen andere runderen dan het betreffende ras bezaten.

Van de vier genoemde rassen toont de Sheko zich het minst gevoelig aan infectie met trypanosomen. Toch blijkt dat het Horro ras het best reageert op de curatieve behandeling. Ondanks dezelfde PCV's en dezelfde behandelingen kwam, binnen dit ras, minder mortaliteit voor. Dit duidt er waarschijnlijk op dat dit ras beter met anemie en de daarbij horende stress kan omgaan (Lemesha *et al.*, 2006). Of het langer duurde voor de andere rassen een dergelijk lage PVR bereikten, wordt in het artikel van Lemesha *et al.* niet vermeld.



Figuur 5: Dorpen waar het onderzoek betreffende de verschillende runderrassen uitgevoerd werd (naar Lemesha *et al.*, 2006).

2.2.3. De Ghibe vallei

2.2.3.1. Het gebied

De stalen voor dit onderzoek werden verzameld in de Ghibe vallei (8°N, 37.5°E). Dit gebied ligt tussen Jimma en Addis Ababa, op 183 km ten zuidwesten van deze laatste. Door de vallei, die een oppervlakte van 135 km² beslaat (Rowlands *et al.*, 2000), loopt de Ghibe rivier (Fig. 6) die een zijstroom is van de Omo rivier (Leak, 1996).

De valleiflanken bestaat vooral uit savanne waarop *Acacia spp.* en *Combretum spp.* het grootste deel van de vegetatie uitmaken. Ongeveer 2000 ha (= 20km²) van dit grasland wordt gebruikt om vee op te laten grazen en voor het oogsten van hooi (Lemesha *et al.*, 2006).



Figuur 6: (links) De ligging van de Ghibe vallei in Ethiopië. (rechts) De Ghibe vallei.

2.2.3.2. Klimaat

Dit gebied heeft een gematigd warm klimaat en er valt gemiddeld zo een 1100mm regen per jaar met weinig verschil tussen de jaren onderling (Lemesha *et al.*, 2006). Er heerst een droogseizoen van november tot februari en twee regenseizoenen. Er is een lang regenseizoen vanaf eind mei tot oktober, met een piek in juni tot augustus en een kort regenseizoen in maart en april. Algemeen worden de laagste temperaturen bereikt in juni en augustus en de hoogste vanaf oktober tot mei (Rowlands *et al.*, 2001).

2.2.3.3. Tsetseevliegen in de Ghibe vallei

We vergelijken hieronder (Tabel 1) drie onderzoeken die de *Glossina* populatie in de Ghibe vallei in kaart wilden brengen. Het ene onderzoek werd tien jaar eerder (Leak, 1996) uitgevoerd dan de andere twee (Lemecha *et al.*, 2006; Negash *et al.*, 2007) en de onderlinge resultaten blijken sterk verschillend.

Tabel 1: Eigenschappen van de gebruikte vallen in de drie besproken studies en de periode waarin deze studies plaatsvonden (naar Leak, 1996; Lemecha *et al.*, 2006; Negash *et al.*, 2007).

Onderzoeker(s)	Periode	Toegevoegde geur aan de val	Vorm van de val
Leak	1986-1990 (50 maanden)	Geen	Biconisch
Negash <i>et al.</i>	Okt 2000 – Sept 2001	Aceton en runderurine	Monoconisch
Lemesha <i>et al.</i>	Okt 2000 – Okt 2004	Runderurine	Biconisch

Al deze onderzoekers vonden de volgende tsetsee-species in de Ghibe vallei: *G. m. submorsitans*, *G. pallidipes* en *G. f. fuscipes* (Fig. 7). Leak en Negash vermelden dat zij meer vliegen vingen tijdens het droogseizoen dan tijdens het regenseizoen (Leak, 1996; Negash *et al.*, 2007).

Leak vond geen enkele *G. m. submorsitans* in het Ghibe gebied (hij vond er wel 16 in een ander, nabijgelegen gebied). Dit in tegenstelling tot **Negash *et al.*** die gemiddeld 4.26 ± 0.49 ***G. m. submorsitans*** vliegen per val per dag ving. Hiervan werden er 450 gedetermineerd en bij ongeveer 5% werd een infectie met *Trypanosoma* waargenomen (*T. congolense* (57.1%), *T. vivax* (38.1%) en *T. brucei* (4.8%)) (Negash *et al.*, 2007).

Verder vond **Leak** in 50 maanden 7577 *G. pallidipes*, goed voor een gemiddelde van 1.42 vliegen per val per dag en 1656 *G. fuscipes*, goed voor gemiddeld 0.29 vliegen per val per dag.

Van de *G. pallidipes* was 3.6% geïnfecteerd met *Trypanosoma* (59% *T. congolense*, 37% *T. vivax*, 4% *T. brucei*), dit was bij de *G. fuscipes* slechts 1.2% (44% *T. congolense*, 56% *T. vivax*, 0% *T. brucei*). Leak analyseerde zijn bekomen gegevens en concludeerde dat ***G. pallidipes*** de belangrijkste vector is voor pathogene *Trypanosoma* species in het Ghibe gebied (1996).

Lemesha *et al.* vonden gemiddeld 0.4 vliegen per val per dag. Van de onderzochte vliegen droeg 5.7% een *Trypanosoma* species met zich mee. *T. congolense* was de meest voorkomende van de drie, maar exacte cijfers worden niet gegeven. Verder melden zij een verschuiving tussen 2000 en 2004 van *G. f. fuscipes* als meest voorkomende *Glossina* species naar ***G. pallidipes***. Hieronder worden de gevonden prevalenties voor de verschillende *Glossina* species weergegeven samen met hun gemiddelde infectiegraad met *Trypanosoma* (Tabel 2).

Tabel 2: De gemiddelde prevalentie (in vliegen/(val x dag)) van de verschillende *Glossina* species volgens de verschillende studies en de infectiegraad die door de verschillende onderzoekers in de vliegen gevonden werd (naar Leak, 1996; Lemesha *et al.*, 2006; Negash *et al.*, 2007).

Onderzoeker(s)	<i>G. pallidipes</i>	<i>G. f. fuscipes</i>	<i>G. m. submositans</i>	<i>Trypanosoma</i> prevalentie in de onderzochte vliegen.
Leak	1.42	0.29	Geen	1.2% - 3.6%
Negash <i>et al.</i>	Niet gegeven	Niet gegeven	4.26 ± 0.49	5%
Lemesha <i>et al.</i>	0.26	0.12	0.02	5.7%

De oorzaak van dit grote verschil in waargenomen prevalentie van *G. m. submositans* tussen enerzijds de studie van Negash *et al.* en anderzijds de studies van Leak en Lemesha *et al.* is onduidelijk. Misschien is dit een gevolg van de verschillende geuren van de tsetsee-vallen die in de drie studies gebruikt werden.



Figuur 7: Van links naar rechts: *G. pallidipes*, *G. f. fuscipes* en *G. m. submositans*

(Steven Mihok, n.d.; S.O.S., n.d.; Meyers Lexicon, n.d.).

2.2.3.4. *T. congolense* in de Ghibe vallei.

T. congolense is de meest voorkomende *Trypanosoma* species in de Ghibe vallei. Leak vond in 1996 uit de onderzoeken die hij hier tussen **januari 1986 en april 1990** verricht had, dat 84% van de dieren met trypanosomiasis geïnfecteerd waren met *T. congolense*. Voor dieren jonger dan 24 maanden was dit slechts 71%. Deze cijfers werden bekomen na microscopische inspectie (Leak, 1996).

Lemesha *et al.* (2006) zagen dat, in de eerste acht maanden (**september 2000 tot april 2001**) waarin nieuwe, *Trypanosoma* vrije dieren blootgesteld werden aan besmette tsetseevliegen, *T. vivax* het meest voorkomende species was, gevolgd door *T. congolense*. Echter, na deze periode sloeg de verhouding om en werd *T. congolense* in meer dan 60.0% van de gevallen herkend.

2.2.3.5. Invloed van klimaat op de vectoren en op trypanosomiasis.

Leak heeft gezocht naar een relatie tussen de neerslag per maand en het voorkomen van tsetseevliegen in die maand. Hij kwam tot de constatactie dat de tsetsee-densiteit afnam naarmate de regenval toenam. Aldus werd de **grootste tsetsee-densiteit opgemerkt tijdens het droogseizoen**. Zijn analyses toonden aan dat er in dezelfde maand er een significante ($P < 0,01$; $r = 0,40$) negatieve correlatie bestond tussen deze twee parameters (m.a.w.: meer regen geeft minder vliegen). Ook met de maand voordien (als de tsetsee-densiteit gelinkt wordt met de regenval in de maand daarvoor) was er een kleine significante ($P < 0,05$; $r = 0,29$) negatieve correlatie (Leak, 1996). Hieronder wordt een foto weergegeven van "lake Boye", Jimma (Fig. 8). De foto werd genomen op 12 augustus 2010. Op dit moment was het lange regenseizoen nog bezig, dus waren er relatief weinig tsetseevliegen in vergelijking met het droogseizoen dat twee maanden later startte.

Leak analyseerde ook de correlatie tussen de mate van blootstelling van runderen aan tsetseevliegen en de prevalentie van trypanosomiasis in dit vee. Hij ondervond dat zowel in dezelfde maand ($P < 0,001$; $r = 0,47$) als wanneer de trypanosomiasis pas in de volgende maand ($P < 0,001$; $r = 0,60$) bekeken werd, er een significante positieve correlatie bestond. M.a.w.: er zijn **meer dieren met trypanosomiasis in de maand (na) dat er veel tsetseevliegen waren**. De sterkere correlatie die gevonden werd wanneer men twee opeenvolgende maanden bekeek, kan biologisch verklaard worden door het tijdsinterval tussen het moment waarop de besmette tsetseevlieg het rund bijt en het moment waarop de parasieten voor het eerst detecteerbaar zijn in het bloed. Leak gebruikte de buffy coat techniek (zie later) om parasieten in het bloed onder de microscoop op te sporen (Leak, 1996).



Figuur 8: In augustus, op het einde van het lange regenseizoen, is de prevalentie van de tsetseevliegen relatief laag in vergelijking met het komende droogseizoen.

2.3. Diagnose trypanosomiasis

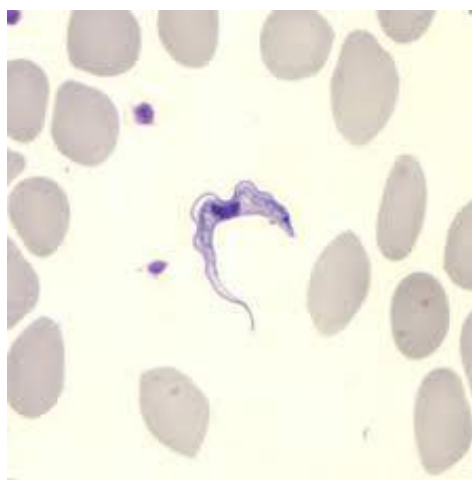
2.3.1. Microscopisch

De diagnose van Trypanosomiasis wordt in Afrika vaak gesteld op basis van microscopische bevindingen. Hiertoe kan rechtstreeks een **bloeduitstrijkje** bekeken worden of kan het bloed eerst gekleurd worden met een **Giemsa kleuring** (Fig. 9) (Picozzi *et al.*, 2002). Robson en Ashkar ondervonden dat, van alle stalen die positief bleken wanneer zowel een bloeduitstrijkje als een Giemsa kleuring bekeken werden, slechts 83.1% of 23.3% hiervan positief bevonden werd indien respectievelijk enkel een Giemsa kleuring of een bloeduitstrijkje zonder kleuring gecontroleerd werd. Zij besloten aldus dat gebruik van deze laatste methode weinig waarde heeft voor de diagnose van boviene trypanosomiasis (Robson en Ashkar, 1972).

Ook onderzoek van vocht uit de **lymfeklieren** bleek relevant. Robson en Ashkar kwamen tot de constatacie dat zij 31.5% van alle *T. vivax* en 7.2% van alle *T. congolense* gemist zouden hebben indien zij de lymfeklieren niet hadden bekeken en hun resultaten enkel hadden gebaseerd op bloeduitstrijkjes (al dan niet Giemsa gekleurd) onder de microscoop (1972).

Verder kunnen ook de **concentratie methoden** gebruikt worden. Hieronder vallen de **Woo methode** (ook de micro hematocriet centrifugatie techniek genoemd) en de **QBC** (quantitative buffy coat) methode. Deze laatstgenoemde methode werd aanvankelijk gebruikt om malaria op te sporen, maar uit een onderzoek van Ancelle *et al.* (1997) blijkt dat deze methode ook zeer goede resultaten heeft bij het diagnostiseren van trypanosomiasis. Dit onderzoek vergeleek de sensitiviteit van de QBC test met die van de Woo test. Het resultaat was dat QBC een sensitiviteit van 95% toonde bij een concentratie van 450 trypanosomen per ml daar waar de Woo-methode pas een sensitiviteit van 95% bereikte bij 7500 trypanosomen per ml. Daarenboven had men bij de Woo methode twee keer zoveel tijd nodig om de diagnose te stellen (Ancelle *et al.*, 1997).

Picozzi *et al.* stellen dat in beide concentratietesten de sensitiviteit sterk afhankelijk is van het aanwezige *Trypanosoma* species. Zij maken hiervoor geen onderscheid tussen beide methoden (2002). Een gemengde infectie of een lage parasitemie maken een accurate meting van de species prevalenties door middel van een microscoop vaak moeilijk tot onmogelijk (Cox *et al.*, 2010).



Figuur 9: Giemsa kleuring (CDC, 2010).

2.3.2. Serologisch

Ook serologisch kan men trypanosomen in het bloed opsporen. Verloo *et al.* hebben de sensitiviteit en de specificiteit van de drie meest gebruikte serologische testen met elkaar vergeleken na het screenen van bloed van waterbuffels uit Noord-Vietnam op de aanwezigheid van *Trypanosoma evansi*. De drie gebruikte testen waren: **CATT/T. evansi** (een directe kaart agglutinatie test), **LATEX/T. evansi** (een indirecte kaart agglutinatie test) en **ELISA/T. evansi** (antistof detectie). De specificiteit was het hoogst in CATT/T. evansi (98%), daarna in ELISA/T. evansi (95%) en was het laagst in de LATEX/T. evansi test (82%). De sensitiviteit bleek maximaal voor CATT/T. evansi en LATEX/T. evansi tot een verdunning van het serum van 1/8. De ELISA/T. evansi test echter bleek bij de verschillende cut-off's (30%, 40% en 50%) de maximale sensitiviteit te behouden (Verloo *et al.*, 2000).

2.3.3. Moleculaire testen

Ten slotte kan men ook moleculaire testen gebruiken om trypanosomen aan te tonen in een bloedstaal. Hierbij is de **PCR-test** (polymerase chain reaction) veruit de voornaamste. Men extraheert het DNA uit de cellen en men voegt een mengsel van buffer, forward en reverse primers en een DNA polymerase enzyme (vb. Taq) aan toe. Wanneer men het geheel vervolgens correct (d.w.z. op nauwgezette temperaturen en tijdstippen (zie Tabel 3)) verschillende cycli laat ondergaan, zal het aantal DNA-strengen, per cyclus, verdubbeld worden. Achteraf kan, door middel van elektroforese, het DNA geïdentificeerd worden (Almeida *et al.*, 1997). Deze methode maakt het niet enkel mogelijk om verschillende trypanosomen species van elkaar te onderscheiden, ze is ook veel gevoeliger dan zowel de serologische als de microscopische technieken (Cox *et al.*, 2010). Over de exacte gevoeligheid van PCR werden verschillende resultaten gepubliceerd: Geysen *et al.* (2003) vonden een sensitiviteit van 25 trypanosomen per ml, daar waar Desquesnes en Dávila (2002) en Cox *et al.* (2005) een sensitiviteit van één trypanosoom per ml bloed vonden. MacLeod en Turner (1997) rapporteerden zelfs dat, onder optimale laboratorium omstandigheden en met zeer zuiver DNA, één enkele trypanosoom in tien ml bloed zou teruggevonden worden.

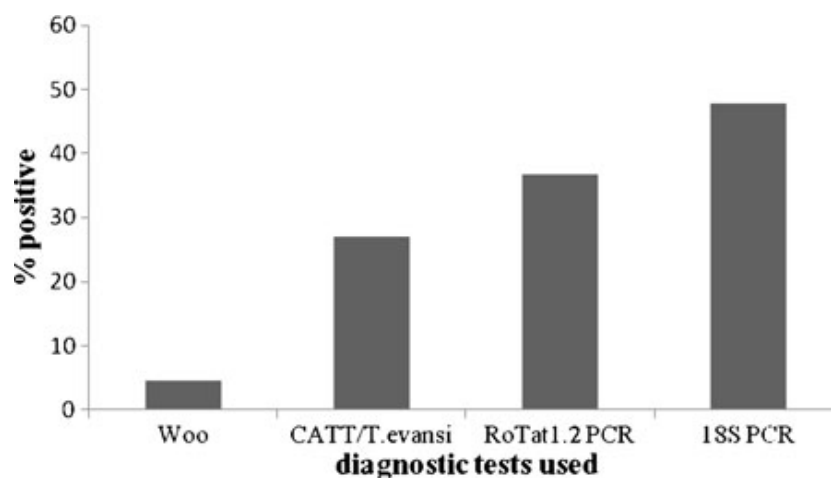
Tabel 3: Verschillende stappen in de PCR-cyclus.

Stappen in de cyclus	Actie	Temperatuur (°C)
Denaturatiestap	Ontdubbelen van de α -helix DNA-streng.	95
Aanhechtingsstap	Aanhechten van de primers op een enkelstrengig stuk DNA.	45 – 65
Verlengingsstap	Extensie van de nieuwe strengen.	72

Eén van de mogelijke PCR methoden is de **ITS-PCR** (internal transcribed spacers). Cox *et al.* merkten op dat, vooral als de parasitemie van het te testen bloed laag is, de sensitiviteit van deze PCR techniek toenam met het aantal keren dat eenzelfde staal onderzocht werd. Zij verklaarden deze bevinding door te berekenen dat voor één ITS-PCR test slechts één microliter bloed nodig was en dat de kans dat dit staal representatief is voor de vele liters bloed in het rund dus te klein was om een diagnose op basis van een éénmalige PCR test te stellen. Hun testen wezen uit dat, om 95% zeker te

zijn dat een positief dier als dusdanig herkend wordt na één ITS-PCR test, er minimum 950 trypanosomen per ml bloed aanwezig moeten zijn. Zij bekwamen een prevalentie van 9,7% na éénmalig testen van elk staal en een prevalentie van 86% na gemiddeld 103,4 testen per staal (Cox *et al.*, 2010).

Ter illustratie is hieronder (Fig. 10) het verschil in trypanosomen detectie weergegeven voor verschillende detectie methoden. Deze tabel berust op de ondervindingen van Gari *et al.* tijdens een onderzoek naar *T. evansi* bij paarden (2010). In deze studie werd, voor elk bloedstaal, elke test slechts één keer doorlopen. De microscopische technieken zijn echter de enige technieken die praktisch haalbaar zijn in het veld. Voor serologische en moleculaire technieken heeft men meestal een labo nodig.



Figuur 10: De prevalentie van dourine in Arsi-Bale highlands in Ethiopië onder verschillende diagnostische testen (Gari *et al.*, 2010).

2.4. De bestrijding van dierlijke trypanosomiasis.

Men kan dierlijke trypanosomiasis op twee verschillende manieren bestrijden. Men kan preventief handelen en proberen voorkomen dat de vector het vee kan bijten of men kan, eens een dier ziek is, proberen dit dier te genezen door het curatief te behandelen.

2.4.1. Preventief

Er bestaan verschillende manieren om trypanosomiasis preventief te bestrijden. Er zijn methodes die gedurende lange tijd aangewend werden maar die men de laatste tien tot twintig jaar steeds minder vaak toepast. Dit komt ofwel doordat ze niet efficiënt werkten of doordat ze zodanig slecht waren voor het milieu dat ze niet langer verantwoord waren. Enkele voorbeelden van zulke bestrijdingsmiddelen zijn: het **kappen van bossen**, **uitroeien van de wilde dieren** in de omgeving of het gebruik van **insecticiden** die gevaarlijke stoffen zoals DDT of dieldrin bevatten en die in de lucht of op de grond gesprayd werden (Leak, 1996). Sinds enkele jaren verkiest men milieuvriendelijker en vooral efficiëntere methoden om trypanosomiasis preventief te bestrijden.

2.4.1.1. Tseetsee-vallen

Het gebruik van tseetsee-vallen (Fig. 11) is één van de weinige manieren om *Glossina* species te doden en hen toch te bewaren zodat hier later tellingen, dissecties en identificaties kunnen op uitgevoerd worden. Bij deze methode worden ook insecticiden gebruikt maar in lagere dosis en beter gericht op het specifiek organisme. Deze manier van controle betekent minder “collateral damage” voor de omgeving. Vaak worden synthetische pyrethroïden gebruikt. Deze stoffen zijn dan wel zeer giftig voor *Glossina spp.*, toch zijn ze redelijk onschadelijk voor zoogdieren (Zerba, 1988).

De vliegen worden visueel en eventueel ook olfactorisch aangetrokken tot de vallen. Deze vallen zijn zwart en blauw van kleur en als olfactorische lokstof worden vaak synthetische fenolen of aceton gebruikt, al dan niet in combinatie met dierlijke producten zoals urine. De vliegen worden door de geur en de blauwe kleur aangetrokken maar gaan op de zwarte delen zitten. Wanneer de vliegen vervolgens landen, nemen zij via hun tarsi een lethale dosis van het insecticide op en sterven. Het insecticide wordt enkel op de zwarte delen van de val aangebracht. Sinds het begin dat deze vallen gebruikt werden is men erin geslaagd om steeds sterkere lokstoffen en efficiëntere insecticiden te ontwikkelen. Soms worden ook elektrocuterende netten gebruikt, maar deze worden vooral gebruikt voor onderzoek, minder als bestrijdingsmiddel (Rayaisse *et al.*, 2010).

Het gebruik van vallen om tseetseevliegen te bestrijden is dan wel beter voor het milieu, ze heeft ook haar nadelen. Zo moeten de vallen onderhouden worden, wat een extra kost betekent, en zeer vaak werd het materiaal gestolen (Leak, 1996). Daarenboven bleek uit het onderzoek van Rayaisse *et al.* dat elk *Glossina* species optimaal aangetrokken wordt door een andere combinatie van geuren en dat, bij elk van de onderzochte species, slechts 50% van de vliegen die door de val aangetrokken werd er ook werkelijk op ging zitten en stierf (2010).



Figuur 11: Tsee-tsee vallen in verschillende modellen (NRI, n.d.).

2.4.1.2. Pour-on

Het insecticide of een afstotende stof kan ook ineens, onder de vorm van een pour-on, op het rund aangebracht worden. In een studie van Rowlands *et al.* (2001) in de Ghibe vallei in Ethiopië, werd hiervoor bijvoorbeeld deltamethrin gebruikt. De vlieg zal ofwel afgestoten worden door de stof en alzo het dier mijden, ofwel, nadat zij op het dier geland is, sterven door opname van het insecticide. Opdat

deze methode voor een regressie in de tsetsee-populatie zou kunnen zorgen, moeten a) de vliegen voornamelijk hun bloedmalen op vee nemen, eerder dan op wilde dieren en b) moet een voldoende hoog percentage van de kuddes behandeld worden. Deze methode heeft als voordeel dat ze, eens de dieren behandeld zijn, niet meer verstoord kan worden en dat ook andere stekende vliegen en teken door het betreffende product afgestoten of geëlimineerd zullen worden (Leak, 1996). Toch is dit niet perse een voordeel. Streken, waar enkele door teken overgebrachte ziekten endemisch aanwezig zijn, kunnen, bij het elimineren of verminderen van de tekenpopulatie, na verloop van tijd, met epidemische problemen te kampen krijgen. Indien er geen onderhoud is van de immuniteitsstatus, kan een infectie met een bepaalde ziekte, bij gevoelige dieren, immers grote problemen veroorzaken (persoonlijke communicatie Delespaux, 2011). Verder is dit ook een redelijk dure methode en vreest men dat, door overmatig gebruik van pyretroiden, resistentie zal ontstaan bij teken (Leak, 1996). Hoe efficiënt de behandeling nog is wanneer de dieren nadien in de vlakke zon of in een fikse regenbui terecht komen of wanneer zij zich over de grond rollen, wordt niet vermeld.

De twee bovenvermelde technieken, tsetsee-vallen en pour-on, zijn de meest gebruikte methoden om aan tsetsee-controle te doen. Bekelea *et al.* **vergeleken** deze twee methoden in de periode van september 2003 tot april 2004 in de Zuidelijke rif vallei van Ethiopië en probeerden uit te zoeken welk van deze twee het efficiëntst was. Hun resultaten wezen uit dat, in een gebied met vier **vallen** per km², de tsetsee-populatie daalde met 88.9% en dat daardoor de prevalentie van trypanosomiasis daalde met 83,25% en dat de PVC steeg van een gemiddelde van 21.8% naar 25.5%. In het andere gebied, waar deltamethrin 1% **pour-on** gebruikt werd, werd een daling van 94.9% in de tsetsee-populatie gezien. Daaruit volgde dat de trypanosomen prevalentie daalde met 90.5% en dat de PCV steeg van 24.1% naar 27.2%. Toch kon hieruit niet geconcludeerd worden dat de pour-on behandeling significant beter was dan de controle door tsetsee-vallen ($P < 0,05$). Men raadde dan ook aan om beide technieken in combinatie te gebruiken of te kiezen voor de meest aangewezen methode, afhankelijk van de mogelijkheden in het betrokken gebied (Bekelea *et al.*, 2009).

2.4.1.3. SIT (steriele insecten techniek)

Een recenter naar voor gebrachte techniek die de populatie tsetseevliegen zou kunnen doen reduceren is SIT. Bij deze techniek worden mannetjes, die d.m.v. gammastralen steriel gemaakt zijn, losgelaten in een tsetsee-gebied. De werking van deze techniek steunt op het feit dat tsetseevliegen maar eens in hun leven paren. Het sperma wordt vervolgens opgeslagen in de spermathecae van de vrouwelijke vlieg en bevrucht haar hele leven lang de eieren die ze produceert. Als men nu voldoende steriele mannetjes loslaat, dan zullen zij in competitie treden met de vruchtbare mannetjes en zo het aantal bevruchte vrouwtjes reduceren (Leak, 1996; SIT Africa, 2011). Om deze techniek optimaal te laten werken, zijn voor elk vruchtbaar mannetje drie steriele mannetjes nodig. Men moet dus eerst de tsetsee-populatie zo sterk mogelijk reduceren, met andere methoden, alvorens de steriele mannetjes los te laten (Vale en Torr, 2005).

Vale en Torr **vergeleken** de kosten en effecten van SIT, pour-on behandelingen en de combinatie van beide. Ze kwamen tot de constatacie dat het 187 dagen duurde om de tsetsee-populatie met 90% te reduceren als er behandeld werd met een **pour-on** en dat dit 609 dagen duurde wanneer men werkte

met **steriele vliegen**. De **combinatie** van de twee gaf een resultaat dat slechts iets beter was dan de pour-on behandeling alleen. Daarbovenop komt nog dat de meest optimistisch geschatte kost voor SIT 20 tot 40 keer zo hoog ligt als die voor een insecticide behandeling (Vale en Torr, 2005). Leak (1996) haalt ook nog aan dat deze methode technisch zeer veeleisend is en dat ze enkel kan werken in een klein, geïsoleerd gebied.

2.4.1.4. Trypanotolerante rassen

Het inkruisen van trypanotolerante rassen zoals N'Dama zou ook een oplossing kunnen brengen. Wanneer we **N'Dama** (trypanotolerant) en **Boran** (trypanosensitief) runderen met elkaar vergelijken (Fig. 12), merken we op dat deze eersten niet enkel minder daling van PCV en lichaamsgewicht vertonen bij een infectie met trypanosomen, maar dat deze parameters ook sneller terug stijgen na eliminatie van de parasiet uit hun bloed. Van twaalf controledieren (zes van elk ras), kwam geen enkel N'Dama rund in levensgevaar, maar daalde de PCV van vijf van de zes Boran runderen tot 12% of lager zodat behandeling nodig was om sterfte van deze dieren te voorkomen (Hanotte *et al.*, 2002).

Uit een experiment van ILRI bleek dat N'Dama runderen tijdens een infectie meer, betere en specifiekere antilichamen produceren dan de Boran runderen. Het trypanotolerante N'Dama vee maakte zowel meer specifieke antilichamen tegen VOG's als meer IgG₁ antilichamen tegen invariabele *Trypanosoma* antigenen en reageerden bovendien ook met een grotere immuunrespons tegen antigenen in het bloed die afkomstig waren van de parasieten. Het is voor de trypanotolerante dieren wel nodig om blootgesteld te blijven aan trypanosomen, teneinde hun trypanotolerante status te behouden (ILRI(b), n.d.).

Inkruisen van trypanotolerante rassen zou een oplossing kunnen betekenen daar d'Ieteren *et al.* aantoonde dat "trypanotolerantie" een overerfbare eigenschap is (1998). De resultaten van Hanotte *et al.* (2002) toonden bovendien aan dat selectie op trypanotolerantie binnen de F₂ kruising tussen N'Dama (*Bos Taurus*) en Boran (*Bos Indicus*) kan leiden tot een ras met een trypanotolerantie die hoger is dan deze van de oorspronkelijke ouderpopulaties.

Een extra voordeel van trypanotolerant vee is dat zij ook resistent zijn aan andere belangrijke pathogenen die in dit klimaat voorkomen (d'Ieteren *et al.*, 1998).

Vroeger werd de trypanotolerantie van een individu geschat op basis van PCV en parasitemie (d'Ieteren *et al.*, 1998). Onderzoek naar nieuwe, gevoeligere diagnostische methoden werd, in de loop der jaren, uitgevoerd. Hierbij zocht men naar een betrouwbare manier om individuele dieren te beoordelen op hun capaciteit om trypanosomen infecties te controleren.

Dayo *et al.* (2009) konden twee significante selectiemerkers voor trypanotolerantie identificeren aan de hand van een vergelijkend onderzoek bij 509 runderen, afkomstig van 14 verschillende rassen uit Afrika en Europa. Dit gebeurde door controle van het effect van 92 QTL's (Quantitative Trait Loci) op het trypanotolerantie niveau.



Figuur 12: Trypanosensitieve dieren van het Boran ras (links) en een trypanotolerant N'Dama rund (rechts). (agriwiki, 2009; FAO, 1980).

2.4.1.5. Vaccineren?

Er bestaat nog geen vaccin tegen trypanosomiasis. Alhoewel onderzoek naar een vaccin tegen *T. cruzi* bij mensen (Chagas disease) optimistische resultaten geeft door het vertragen en verminderen van de symptomen, is het nog niet in staat een infectie te voorkomen of genezen (Limon-Flores *et al.*, 2010).

Testen naar de ontwikkeling voor een “flying vaccinator” zijn volop aan de gang voor *Leishmania*. Hierbij worden muggen zodanig genetisch gemanipuleerd dat zij, wanneer zij een mens of dier steken, het individu in kwestie vaccineren tegen de parasiet die zij normaal overbrengen. Men hoopt dit principe ook te kunnen aanwenden in de strijd tegen malaria (Yamamoto *et al.*, 2010). Misschien biedt de toekomst hier ook mogelijkheden voor de preventie van trypanosomiasis.

Nochtans is vaccineren tegen Trypanosomen om verschillende redenen niet voor de hand liggend:

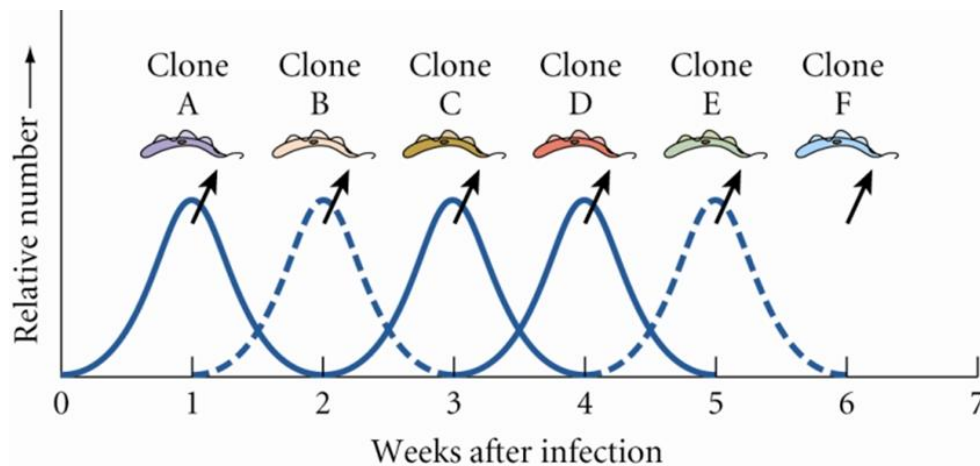
1) Antigenische variatie

Op hun celmembraan hebben trypanosomen bepaalde glycoproteïnen die in het lichaam van de gastheer een afweerreactie opwekken. Deze eiwitten worden door het lichaam dus herkend als antigenen. Er bestaan zo een duizend verschillende glycoproteïnen, maar elke individuele trypanosoom brengt slechts één van deze tot uiting (Barry en McCulloch, 2001).

Trypanosomen zijn echter in staat deze oppervlakte eiwitten van generatie op generatie aan te passen, zodat zij aan de eliminatie pogingen van de gastheer kunnen ontsnappen. Dit heet “antigenische variatie” en de eiwitten worden ook “variabele oppervlakte-glycoproteïnen” of “VOG’s” genoemd (Vickerman, 1978; Taylor en Rudenko, 2006).

In een poging om de parasiet te elimineren zal het afweersysteem van de gastheer antistoffen produceren tegen deze glycoproteïnen. Maar in de tijd die nodig is om deze antistoffen te maken, zullen nieuwe parasieten met andere glycoproteïnen op hun oppervlak gevormd worden (Fig. 13). De antistoffen, die het lichaam uiteindelijk aangemaakt zal hebben, werken dus slechts tegen enkele parasieten. De parasieten met de nieuwe glycoproteïnen worden door het immuunsysteem niet herkend. Vervolgens zal het lichaam van de gastheer opnieuw

antistoffen maken, deze keer tegen de tweede glycoproteïnen. Maar opnieuw zullen er parasieten zijn die, door middel van antigenische variatie, kunnen ontsnappen. Op deze manier blijven er steeds trypanosomen achter in het bloed die niet geëlimineerd kunnen worden (K. Vickerman, 1978; Taylor en Rudenko, 2006).



Figuur 13: Antigenische variatie over verschillende weken. Iedere Trypanosoom met een nieuwe kleur stelt een Trypanosomen groep met nieuwe oppervlakte antigenen voor. De grootte van deze groep wordt weergegeven op de y-as (pathogen profile dictionary, n.d.).

2) Falen van vaccins, gericht tegen alomtegenwoordige moleculen

Aangezien trypanosomen obligate parasieten zijn, bezitten zij allen oppervlakte antigenen voor het opnemen van exogene macromoleculen. Deze antigenen variëren, in vergelijking met de VOG's, veel minder tussen de trypanosomen onderling. Twee voorbeelden van zulke oppervlakte antigenen zijn: 1) de transferrine receptor en 2) de flagellaire pocket.

Experimenten met een vaccin tegen de flagellaire pocket toonden aan dat, zowel bij vee als bij muizen, slechts een partiële bescherming verkregen werd. Enkel wanneer de infectie minder dan 1000 trypanosomen bedroeg, was het vaccin in staat om bescherming te bieden. Daar er bij één enkel bloedmaal van een besmette tseetseevlieg duizenden trypanosomen kunnen overgedragen worden, is dit vaccin in de praktijk waardeloos (Magez en Radwanska, 2009).

3) Invloed van de trypanosomen op het immuunsysteem

Studies op dieren die besmet waren met trypanosomen en een werkend vaccin tegen *E. coli* toegediend kregen, toonden aan dat de aanwezigheid van levende parasieten ervoor zorgde dat het vaccin niet in staat was om een effectieve B-cel geheugen respons uit te lokken. Het vaccin verloor aldus zijn effect op het immuunsysteem en bood geen bescherming meer tegen *E. coli*. Men ontdekte dat de aanwezigheid van levende en delende parasieten in het bloed de

specifieke antilichaam respons onderdrukt of buiten werking stelt en bovendien de geheugen respons, geïnduceerd door het vaccin, snel vernietigt. Dit heeft als gevolg dat, indien men er niet in slaagt alle circulerende parasieten af te doden voor zij een effect op de B-cellen kunnen uitoefenen, het waarschijnlijk nooit haalbaar zal zijn een vaccin tegen trypanosomen te ontwikkelen. Rodriguez *et al.* (2003) ontdekten wel dat IL-4 het percentage apoptotische B-cellen, ten gevolge van een *T. cruzi* infectie, kon terugdringen van 45,9% naar 24,0% (2003).

Dit apoptotisch effect heeft bovendien nog als gevolg dat alle vaccinatie programma's in regio's waar mensen of dieren aan trypanosomen blootgesteld worden, zullen falen vanaf het moment dat het individu trypanosomen in het bloed heeft of krijgt. Ook wanneer er een infectie plaatsvindt nadat de specifieke respons t.g.v. het vaccin al is opgebouwd, zullen de trypanosomen zorgen voor het teloor gaan van de specifieke B cellen en dus het verlies van de bescherming tegen het pathogeen waarvoor gevaccineerd werd (Magez en Radwanska, 2009). Radwanska *et al.* (2008) benadrukken dat de infectie wel resulteert in een differentiatie van plasmacellen en de secretie van antilichamen maar dat het verlies van de B cellen in de marginale zone van de milt zorgt voor een verlies van de specifieke respons.

2.4.2. Curatief

De meest gebruikte techniek in Afrika om trypanosomiasis te bestrijden is het gebruik van **geneesmiddelen**. Het allereerste product dat hiervoor op de markt gebracht werd, was Samorin® (isometamidium chloride) en was voor het eerst verkrijgbaar in 1961. Het werd verkocht als een geneesmiddel dat zowel curatief als profylactisch werkte en tot 22 weken bescherming kon bieden na intramusculaire injectie van 1mg/kg lichaamsgewicht (Leak, 1996). Hieronder zijn de meest courant gebruikte geneesmiddelen voor de bestrijding van *Trypanosoma* infecties bij runderen weergegeven (Tabel 4).

Tabel 4: De meest courant gebruikte geneesmiddelen tegen trypanosomiasis bij runderen en hun verschillende merknamen (naar Leak, 1996).

CHEMISCHE STOF	MERKNAAM
Isometamidium chloride (ISM)	Samorin®, Trypamidium®, Veridium®
Homidium chloride (Ethidium chloride)	Novidium®
Homidium bromide (Ethidium bromide)	Ethidium®
Diminazene aceturate (DA)	Berenil®, Veriben®

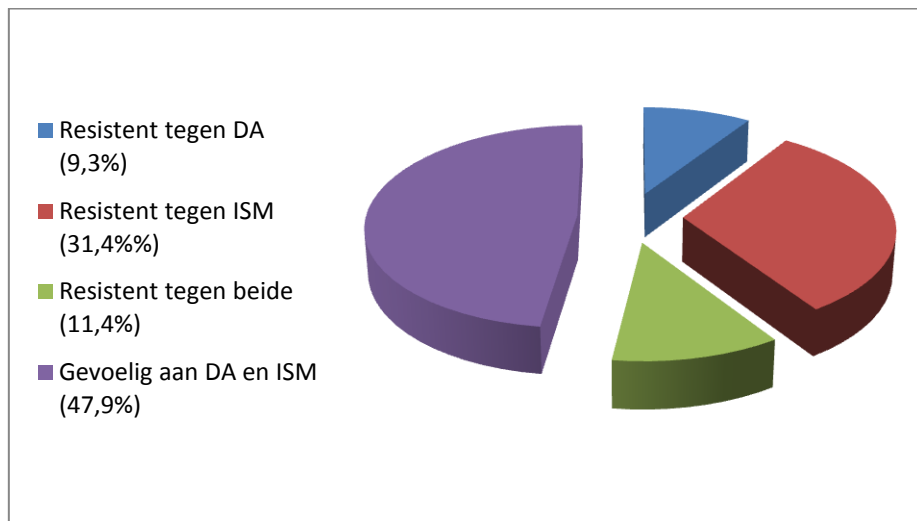
ISM (isometamidium) wordt tegenwoordig vooral als profylactische drug gebruikt en werkt tussen de 2 en de 22 weken tegen trypanosomen infectie. DA (diminazene) en homidium daarentegen geven weinig tot geen profylactische bescherming en worden dan ook vooral therapeutisch aangewend (Holmes *et al.*, 2004). Gezien de mutagene eigenschappen van homidium bromide zou dit geneesmiddel eigenlijk van de markt gehaald moeten worden, toch is het wijdverspreid en wordt het nog steeds in veel landen in gebruik (Delespoux *et al.*, 2008).

2.5. Resistentie bij de trypanosomen

2.5.1. Schetsen van het probleem

Resistentie tegen trypanociden is een steeds groter wordend probleem waar Afrikaanse veehouders mee te kampen krijgen. De eerste keer dat resistentie aan ISM en DA gerapporteerd werd, was reeds in de jaren 60 (Whiteside, 1963; Maclennan en Jones-Davies, 1967). En sindsdien werd dit probleem in 17 landen van sub-Sahara Afrika vastgesteld (Geerts en Holmes, 1998; Jamal *et al.*, 2005; Mamoudou *et al.*, 2006; Talaki *et al.*, 2006). Vermoedelijk zijn er nog meer Afrikaanse landen waarin resistente trypanosomen voorkomen, maar een gebrek aan gegevens zorgt ervoor dat deze hypothesen niet bevestigd kunnen worden (Delespaux *et al.*, 2005).

In 2001 was er meer resistentie aan ISM dan aan DA (Fig. 14) (Geerts *et al.*, 2001), maar sindsdien werden steeds vaker gevallen van multiple drug resistentie gerapporteerd (Delespaux *et al.*, 2005).



Figuur 14: De relatieve verhoudingen tussen gevoelige en resistente *T. congolense* isolaten en tussen resistente isolaten onderling. De gebruikte *T. congolense* werden geïsoleerd uit vee in tseetsee-gebieden in Kenia (n=52), Tanzania (n=17) en Zambia (n=71) en vervolgens geïsoleerd in muizen die nadien behandeld werden met ISM aan 1.0 mg/kg en DA aan 20mg/kg (naar Geerts *et al.*, 2001).

In de periode tussen april 1994 en februari 1998 testten Rowlands *et al.* (2000) de prevalentie van *T. congolense* in runderen in de Ghibe vallei. De dieren werden behandeld met DA aan 3.5 mg/kg lichaamsgewicht vanaf het moment dat hun PCV lager was dan 26% en er parasieten in hun bloed gevonden werden of wanneer zij symptomen van trypanosomiasis vertoonden. De behandeling werd stopgezet als hun PCV weer 26% of meer was. Zij kwamen tot de constatering dat 13.3% van de runderen besmet was en dat maar liefst 13.0% van de dieren herviel binnen de twee maand na stopzetten van de behandeling. Dit duidt erop dat de behandeling niet in staat was de trypanosomen volledig uit de runderen te elimineren.

Het feit dat deze behandeling toch voor een stijgende PCV zorgde, ondanks het feit dat de trypanosomen resistent waren, wordt verklaard door Delespaux *et al.* (2010) in een experiment met *T. congolense* resistent aan ISM vonden zij dat een behandeling met dit trypanocide er toch voor zorgt dat de ziekte minder effect had op de PCV. Aldus is het toch nog nuttig om te behandelen in geval van resistentie, in die zin dat het toch nog een positief effect geeft op de gezondheid van de dieren.

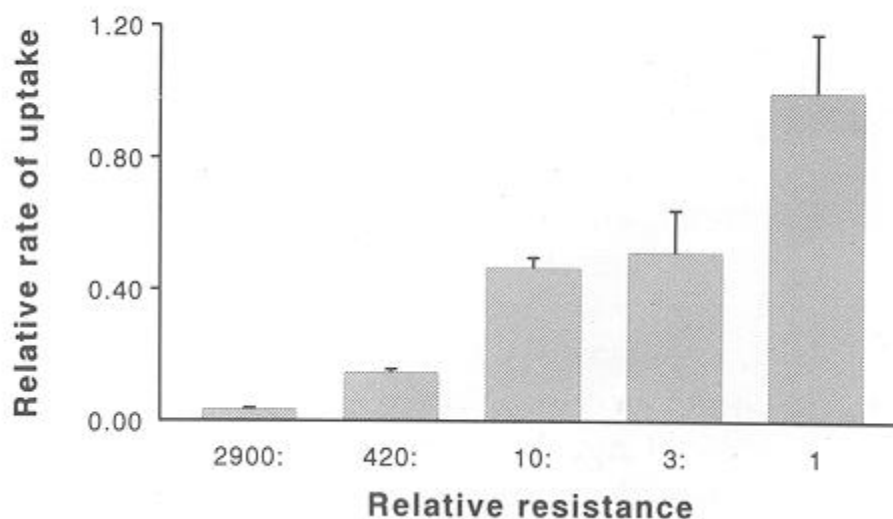
Er bestaan verschillende oorzaken voor het resistentie probleem. Eerst en vooral worden dezelfde drie middelen al ongeveer 50 jaar gebruikt, zonder dat er ooit een nieuw product bijgekomen is (Leak, 1996). Dit heeft als gevolg dat al die tijd een selectie in het voordeel van de resistente trypanosomen onderhouden werd. Alhoewel dit niet perse nodig is. Er werd reeds DA resistentie gerapporteerd bij trypanosomen die nooit in contact gekomen waren met DA (persoonlijke communicatie Delespaux). Verder ziet men vaak dat veehouders alle ziektesymptomen behandelen met trypanociden, zonder eerst een poging te doen om de eigenlijke oorzaak te achterhalen. Van een ondervraagde groep boeren uit Zambia gaf 70% aan dat zij de dieren sowieso behandelden tegen trypanosomiasis, zonder vooraf de diagnose te laten stellen door een dierenarts of een dierenartsassistent (Delespaux *et al.*, 2002). Deze manier van handelen is mogelijk doordat een behandeling tegen trypanosomiasis redelijk goedkoop is (± 1 US\$). Op deze manier zijn trypanociden waarschijnlijk (anthelmintica en traditionele remedies worden in soortgelijke hoeveelheden gebruikt) de meest aangewende geneesmiddelen in Afrika ten zuiden van de Sahara (35 miljoen dosissen per jaar) (Geerts en Holmes, 1998).

Bovendien bleek uit een experiment van Van den Bossche *et al.* (1998) dat de overdraagbaarheid positief gecorreleerd is met de graad van resistentie. Van drie isogene *T. congolense* klonen, die enkel op vlak van resistentie tegen ISM verschilden, zag men dat de meest resistente het vaakst voorkwamen in tsetseevliegen die besmet bloed gezogen hadden. Vliegen die daarentegen bloed gezogen hadden waarin gevoelige parasieten zaten, hadden minder kans om geïnfecteerd te worden. Dit zou ook een rol kunnen spelen in de stijgende prevalentie van resistente trypanosomen. In hoeverre resistente parasieten een voordeligere groeisnelheid of competitiviteit bezitten moet nog verder onderzocht worden (Van den Bossche *et al.*; 2006). Ook Moloo en Kutuza (1989) merkten, bij de resistente stammen, een opvallend hoge graad (81,3%) van infectie bij tsetseevliegen op. Nochtans ondervonden Clausen *et al.* dat gemiddeld 22,0% (38/173) van de tsetseevliegen, die bloed zogen waarin drug-gevoelige trypanosomen aanwezig waren, besmet geraakten en dat dit slechts 16,0% (24/150) was bij bloed met resistente trypanosomen (1998).

De oorzaken van resistentie op biochemisch niveau zijn voorlopig weinig onderzocht. Nucleoside transporters (Barrett en Fairlamb, 1999) en veranderingen in de elektrische potentiaal van de mitochondriën (Wilkes *et al.*, 1997) zouden een rol spelen in resistentie tegen trypanociden. Aangezien de elektrische potentiaal van de mitochondriën sterk verband houdt met de opname van ISM en deze laatste een goede indicatie geeft van het niveau van drug resistentie, zou het handig zijn indien men snel deze potentiaal zou kunnen testen en zo een idee zou kunnen krijgen over het resistentieniveau van de betreffende parasiet (Geerts *et al.*, 2001).

Ook op genetisch vlak zou het interessant zijn indien men merkers of genen, verantwoordelijk voor resistentie, zou kunnen identificeren. Onderzoek naar de aard (mono- of polygenetisch, dominant of recessief, ...) van de betrokken genen is nodig en zou zowel in het onderzoek als in de bestrijding van resistentie een grote rol kunnen spelen (Geerts *et al.*,2001).

In 2005 vonden Delespaux *et al.* in twee isogenische trypanosomen, waarvan de ene wel en de andere niet resistent was aan ISM, dat enkele genetische loci in hun DNA verschillend waren. Deze DNA stukken codeerden voor een ABC-transporter ter hoogte van de kinetoplast. Bovendien ziet men dat **ISM-resistente** parasieten, na blootstelling aan dit trypanocide, een lagere concentratie ISM in hun kinetoplast hebben dan gevoelige parasieten (Wilkes *et al.*, 1997). Hieronder wordt in een grafiek van ILRI de verhouding tussen resistentie en ISM-opname weergegeven (Fig. 15). Het is echter niet duidelijk of de ABC-transporter bij een resistente parasiet 1) voor minder opname van ISM in de kinetoplast zorgt, 2) in staat is ISM uit de kinetoplast te pompen of 3) een combinatie van beide. Ook de rol van passieve diffusie van ISM over de kinetoplast membraan wordt nog in vraag gesteld. Delespaux *et al.* (2005) wijzen erop dat waarschijnlijk niet alle loci die verschillend zijn tussen resistente en sensitieve stammen een invloed hebben op het resistentie niveau van de parasiet, maar dat de kans toch groot is dat drugresistentie een multigenetische eigenschap is. Een methode om ISM-gevoelige en ISM-resistente stammen van *T. congolense* van elkaar te onderscheiden is met de *MbolI*-PCR-RFLP test. Bij resistente stammen bevat dit fragment immers drie baseparen meer. Dit gen is op enkele vlakken homolog met het gen voor de ABC-transporter, maar als merker voor ISM-resistentie is het echter niet betrouwbaar in alle streken in Afrika (Delespaux *et al.*, 2005).



Figuur 15: De verhouding tussen het resistentie niveau tegen ISM (Samorin®) en de mate waarin dit geneesmiddel door de parasieten opgenomen wordt. Het meest sensitieve type wordt hier als referentie gebruikt en krijgt de waarde "1" (op basis van een artikel van Wilkes) (ILRI(c), n.d.).

Voor *T. brucei*, *T. evansi* en *T. equiperdum* was reeds gekend dat **DA-resistentie** gelinkt zou zijn met de inhibitie, “knocking down” of “silencing” van het gen dat codeert voor de P2-type purine transporter (Mäser *et al.*, 2003). Ook in resistente *T. congolense* stammen werd een permutatie in dit gen gevonden (voor *T. congolense* het TcoAT1-gen). Aan de hand van de sequentie bepaling (SSCP (Single-strand conformation polymorfism)) van het TcoAT1-gen door middel van een *BclI*-PCR-RFLP, is men in staat de DA resistente stammen van de DA gevoelige stammen te onderscheiden. Deze test is gebaseerd op een enkelvoudige permutatie (van G naar A) bij de DA resistentie stammen (Delespaux *et al.*, 2006).

Delespaux *et al.* (2005) onderzochten ook of de bindingsplaats van het geneesmiddel misschien anders was bij resistente stammen. Er bestaan hypothesen dat DA, ISM en EtBr ervoor zorgen dat het DNA netwerk van de kinetoplast krimpt en verdwijnt ten gevolge van het ontstaan van type II topoisomerase inhibitoren (Cavalcanti *et al.*, 2003; Wang en Englund, 2001). Resistentie zou aldus kunnen verklaard worden door een verandering van het topoisomerase gen waar de inhibitoren geen effect meer op hebben. Echter, in tegenstelling tot andere *Trypanosoma* species, Leishmania (Marquis *et al.*, 2005) en proeven op kankercellen (Lin *et al.*, 2001), zag men dat de topoisomerase genen bij *T. congolense* sterk geconserveerd waren. De resistentie van *T. congolense* tegen ISM kan hier dus niet aan geweten worden (Delespaux *et al.*, 2005).

2.5.2. Mogelijke oplossingen

Wat kunnen veehouders, ondanks de hoge resistentiegraad onder de trypanosomen, nog doen om hun vee toch zo optimaal mogelijk te beschermen tegen trypanosomiasis? En is het mogelijk deze resistentie terug te dringen?

2.5.2.1. Trypanociden combineren

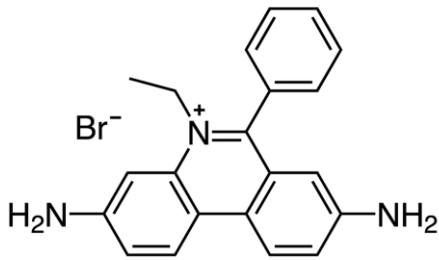
Het gebruik van een juiste combinatie van trypanociden kan resistente *trypanosomen* afdoden. Hierbij moet erop gelet worden dat tussen beide stoffen geen kruisresistentie heerst. Dit wil zeggen dat resistentie tegen de ene gebruikte stof, resistentie tegen de andere stof veroorzaakt. Enkele voorbeelden van geneesmiddelen die kruisresistentie vertonen:

Trypanosomen die resistent geworden zijn aan quinapyramine (een geneesmiddel om *T. evansi* bij kamelen, paarden of waterbuffels te bestrijden), zullen ook niet meer gevoelig zijn aan homidium, ISM of DA. Zo ook geeft resistentie aan homidium kruisresistentie met quinapyramine en ISM en geeft resistentie aan ISM kruisresistentie met quinapyramine en homidium (Leak, 1996; Delespaux en de Koning, 2007).

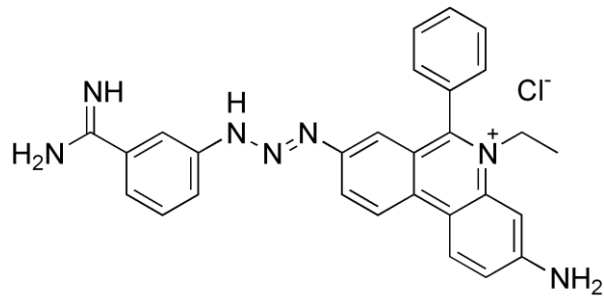
Het feit dat homidium en ISM kruisresistentie ten opzichte van elkaar ontwikkelen kan verklaard worden door het feit dat de homidium molecule een deel is van de ISM molecule (Fig. 16) (Delespaux *et al.*, 2010).

Geneesmiddelen die zich er aldus wel toe lenen om gecombineerd te worden zijn bijvoorbeeld ISM en DA of homidium en DA (Leak, 1996).

Homidium



ISM (Isometamidium)



Figuur 16: structurele verwantschap tussen homidium en ISM (Delespaux *et al.*, 2010).

2.5.2.2. Combinatie van het trypanocide en een antibioticum gebruiken

Een andere methode om resistente trypanosomen te bestrijden is door te behandelen met een combinatie van het trypanocide en een antibioticum.

Delespaux *et al.* (2010) behandelden muizen, geïnoculeerd met resistente *T. congolense*, met tetracycline, met ISM of met een combinatie van beide. Ze kwamen tot de constatactie dat de dieren, behandeld met de combinatie van ISM en tetracycline, langer overleefden dan de muizen die slechts met één van beide behandeld werden. Nadien werden runderen, besmet met een resistente *T. congolense* stam, behandeld met enkel ISM, met een combinatie van ISM en oxytetracycline of met een combinatie van ISM en enrofloxacin. Alle dieren die enkel met ISM behandeld werden, werden positief (microscopische controle). Daarentegen werd telkens slechts 50% van de dieren die behandeld werden met één van beide combinaties, positief (PCR opvolging gedurende drie maanden). De dieren uit deze laatste groep toonden ook een prepatente periode die significant langer was, hun parasitemie bleef lager en hun hematocriet werd significant minder beïnvloed door de ziekte. Het synergisch effect tussen antibioticum en ISM zou bekomen worden doordat de antibiotica in competitie treden met ISM ter hoogte van de ABC-transporter op de membraan van de kinetoplast (zie hoger) (Delespaux *et al.*, 2010).

Daar deze antibiotica vlot verkrijgbaar zijn op de Afrikaanse markt en bovendien goedkoop zijn, zou deze combinatie methode een oplossing kunnen betekenen voor veel Afrikaanse veehouders. Dit niet alleen omdat het de gezondheid van de dieren zou verbeteren maar ook omdat het een daling in het aantal resistente trypanosomen t.o.v. ISM zou kunnen veroorzaken (Delespaux *et al.*, 2010).

Het risico op antibiotica resistentie dat deze oplossing zou veroorzaken wordt in deze studie niet besproken. Maar aangezien het hier om een experiment ging, een "proof of concept", waarbij zeer hoge dosissen antibioticum gebruikt werden, zal deze bevinding voorlopig nog geen toepassing in het veld vinden (persoonlijke communicatie Delespaux, 2011).

2.5.2.3. Controle van de tsetsee-populatie

Controle van de tsetsee-populatie (Fig. 17) zou dit probleem ook voor veel dieren kunnen oplossen (Geerts *et al.*, 2001). Maar met de dieren die dan toch ziek worden, staat men weer voor hetzelfde probleem. De verschillende technieken om de tsetseevliegen te bestrijden zijn hierboven weergegeven.



Figuur 17: *Glossina* sp. (IVM, n.d.).

2.5.2.4. Trypanotolerante dieren

Ten slotte kan men ook voorkomen dat dat runderen ziek worden ten gevolge van een resistente parasiet door meer trypanotolerante dieren in de kudde te brengen of in de kudde in te kruisen (d'leteren *et al.*, 1998). Dit zou een effectieve methode kunnen zijn, ware het niet dat de veehouders, om redenen die niets met de gezondheid van hun dieren te maken hebben, toch Zebu's verkiezen (Clausen *et al.*, 2010).

Uit een onderzoek van Lemesha *et al.* (2006) blijkt dat van de rassen die in zuidwest Ethiopië gehouden worden, de Sheko het minst gevoelig is aan *T. congolense* infectie. Dit ras vertoonde een lagere *Trypanosoma* prevalentie (in gelijke omstandigheden als de andere) en als ze dan toch positief werden, dan vertoonden ze een minder ernstige anemie. Indien hun PCV toch lager werd dan 20, dan hadden de Sheko runderen minder behandelingen (Berenil®) nodig om hun PCV weer boven deze grens te krijgen. Verder konden deze dieren ook langer hun fysiologische functies op een normaal niveau houden en produceerden ze meer kalveren dan de anderen in geval van *T. congolense* infectie. Voor *T. vivax* werd echter geen betere controle dan bij de andere rassen opgemerkt. Echter, op dit ras werd ook de hoogste prevalentie aan teken gevonden, wat dan weer niet strookt met de trypanotolerante hypothese (Lemesha *et al.*, 2006).

2.5.2.5. Trypanociden correct gebruiken

In de strijd tegen resistentie is het belangrijk de veehouders erop te wijzen dat het belangrijk is dat zij de trypanociden correct gebruiken (Geerts *et al.*, 2001). Dit wil zeggen dat zij de bereidings- en bewaarwijze nauwgezet moeten volgen en dat zij juist moeten doseren, op het precieze lichaamsgewicht. Alhoewel dit op lange termijn een verschil zou kunnen maken, wijzen ervaringen uit Mali en Burkina Faso erop dat de veehouders het probleem van resistentie vaak niet naar waarde schatten en dat hun milieu zich er vaak niet toe leent om geneesmiddelen volledig correct te gebruiken (Clausen *et al.*, 2010). Onderzoek in Kenia naar het vermogen van vee bezitters en vee

verzorgers om accuraat het gewicht van een rund te schatten, toont aan dat vooral de eigenaren het gewicht van hun dieren onderschatten. De vee bezitters onderschatten 85,7% van het vee en deden dit gemiddeld met 46,9% onder het ware gewicht van het dier. Dit zou kunnen verklaard worden doordat de bezitters vooral het karkasgewicht te horen krijgen, wat overeenkomt met 45 à 55% van het levend gewicht. Slechts 19,0% van de dieren werd door de vee bezitters correct (met een marge van 20% op het ware lichaamsgewicht) ingeschat. Vee verzorgers scoorden beter op deze test, zij schatten 76,6% van de dieren correct in. Aangezien een significant aandeel van de geneeskundige behandeling van de dieren vaak terecht komt op de schouders van deze mensen en zij vaak geen toegang hebben tot een (juist geijkte) weegschaal, worden de dieren aldus vaak onder gedoseerd. Dit is niet enkel een probleem voor de bestrijding van trypanosomiasis (Machila *et al.*, 2008).

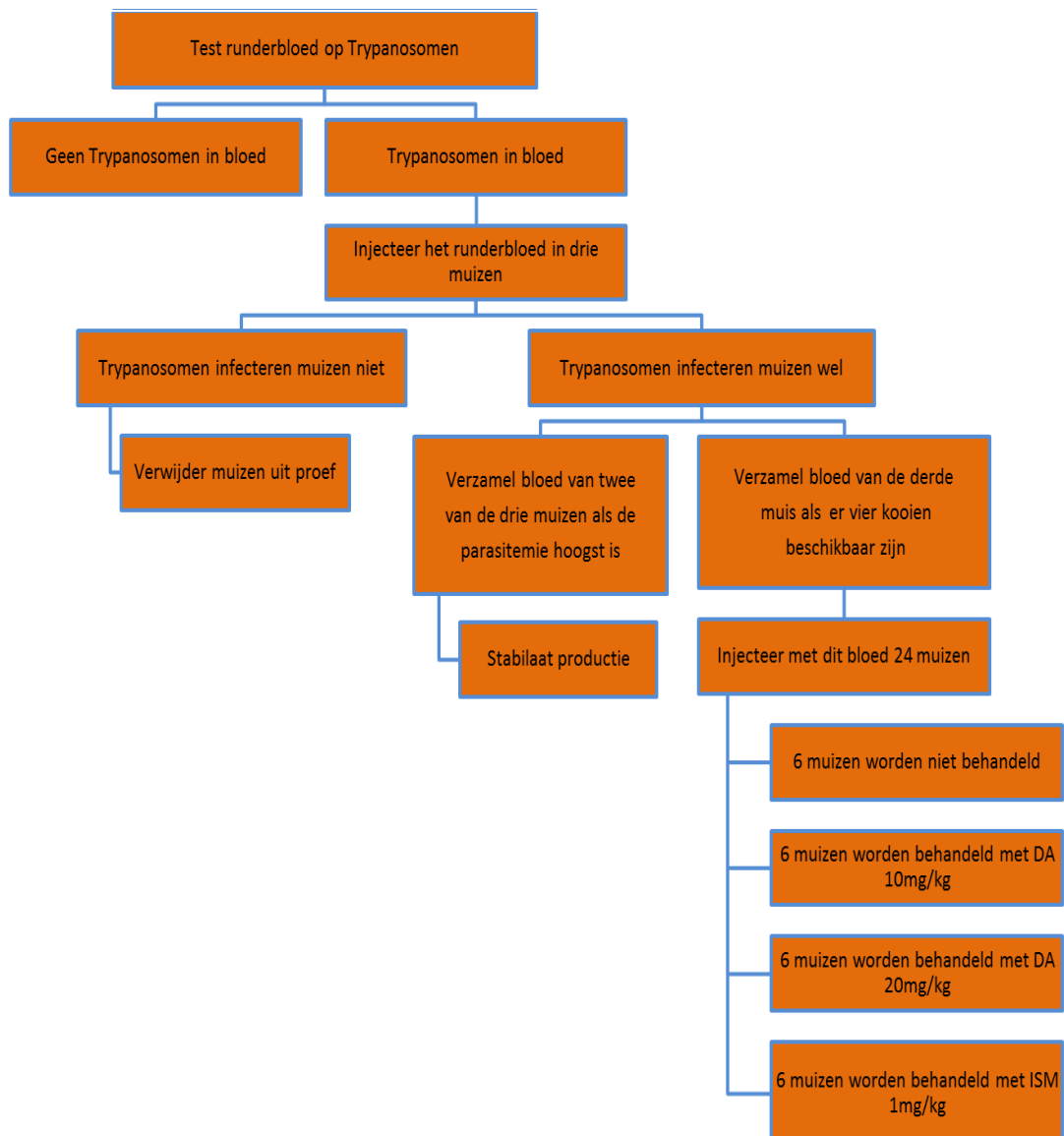
Uit een onderzoek in Zambia, waarbij boeren en dierenartsassistenten ondervraagd werden naar hun gebruik van ISM, bleek, uit hun antwoorden op een vragenlijst, dat zij allen een goede kennis van het product hadden. Zij waren op de hoogte van de correcte hoeveelheid water die aan het product moet toegevoegd worden (66% beweerde hun water te koken voor zij er ISM mee verdunden), van de dosis per kg en van het optimale seizoen om te behandelen. Ongeveer de helft van de groep gaf aan dat zij meermaals per jaar hun vee ISM toedienden. Ook het schatten van het lichaamsgewicht van de dieren bleek in deze groep geen probleem. Echter, toen de ISM serum concentratie, a.d.h.v. een ISM-ELISA techniek, gemeten werd, één week nadat deze mensen hun vee hadden behandeld, bleek dat in 76% van de gevallen de beschermingsperiode maximum 28 dagen was en in 90% maximum 33 dagen. Deze bevinding kan verklaard worden doordat de boeren en dierenartsassistenten niet gecontroleerd werden op het moment dat zij het vee behandelden en dat zij zich niet bewust waren van de monitoring die een week later zou plaatsvinden (Delespaux *et al.*, 2002).

2.5.2.6. Een nieuw product

Het ontwikkelen van een nieuw product waar de resistente trypanosomen toch gevoelig aan zijn, zou voor de veehouders waarschijnlijk de meest gewenste oplossing zijn. Helaas, ten gevolge van de beperkte financiële capaciteit van de Afrikaanse landen en de hoge kost om een nieuw product te ontwikkelen en op de markt te brengen, tonen de farmaceutische bedrijven weinig interesse in onderzoek naar nieuwe trypanociden (Kinabo, 1993; Geerts *et al.*, 2001; Sones, 2001).

3. Doelstelling van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek was om de prevalentie van *T. congolense* bij runderen in de Ghibe vallei in Ethiopië te bepalen en nadien de resistentiestatus van de geïsoleerde *T. congolense* stammen, tegen ISM en/of DA, te testen aan de hand van muismodellen. Voor het gebruik van muizen in deze studie werd de goedkeuring van het ethisch comité van het Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde verkregen. Resistentie tegen DA werd achteraf nog eens getest aan de hand van een PCR-RFLP analyse. Hieronder wordt het algemene plan weergegeven dat als leidraad in dit onderzoek gevolgd werd (Fig. 18).



Figuur 18: Algemeen plan van de studie.

4. Materiaal en methode

4.1. Tijd en plaats van staalname

In de periode van 17 tot 21 augustus 2010 en van 5 tot 7 oktober 2010, werden 411 runderen getest op trypanosomiasis. Deze dieren waren voornamelijk Zebu runderen, van het bos Indicus type (Fig. 19). Overdag werden de dieren gehoed op de grasvlaktes en 's nachts werden zij samengedreven en gehuisvest op een omheinde, maar open plaats.



Figuur 199: De runderen die in de Ghibe vallei, Ethiopië gehouden worden, behoren zo goed als allemaal tot het trypanosensitieve bos Indicus type.

Er werd bloed genomen in acht verschillende gebieden rond Welkite (N 8°17'0" en E 37°47'0") (Fig. 20) De zes onderzochte gebieden heten, chronologisch volgens bemonstering: Wadesa, Shumoro, Gomsha, Jatu, Yatu, Katabosso, Weira en Abelti. In Tabel 5 worden de coördinaten van deze gebieden weergegeven.

Yatu, Ketabosso en Abelti behoren alle drie tot de "ILRI intervention site". In deze gebieden werden door IRLI (International Livestock Research Institute) maatregelen getroffen om de trypanosomiasis prevalentie te doen dalen. Hiertoe werden tsetsee-vallen geplaatst en werden de runderen behandeld met een deltamethrin pour-on en met een intramusculaire Trypamidium® injectie (actieve stof: ISM (isometamidium)). Ten slotte werden ook de boeren over dit onderwerp onderricht.

Het doel van ILRI is hiermee "een efficiënte, veilige en economische methode te ontwikkelen die de ziekte op basis van immunologische, chemische of genetische manier kan controleren". Zij richten zich hiertoe "op de parasieten zelf en op hun interactie met de tsetseevliegen en met de zoogdieren die zij parasiteren" (ILRI(a), n.d.).



Figuur 20: Welkite (N 8°17'0'' en E 37°47'0''), Ethiopië.

Tabel 5: Coördinaten en hoogte van de plaatsen waar de stalen verzameld werden.

Kebele's selected	Elevation	Coordinates of sampling sites
Wedesa	1717m	N 07°56.773' E 037°42.752'
Shumoro	1920m	N 07°59.611' E 037°42.491'
Gomsho	1917m	N 08°04.572' E 037°43.131'
Jatu	1926m	N 08°04.573' E 037°43.141'
Weira	1984m	N 07°57.545' E 037°44.418'
Yatu	1466m	N 08°25.193' E 037°22.307'
Keta Bosso	1600m	N 08°21.575' E 037°20.513'
Abelti	1664m	N 08°10.596' E 037°34.575'

4.2. Data collectie in het veld

4.2.1. Collectie runderbloed

Een dag vóór het nemen van bloedstalen van runderen in een bepaald gebied, werden de betreffende boeren door de lokale dierenarts geïnformeerd over de komende staalnames. Zij werden ervan op de hoogte gebracht dat, indien zij hun runderen de dag nadien naar de afgesproken plaats zouden brengen, hun dieren gecontroleerd zouden worden op trypanosomiasis en, wanneer deze dieren positief bleken, zij behandeld zouden worden met Veriben® (DA (diminazene)).

De runderen werden door de onderzoekers ad random gekozen uit de kuddes die aangebracht werden door de boeren. Hierbij werden dieren van alle leeftijden, in goede en slechte conditie en van beide geslachten bemonsterd. Verder werd er echter geen systematisch protocol opgesteld om te beslissen van welk dier er bloed genomen werd. Van ieder rund waar bloed van genomen zou worden werd een formulier ingevuld betreffende **geslacht**, leeftijd, body conditie score (BCS) en voorafgaande **behandelingen**. De **leeftijd** werd geschat a.d.h.v. het gebit (Lane, 1914) en de **BCS** werd bepaald volgens de indeling van Nicholson en Butterworth (1986). Vervolgens kreeg het rund een **nummer** om het later te kunnen koppelen aan het genomen bloedstaal en werd met een digitaal foto toestel een **foto** genomen van het dier met zijn eigenaar. Dit liet ons toe om, wanneer het bloedstaal positief voor trypanosomiasis bleek, het betreffende dier weer op te zoeken en het te behandelen. Bloed van de runderen werd verzameld ter hoogte van de v. jugularis d.m.v. een steriele 21G naald in een gehepariniseerde vacuüm tube (Fig. 21).



Figuur 21: Verzamelen van de bloedstalen.

4.2.2. Microscopische controle runderbloed

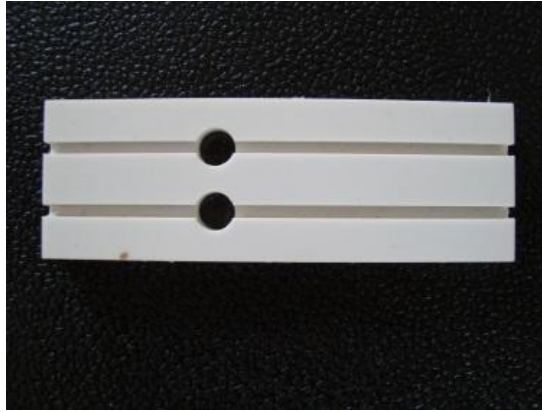
Nadien werden met dit bloed onmiddellijk zes niet gehepariniseerde **capillairen** (70 µl) gevuld of werd het bloed in een koelbox bewaard (max. drie uur) voordat de capillairen gevuld werden. Deze zes capillairen werden afgesloten met plasticine (Brand®) en vervolgens gedurende zes minuten **gecentrifugeerd** aan een snelheid van 10000 toeren/ minuut (Fig. 25 en Fig. 26). Op die manier werd het plasma van de rode bloedcellen gescheiden en, ten gevolge van verschil in massa, hoopten de witte bloedcellen zich tussen deze twee fasen op onder de vorm van een dunne, witte lijn, de “buffy coat” (Fig. 24) genoemd.

Het is geweten dat de trypanosomen in het bloed zich tijdens het centrifugeren, ten gevolge van hun gelijkaardige massa met de witte bloedcellen, concentreren in de buffy coat (Chappuis *et al.*, 2005). Aldus wordt de buffy coat microscopisch onderzocht op het voorkomen van trypanosomen.

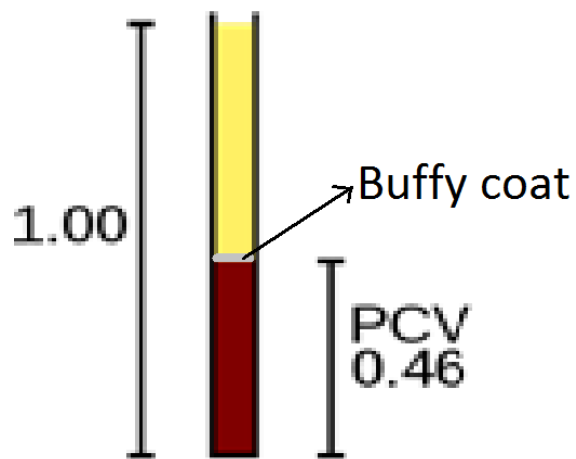
Van twee van de zes capillairen werd de buffy coat op **filterpapier** (Whatman® 4) (Fig. 22) aangebracht voor latere PCR analyse en twee andere werden bekeken onder de **microscoop** (ZEISS, primo star) op vergroting 10x40 m.b.v. een Woo viewing chamber (Fig. 23) met een paar druppels gedestilleerd water (het water dient om de ruimte tussen het capillair en de viewing chamber op te vullen en zo het effect van licht verstrooiing te verminderen). De overige twee capillairen waren **reserves** indien één of twee capillairen zouden gebroken worden tijdens het centrifugeerproces. Ook werd op één van deze zes de **PCV** afgelezen (Fig. 24) en genoteerd op het eerder opgestelde formulier.



Figuur 22: Drogende filterpapieren.



Figuur 23: Woo viewing chamber.



Figuur 24: Berekenen van de PCV.

Teneinde, het DNA veilig te stellen voor UV-beschadiging werd er op gelet dat de filterpapieren (Fig. 22) in de schaduw gedroogd en bewaard werden. Op het einde van de dag werd elk filterpapier in een aparte enveloppe gestoken en deze enveloppen werden per tien in een plastic zakje gestoken samen met silicagel met vochtigheidsindicator (blauwe korrels die roze worden bij vochtopname). Voordat het zakje volledig gesloten werd, werd het zo luchtvrij mogelijk gemaakt. In de weken nadien werd de kleur van de silicagel gevolgd en indien deze bijna volledig roze geworden was, werden de korrels vervangen.



Figuur 25: Veldonderzoek van het runderbloed: bloedcapillairen vullen en microscopisch onderzoek.



Figuur 26: Veldonderzoek van het runderbloed: centrifugeren van bloedcapillairen, PCV aflezen en buffy coat op filterpapier aanbrengen.

4.2.3. Maatregelen in geval van trypanosomiasis

Indien in een bloedstaal *Trypanosomas* gevonden werden bij microscopisch onderzoek, werd het betreffende **rund** opgezocht en behandeld met Veriben® (DA).

Wanneer het om een *T. congolense* infectie ging, of om een gemengde infectie waar *T. congolense* bij betrokken was, dan werden drie **muizen** intra peritoneaal ingespoten met elk 0.5 ml van het besmette, onverdunde, gehepariniseerde runderbloed (Fig. 27).



Figuur 27: Inoculatie muizen met positief runderbloed.

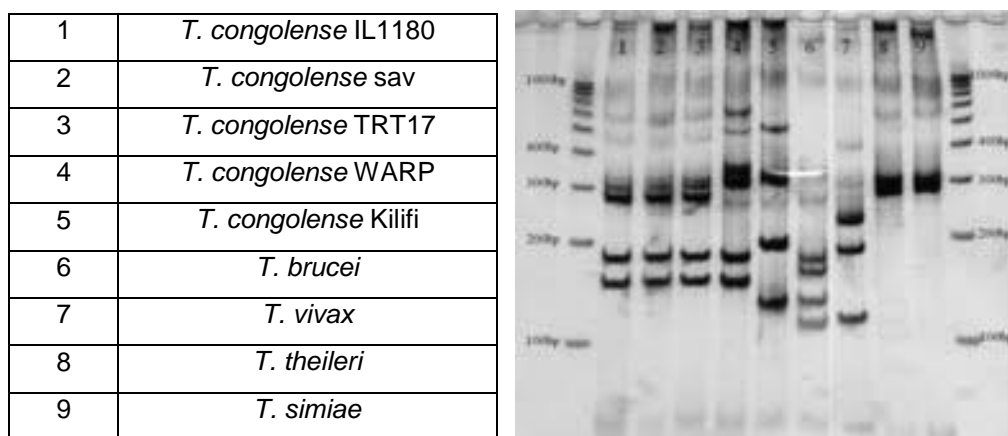
De gebruikte muizen waren “Swiss white mice” muizen tussen de acht en tien weken oud en wogen tussen de 25 en 40 gram. Ze werden gehouden in groepen van tien en gevoederd met commerciële pellets. Hun drinkwater werd dagelijks vervangen. Na het inoculeren van het besmette bloed werden de muizen, die bloed van hetzelfde rund gekregen hadden, per drie in eenzelfde kooi gehouden. Mannelijke en vrouwelijke dieren werden beide gebruikt maar afzonderlijk gehuisvest.

4.3. Data verwerking in het labo

4.3.1. PCR-RFLP-controle van het runderbloed

Na de microscopische controle in het veld, werden de positieve stalen gecontroleerd aan de hand van een PCR-RFLP analyse. Op deze manier kon men het *Trypanosoma* species correcter bepalen dan met de microscoop.

Nadien werden de resultaten vergeleken met een PCR-RFLP resultaat van gekende stalen (Fig. 28). In figuur 28 werden de banden bekomen nadat het 18S DNA uit de verschillende gekende *Trypanosoma* species, door middel van de restrictie enzymen Msp I en Eco 571, verknipt werd en de zo bekomen fragmenten gescheiden werden op een 10% PAGE gel. Vervolgens werden de banden met zilver zichtbaar gemaakt (Geysen *et al.*, 2003).



Figuur 28: De verschillende trypanosoma species en hun bijhorende bandenpatroon (Geysen *et al.*, 2003).

4.3.2. Opvolging van de muizen.

Twee tot zeven dagen na inoculatie werden de muizen, die geïnoculeerd werden met bloed waarin microscopisch *T. congolense* was gevonden, om de drie dagen gecontroleerd. Hun parasitemie werd geschat aan de hand van een druppel bloed verkregen na het afknippen van het topje (0,5 mm) van de staart. Deze druppel bloed werd op een draagglasje aangebracht, afgedekt met een dekglasje en bekeken bij een vergroting van 10x40. Het verloop van deze parasitemie werd bijgehouden door een controle om de drie dagen. De muizen die tot een maand na inoculatie negatief bleven onder de microscoop werden uit de proef verwijderd. Dit werd gedaan omdat het twee dagen tot maximum een maand kan duren voor een muis, geïnfecteerd met besmet runderbloed, positief wordt onder de microscoop (persoonlijke communicatie Delespoux).

Opvallend is dat de isolaten, die afkomstig zijn uit eenzelfde gebied, vaak een gelijkaardige periode nodig hadden om infectie in muizen te veroorzaken terwijl dit tussen isolaten uit verschillende gebieden vaak zeer uiteenloopt. In Tabel 6 worden de incubatieperiodes voor de verschillende isolaten weergegeven, samen met de plaats van isolatie.

Tabel 6: Aantal runderisolaten die infectie bij muizen veroorzaaken en de prepatente periode.

Plaats	Aantal positieve bloedstalen voor <i>T. congolense</i> .	Aantal isolaten die parasitemie bij muizen veroorzaken.	Prepatente periode in muizen (dagen).
Wedesa	2	2	9d
			9d
Shumoro	3	1	33d
Gomsha	0	0	-
Jatu	5	3	12d
			14d
			22d
Yatu	11	5	5d
			5d
			5d
			7d
			7d
Ketabosso	2	0	-
Weira	0	0	-
Abelti	2	1	16d
TOTAAL	25	12	Mediaan: 9d

4.3.3. Collectie positief muizenbloed

Als de parasitemie hoog genoeg was, d.w.z. rond 8 op de Herbert en Lumsden schaal (Herbert en Lumsden, 1976), werd het bloed geïncubeerd uit het hart. Met dit geïncubeerde bloed werden twee dingen gedaan. Ten eerste werden er, per bloedstaal, 24 muizen geïnjecteerd (met het oog op latere resistentietesten) en ten tweede werden, met het overige bloed, stabilaaten gemaakt die in vloeibare stikstof bewaard werden.

4.3.3.1. Collectie bloed uit het hart van de muis

Eerst werd de muis verdoofd. Hiervoor werd zij intraperitoneaal ingespoten met 2ml nembutal. Na ongeveer twee tot drie minuten was de muis volledig buiten bewustzijn en werd zij op haar rug op tafel gelegd (Fig. 29).

Nadien werden de pijnreflexen van het dier getest door in poten en staart te knijpen met het pincet. Pas als het dier hier geen enkele reactie meer op vertoonde, werd de buikholte geopend. Dit gebeurde zo dicht mogelijk onder het sternum, zodat het diafragma gemakkelijk bereikbaar was. Eerst werd de huid m.b.v. een pincet en een kleine, scherpe weefselschaar ingesneden en vervolgens werd door de spierlagen geknipt. Met de punt van een naald werd het diafragma doorprikt zodat de muis op dat moment stopte met ademen en het diafragma werd vervolgens verder geopend met de schaar. Op dit moment pompte het hart nog zodat een maximum aan bloed kon verzameld worden door de naald van de injectiespuit door het myocard te prikken en vervolgens te aspireren. Hiervoor werd een

injectiespuit van 2ml met een naald van 21G gebruikt waarin anticoagulans op voorhand opgetrokken werd. Als anticoagulans werd EDTA verdund met gedestilleerd water gebruikt. In totaal een volume van 0,3ml. Gemiddeld kon zo'n 1,5ml bloed per muis verzameld worden (afhankelijk van de ervaring van de persoon die het bloed prikt en van het gewicht van de muis).



Figuur 29: Nadat de muis het bewustzijn verloren heeft, wordt zij op haar rug op tafel gelegd. De met bloed gevulde injectiespuit toont aan hoeveel bloed er uit het hart van de vorige muis verzameld kon worden.

De parasitemie in het centrale bloed (verkregen uit het hart) was veel lager (één trypanosoom in 15 microscoopvelden) dan de parasitemie die perifeer (8 op Lumsden en Herbert schaal (Herbert en Lumsden, 1976)) in de staart gevonden werd. Deze bevinding werd ook gemaakt door Robson en Ashkar (1972) en wordt verklaard door de theorie dat het voor trypanosomen voordeliger is om perifeer aanwezig te zijn daar zij op die manier meer kans hebben om door een tseetseevlieg opgenomen te worden (persoonlijke communicatie prof. Van den Bossche, 2010). Een andere theorie vertelt ons dat de trypanosomen, aanwezig in het bloed, aangetrokken worden door bepaalde stoffen die de gastheer produceert als reactie op een ontsteking. Deze ontsteking zou veroorzaakt worden door de injectienaald of, in het wild, door een concentratie van tseetseebeten op de runderhuid (persoonlijke communicatie Delespaux).

Een inoculatie test met behandeld bloed dat een half uur in de vloeibare stikstof gezeten had, toonde aan dat deze lage parasitemie ter hoogte van het hart, geen negatieve gevolgen had voor het infectievermogen van de stabilaten.

Het bloed van dieren uit dezelfde kooi, m.a.w. geïnjecteerd met hetzelfde runderbloed, werd onderling gemengd. Deze bevatten immers dezelfde parasieten. Vervolgens werd dit bloed in twee delen verdeeld. Eén deel werd gebruikt voor de resistentietesten en het overige deel werd behandeld en bewaard in de vloeibare stikstof.

4.3.3.2. Stabiliaatproductie voor bewaring in vloeibare stikstof

Gemiddeld werd 1,5ml bloed per muis geïncubated. Dit gaf dus ongeveer 4,5ml bloed per kooi (drie muizen) waarvan 1,25ml gebruikt werd voor de resistentietesten en 3ml voor het maken van stabilaten.

Dit volume werd echter zelden bereikt doordat vaak slechts twee muizen gedood werden voor stabilaat productie zodat één muis overbleef en kon blijven leven tot er voldoende kooien vrij kwamen om de resistentietest te starten (per resistentietest waren vier kooien nodig). Daarboven wilden we een zo hoog mogelijke parasitemie wanneer we het bloed voor de stabilaten verzamelden, zodat dit, ten gevolge van de in pieken voorkomende parasitemie, niet kon uitgesteld worden. Wanneer slechts één muis van een bepaalde kooi in leven werd gelaten, werd telkens een passage naar een nieuwe muis gemaakt. Op deze manier werd voorkomen dat we een stabilaat zouden moeten gebruiken voor de resistentietest indien de eerste muis zou bezwijken aan trypanosomiasis of aan een andere doodsoorzaak. Het gebruik van een stabilaat zou de resultaten van deze test niet beïnvloeden, maar het zou wel een vermindering in het aantal stabilaten tot gevolg hebben, wat niet gewenst was.

Eén stabilaat bevat een minimum volume van 0,4ml, dat voor de helft uit bloed bestaat. Vóór het geparasiteerde bloed in de vloeibare stikstof werd gedompeld, dient het immers gemengd met een gelijk volume aan **cryomedium**. Dit cryomedium werd bereid door één deel eierdooier met drie delen DNS (di 0,9% w/v natrium chloride en 5% w/v glucose) en drie delen Triladyl® (Minitube international) te mengen.

Bereiding van het cryomedium (Maina *et al.*, 2006; MINITÜB GmbH, 2010):

- Eerst werd de eierschaal gedesinfecteerd met alcohol en werd er gewacht tot de schaal weer droog was.
- Vervolgens werd het ei gebroken en werd m.b.v. een injectienaald zoveel mogelijk van de eierdooier geïncubeerd. Hierbij moest men erop letten dat geen eiwit of dooiermembranen mee opgezogen werden in de injectienaald.
- Langzaam roerend werd Triladyl® toegevoegd aan de dooier zodat we een homogeen mengsel kregen.
- Uiteindelijk werd ook de vooropgestelde hoeveelheid DNS toegevoegd.

Vóór bloed en cryomedium gemengd werden, werd erop gelet dat zij beide ongeveer dezelfde temperatuur hebben. Een groot verschil in temperatuur (bloed uit de muis aan 37°C en cryomedium dat bewaard wordt aan -20°C) zou immers een koude-shock voor de trypanosomen kunnen veroorzaken.

Het nodige aantal cryotubes werd gemerkt met datum en plaats van de isolatie en nummer van het oorspronkelijke rund. In elke cryotube werd 0,4ml van het bloed-cryomedium mengsel gedruppeld m.b.v. een pasteur-pipet. De tubes werden stevig dichtgedraaid en gedurende minimum één uur in de gasfase boven de vloeibare stikstof gehangen. Nadien werden zij neergelaten in de vloeibare stikstof.

Ter controle werden twee muizen geïnoculeerd met bloed dat na deze behandeling een half uur in de vloeibare stikstof had gezeten. Hiertoe werden de cryotubes opgezocht en onmiddellijk ontdooid in een waterbad op +/- 37°C. Daarna werd de inhoud zonder verdere bewerking peritoneaal ingespoten in negatieve muizen. Beide muizen werden getest na acht dagen en er werden trypanosomen in hun

bloed gevonden. Deze test geeft aan dat de stabilaatproductie correct gebeurde en dat de parasieten na vriezen en ontdooien nog steeds infectieus waren.

4.3.4. Resistentietesten

Met de bloedstalen die verkregen werden uit het hart van de derde muis van elke stam, werden telkens 24 nieuwe muizen geïnjecteerd. Hiertoe werd het bloed eerst verdund in DNS (di 0,9% w/v natrium chloride en 5% w/v glucose). Aangezien de parasitemie minimum 7 was op de Herbert en Lumsden schaal (d.i. 10^7 trypanosomen in 1 ml (Herbert en Lumsden, 1976)), werd 1,25ml bloed met 13,75ml DNS verdund zodat uiteindelijk 5×10^5 trypanosomen per muis geïnjecteerd konden worden.

Op de eerste dag werden 24 muizen ingespoten met elk 0,5ml van het verdunde bloed. De dag nadien, rond hetzelfde tijdstip, werden 18 van deze muizen behandeld. De zes andere bleven onbehandeld als controlegroep.

De 18 muizen werden in drie groepen van zes dieren ingedeeld. Elke groep werd anders behandeld:

- groep 1 kreeg 10mg/kg DA (Veriben®).
- groep 2 kreeg 20mg/kg DA (Veriben®).
- groep 3 kreeg 1mg/kg ISM (Veridium®).

Elke groep wordt in een aparte, duidelijk gelabelde kooi gehuisvest (Fig. 30).



Figuur 30: Labeling van de kooien voor de resistentietesten. In de kooi op deze foto zitten muizen die geïnoculeerd werden met bloed van rund F119 uit Jatu en die één dag na inoculatie behandeld werden met diminazene aan een dosis van 20mg/kg.

Opmerking: de dosis werd berekend gebaseerd op de actieve stof. Voor Veriben® geldt immers dat één zakje van 2,36g slechts uit 1,05g actieve stof bestaat. Voor Veridium® maakt dit geen verschil.

Beide gebruikte geneesmiddelen zijn een product van Ceva sante animale.

Veriben®:	lot: 500A1	Veridium®:	lot: 173A1
	Fab: 05/2008		Fab: 02/2009
	Exp: 05/2012		Exp: 02/2014

Vervolgens werd de parasitemie van deze dieren om de drie dagen gecontroleerd door onderzoek van het staartbloed. Er werd gekeken of in de behandelde dieren een suppressie of een terugval van de parasiet in het bloed gevonden kon worden.

4.3.5. PCR testen

Eerst werd het DNA uit de bloedstalen gehaald volgens de methode beschreven door de Almeida *et al.* (1997):

Uit de bloedstalen die genomen werden op filterpapier werden, per kooi, vier confetti's geknipt uit een bloedstaal van dezelfde muis en samengevoegd in een tube. Tussen twee stalen in werden de knippers die hiervoor gebruikt werden, vijf seconden in de vlam van een bunsenbrander gehouden. Dit om DNA-overdracht van één staal op het volgende te voorkomen.

Per vier confetti's werd nadien 1ml Pbs-saponine 0,5% toegevoegd (1 Pbs tablet voor 100ml mqw en 0,5g saponine per 100ml Pbs). Deze stoffen zorgen ervoor dat hemoglobine opgelost wordt uit de stalen zodat het de PCR-reactie niet kan verstoren.

Vervolgens werd elke tube grondig geschud en werden zij een nacht in een koelkast aan 4°C gezet.

's Anderendaags werden alle tubes gedurende 1 minuut gecentrifugeerd aan 15000g en vervolgens werd het supernatans er afgehaald. Op de achtergebleven confetti's werd nadien 100µl Chelex® 10% (10g Chelex® 100 (BioRad) in 100ml mqw) gebracht. Chelex® 100 is een harsachtige stof die vele onzuiverheden (vb. peptiden) uit het staal absorbeert, maar DNA ongemoeid laat.

Vervolgens werden de tubes 10 minuten op 95°C gehouden, zodat de cellen lyseerden en het DNA vrijkwam. Ook nu weer werden de tubes geschud en gecentrifugeerd (deze keer 5min aan 15000g).

Deze stalen werden in de koelkast (4°C) bewaard tot de dag nadien, wanneer de PCR reacties gestart werden.

Nadien werd een mastermix gemaakt voor de 20 stalen en voor 2 extra controle stalen volgens Geysen *et al.* (2002):

Er werden voor elk staal twee PCR reacties uitgevoerd, telkens met andere primers. De eerste reactie (18ST) controleert het staal op de aanwezigheid van het 18ST gen dat codeert voor een kleine 18S ribosomale sub-eenheid. Indien dit gen aanwezig is, dan is het staal positief voor trypanosomen. De tweede reactie (Ade2) is de eerste stap om aan te tonen of de aanwezige parasieten al dan niet resistent zijn tegen DA. Dit gebeurt door een puntmutatie in het Ade2 gen, dat codeert voor de P2-type purine transporter, aan te tonen.

Voor beide testen werd 5µl van elk staal gemengd met 20µl van de mastermix en bovenop dit mengsel werden twee druppels minerale olie gelegd. De bereiding van mastermix werd uitgevoerd volgens het protocol van “mastermix voor de 1^e ronde” van Geysen *et al.* (2002).

Vervolgens werden alle stalen 40 keer aan de cyclus onderworpen die is weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7: PCR-cyclus.

	Temperatuur (°C)	Tijd (seconden)
Denaturatiestap	92	30
Aanhechtingsstap	58 (voor 18ST)/ 59 (voor Ade2)	45
Verlengingsstap	72	60

De stalen die de 18ST reactie hadden ondergaan werden nadien nog onderworpen aan een nested reactie. Hiertoe werd 0,5µl van de stalen uit de eerste ronde gevoegd bij 24,5µl van een tweede mastermix. De bereiding hiervoor gebeurde volgens het protocol van Geysen *et al.* voor een mastermix voor de 2^e ronde (2002).

Vervolgens lieten we deze stalen de hogervermelde cyclus voor 18ST opnieuw 25 keer doorlopen. Op deze manier kregen we een zeer specifieke amplificatie van het DNA stuk dat het gen, dat codeert voor de kleine 18S ribosomale sub-eenheid, bevat. Een nested reactie zorgt er immers voor dat uit de groep van alle DNA stukken die in de eerste cyclus vermeerderd werden, het specifieke stuk van interesse, en enkel dit, nog eens vermeerderd wordt. Het komt immers regelmatig voor dat, tijdens de eerste ronde, de primers ook aspecifiek binden op andere stukken DNA.

Het zichtbaar maken van de DNA fragmenten op agarose gel.

Ter voorbereiding werd 3g routine agarose vermengd met 150ml 0,5 x TAE buffer en gekookt. Wanneer de agarose volledig opgelost was, lieten we het mengsel afkoelen tot 50-60°C en werd het nadien in een houder met kammen gegoten.

Van elk staal werd, na PCR reactie, 5µl op een parafilm strookje gemengd met 2µl loading buffer (bromofenol blauw). Dit mengsel werd vervolgens in de uitsparingen (t.g.v. de kammen) van de gel gebracht. In de laatste uitsparing werd 5µl van de 100-1000bp ladder aangebracht.

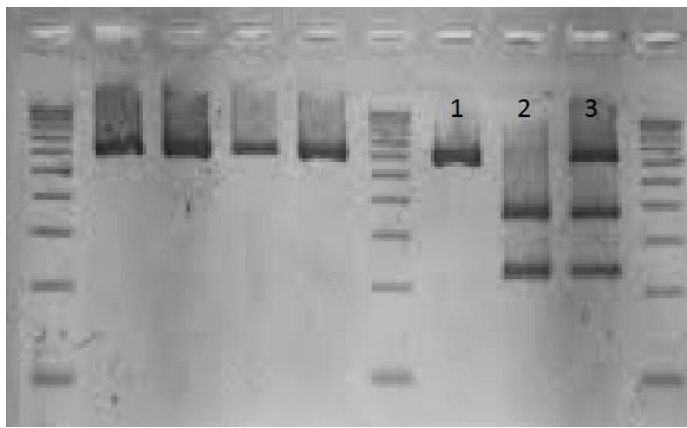
Nadien werd gedurende 20min een elektrisch veld van 100 Volt over de gel aangelegd, wat zorgde voor een migratie van de DNA fragmenten. Na deze 20min werd de gel 30min in een ethidium bromide/ TAE bad (1µg/100ml) geïncubeerd teneinde de DNA fragmenten zichtbaar te maken. Uiteindelijk werd een UV-foto genomen en werd de gel op correcte manier verwijderd.

4.3.6. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorfism

Nadat de **18ST PCR reactie** positief bleek, m.a.w. nadat aangetoond was dat er trypanosomen in het muizenbloed aanwezig waren, was het relevant om na te gaan om welk species en subgroep het concreet ging. Dit werd onderzocht met behulp van RFLP analyse. Hierbij worden de DNA fragmenten

die bekomen werden tijdens de PCR, verknipt door specifieke restrictie enzymen. Aan de hand van de grootte en het aantal van deze fragmenten, kunnen we achterhalen welk species exact in het bloed aanwezig was.

Na de **Ade2 PCR reactie** is sowieso nog een RFLP test nodig voordat we conclusies kunnen trekken over de resistentie van de aanwezige trypanosomen tegen DA. De resultaten van deze Ade2 PCR-RFLP analyse werden nadien vergeleken met de bandenpatronen uit Fig. 31. De resultaten van Fig. 31 werden bekomen door analyse van trypanosomen met een gekende resistentiestatus. Eén band betekent dat de trypanosomen gevoelig waren aan DA, twee banden betekenen resistentie en drie banden betekenen dat zowel gevoelige als resistente trypanosomen in het bloedstaal aanwezig waren of dat de aanwezige trypanosomen heterozygoot zijn voor de resistentie veroorzakende mutatie.



1.	Gevoelig aan DA
2.	Resistent aan DA
3.	Gemengd of heterozygoot

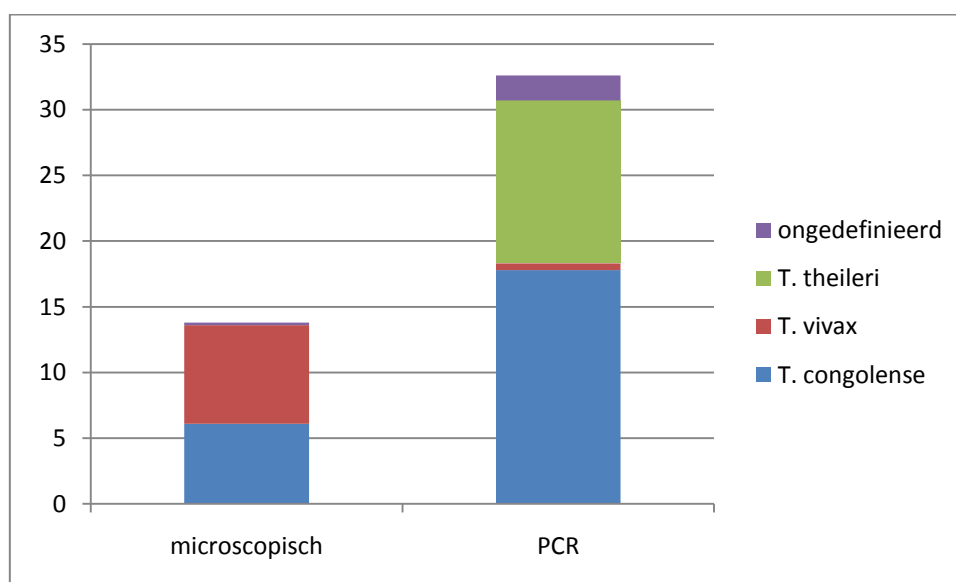
Figuur 31: Ade 2 PCR-RFLP reactie van stammen met een gekende resistentiestatus. (1) Eén band: gevoelig aan DA, (2) Twee banden: resistent aan DA, (3) Drie banden: gemengd (resistente en gevoelige trypanosomen samen) of heterozygote trypanosomen (Delespaux *et al.*, 2006).

5. Resultaten

5.1. Bloedname runderen

In totaal werden 49 runderen van de 411 (11.9%) positief bevonden na **microscopisch onderzoek** voor *Trypanosoma*. Van deze 49 waren er 17 die enkel met *T. congolense* besmet waren en 8 waarbij een gemengde infectie met *T. congolense* gevonden werd. In totaal werd dus in 25 van de 411 dieren (6.1%) *T. congolense* gevonden. Voor *T. vivax* vonden we in deze populatie 31 positieve individuen (7.5%). In 1 positief staal konden we het *Trypanosoma* species niet identificeren. Tabel 8 geeft een overzicht van de genomen bloedstalen en de gevonden *Trypanosoma* species.

Wanneer het runderbloed dat verzameld was op de filterpapieren later met **PCR-RFLP** geanalyseerd werden, vonden wij een prevalentie van 17.8% voor *T. congolense*, 12.4% *T. theileri*, 1.9% aspecifiek patroon en 0.5% *T. vivax*. Deze geven samen een prevalentie van 32.6% voor trypanosomiasis. De verhoudingen tussen deze percentages worden in Fig. 32 weergegeven.



Figuur 32: Het verschil tussen de microscopische en PCR analyse van de 411 veldstalen.

Tabel 8: Trypanosoma species gedetecteerd in runderbloed na microscopisch onderzoek.

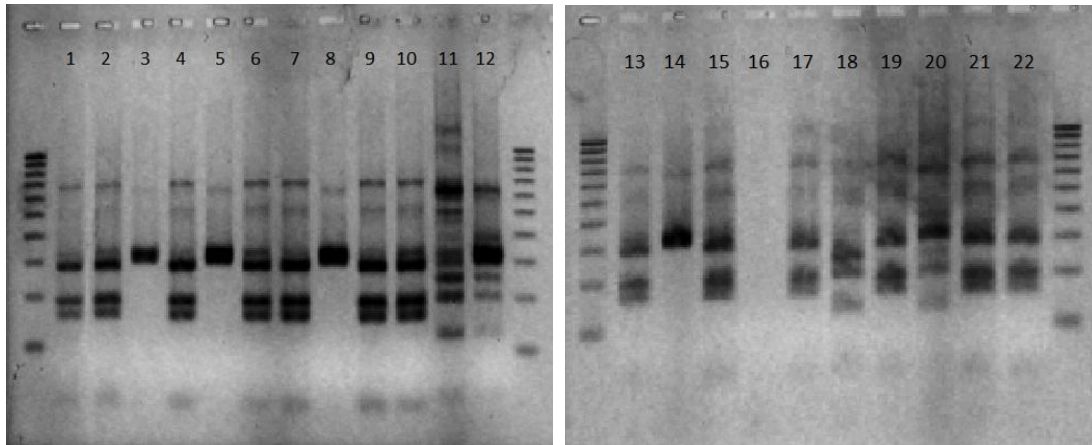
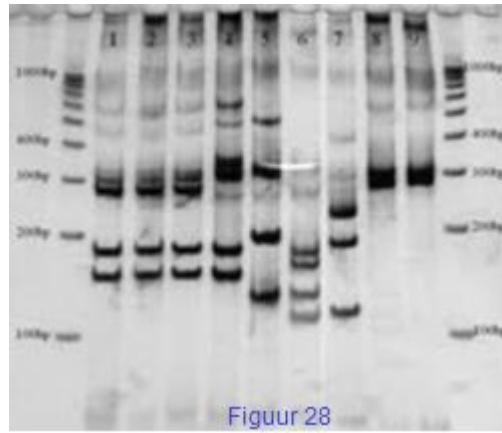
(*: ILRI intervention site)

Plaats en datum (2010)	Aantal bloedstalen	Positieve buffy coat				Percentage positief
		<i>T. congo</i>	<i>T. vivax</i>	gemengd (<i>T.c</i> + <i>T.v</i> of <i>T.v</i> + <i>T.b</i>)	Ongedefinieerd	
Wedesa (17 aug)	38	2	0	0	0	6.25%
Shumoro (18 aug)	63	2	1	1	0	6.35%
Gomsho (19 aug)	14	0	0	0	0	0%
Jatu (19 aug)	34	5	0	1	0	17.65%
Yatu* (20 aug)	75	5	16	7	1	38.67%
Ketabosso* (21 aug)	76	1	4	1	0	7.89%
Weira (5 okt)	50	0	0	0	0	0%
Abelti* (6 okt)	61	2	0	0	0	3.28%
TOTAAL	411	17	21	10	1	11.9%

Wanneer de 25 bloedstalen, die microscopisch besmet waren met *T. congolense*, achteraf met PCR-RFLP geanalyseerd werden, bleek dat veertien van deze stalen werkelijk *T. congolense* bevatten (Tabel 9). Hieronder worden de PCR-RFLP resultaten weergegeven van 21 van de 25 runderbloedstalen die microscopisch besmet waren met *T. congolense* (Fig. 33) en de referentie bandenpatronen van gekende species (Fig. 28) wordt herhaald. Uit de vergelijking van deze twee volgen de resultaten die in Tabel 9 worden weergegeven.

Van de stalen die positief bevonden werden voor *T. congolense*, zijn er twee afkomstig uit runderen van Wedesa, één uit Shumoro, vier uit Jatu, vijf uit Yatu en twee uit Abelti. Dus veertien in totaal. In deze beelden ontbreken de analyses van twee stalen uit Ketabosso en twee uit Abelti. Deze vier stalen werden echter ook met PCR-RFLP onderzocht en uit de resultaten bleek dat enkel één staal uit Abelti *T. congolense* bevatte.

1	<i>T. congolense</i> IL1180
2	<i>T. congolense</i> sav
3	<i>T. congolense</i> TRT17
4	<i>T. congolense</i> WARP
5	<i>T. congolense</i> Kilifi
6	<i>T. brucei</i>
7	<i>T. vivax</i>
8	<i>T. theileri</i>
9	<i>T. simiae</i>



Figuur 33: Species identificatie van de veldresultaten m.b.v. PCR-RFLP.

Tabel 9: De trypanosoma species in het runderbloed, d.m.v. PCR-RFLP.

1. <i>T. congolense</i>	9. <i>T. congolense</i>	17. <i>T. congolense</i>
2. <i>T. congolense</i>	10. <i>T. congolense</i>	18. <i>T. vivax</i>
3. <i>T. theileri</i>	11. <i>T. vivax</i> - <i>T. theileri</i>	19. <i>T. congolense</i>
4. <i>T. congolense</i>	12. <i>T. vivax</i> – <i>T. theileri</i>	20. <i>T. theileri</i> – <i>T. vivax</i>
5. <i>T. theileri</i>	13. <i>T. congolense</i>	21. <i>T. congolense</i>
6. <i>T. congolense</i>	14. <i>T. theileri</i>	22. <i>T. congolense</i> (controle)
7. <i>T. congolense</i>	15. <i>T. congolense</i>	
8. <i>T. theileri</i>	16. negatief	

5.2. Positieve muizen

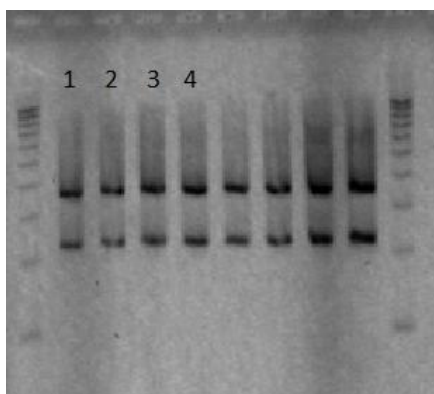
Toch werden de vijftientig stalen die positief waren onder de microscoop allen geïnjecteerd in muizen. Uiteindelijk veroorzaakten twaalf van deze vijftientig een parasitemie bij de muizen ten laatste één maand na inoculatie. De muizen die positief werden na uiterlijk één maand waren allen ingespoten met een stam die *T. congolense* bevatte op PCR. Behalve één *T. congolense* stam uit Jatu en de *T. congolense* stam uit Abelti, veroorzaakten alle *T. congolense* stammen een infectie bij de muizen.

Van de twaalf stammen die aansloegen bij de muizen werden stabilaten gemaakt. De hoeveelheid bloed die hiervoor uit twee muizen kon verzameld worden, varieerde tussen de stammen. Uiteindelijk werd per kooi en dus per stam, een minimum van 8 stabilaten verkregen.

5.3. Resistentietesten

Er werden in totaal 288 muizen getest (6 x 4 x 12), waarvan er acht stierven voor ze positief werden. Steeds was dit ten gevolge van een infectie ter hoogte van de injectieplaats. Vijf van deze acht waren afkomstig uit een controlegroep, de overige drie kwamen elk uit één van de drie verschillende behandelingsgroepen. Op basis van de 280 overlevenden werden volgende conclusies getrokken:

Slechts acht van de behandelde muizen (3.7% (8/216)) werden nooit positief, d.i. na een laatste controle op dag 60. Van de acht waren er vier geïnoculeerd met bloed van rund **F119 uit Jatu** en drie met bloed van rund **F058 uit Abelti**. Zes van de acht waren behandeld met **ISM** en de twee overige met **DA 10mg/kg**. Doch, de andere dieren uit deze twee kooien (zelfde bloed en zelfde behandeling) werden wel parasitemisch. Aldus werden alle stammen, inclusief F119 en F058, als resistent beschouwd aan de gebruikte geneesmiddelen. Op PCR-RFLP bleek, na vergelijking met Fig. 31, dat deze twee stammen inderdaad resistent waren aan DA (Fig. 34). Ze genereerden immers een bandenpatroon dat bestond uit twee banden.

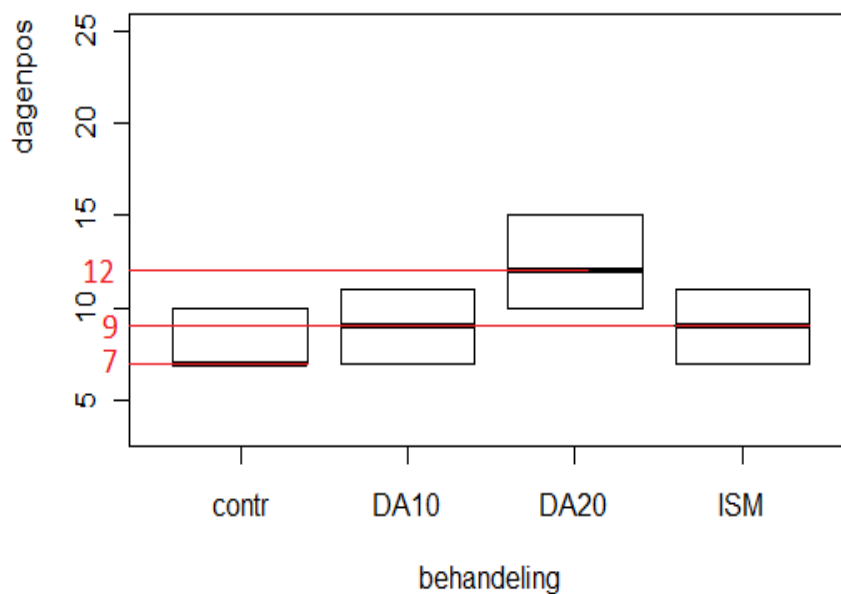


Nummer bandenpatroon	Stam en behandelingsgroep	Status
1.	F058 DA10	Resistent aan DA
2.	F058 DA20	Resistent aan DA
3.	F119 DA10	Resistent aan DA
4.	F119 DA20	Resistent aan DA

Figuur 34: Resistentiestatus volgens PCR-RFLP van het bloed van de muizen die microscopisch geen parasitemie vertoonden.

De mediaan van de incubatietijden en de 25% en 75% kwantielen werden voor de verschillende behandelingsgroepen, a.d.h.v. het statistisch programma "R 2.12.0", berekend en worden weergegeven in Fig. 35:

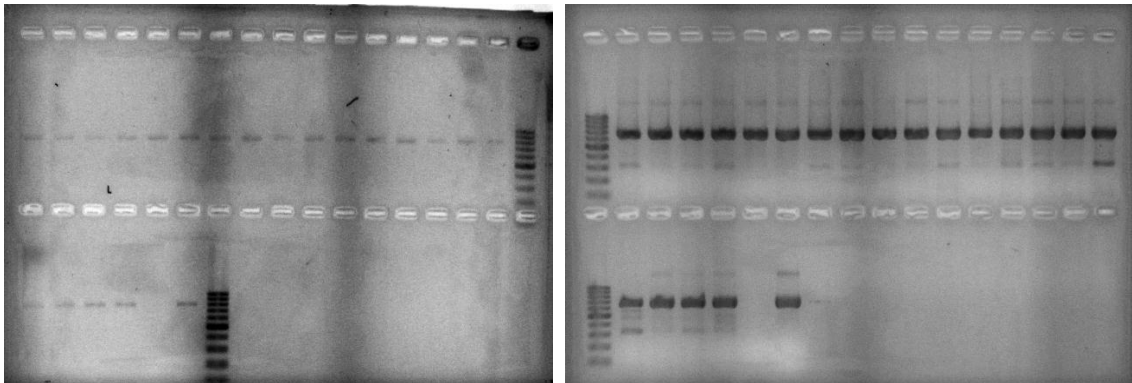
- Voor de 67 muizen (twaalf kooien van zes en vijf die stierven) uit de **controlegroepen** werd een mediaan van 7 dagen gevonden (kwantielen: 25% = 7, 75% = 10).
- De 71 dieren (één stierf) die behandeld werden met **DA 10mg/kg**, hadden een mediaan op 9 dagen (kwantielen: 25% = 7, 75% = 11).
- En voor de 71 dieren (één stierf) die behandeld werden met **DA 20mg/kg** was de mediaan 12 dagen (kwantielen: 25% = 10, 75% = 15).
- De 71 dieren (één stierf) die positief werden na behandeling met **ISM**, hadden een mediaan op 9 dagen (kwantielen: 25% = 7, 75% = 11).



Figuur 35: Per behandelingsgroep worden de mediaan en de kwantielen op 25% en op 75% weergegeven.

5.4. PCR-RFLP

In Fig. 36 worden, als voorbeeld, de resultaten van de PCR analyses op het bloed van twintig muizen uit de resistentietesten weergegeven.

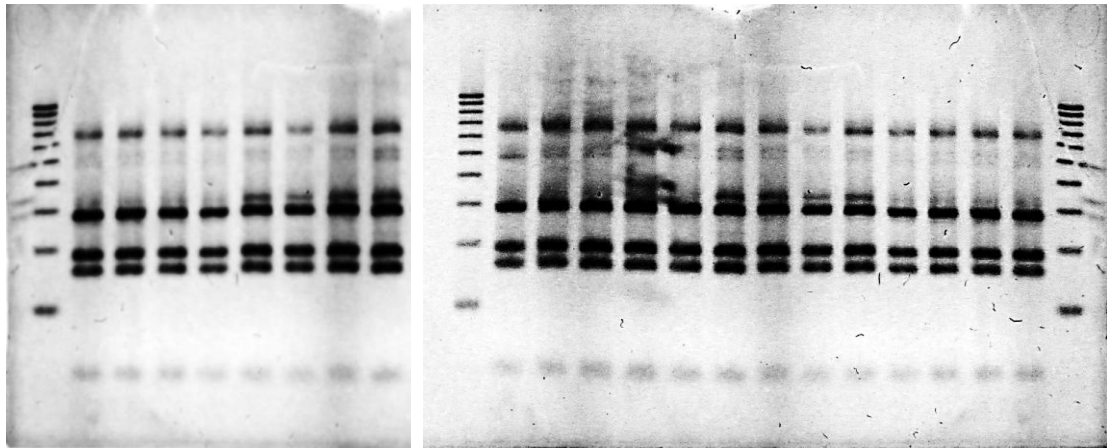


Figuur 36: (links) resultaten na 18ST PCR en (rechts) resultaten na Ade2 PCR.

Alle stalen, zowel bij de 18ST als bij de Ade2 reactie, genereerden hetzelfde bandenpatroon. Voor de 18ST zijn dit lichtgekleurde, dunne bandjes en bij de Ade2 krijgen we donkere, iets dikkere banden. Enkel het voorlaatste staal op de onderste rij geeft geen positief resultaat, dit is immers de negatieve controle. Deze resultaten werden gevonden voor alle bloedstalen die afkomstig waren van de muizen uit de resistentietesten.

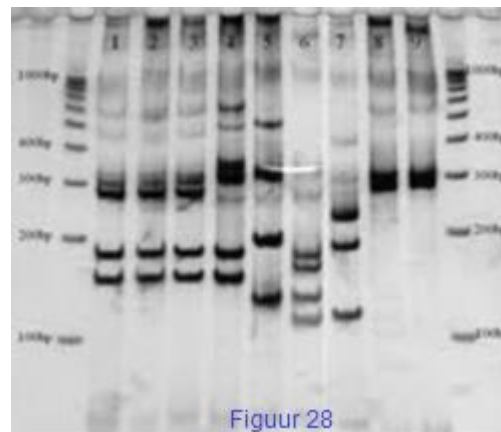
Voor de **18ST PCR reactie** betekent dit bandenpatroon dat in de 20 geteste bloedstalen **trypanosomen** aanwezig waren. Dit resultaat was te verwachten aangezien a) PCR-RFLP analyse op het runderbloed reeds had aangetoond dat alle stammen die in de muizen vermenigvuldigen van het *T. congolense* savannah type waren en b) dat bovendien bijna alle muizen microscopisch parasitemisch waren vóór hun staartbloed op filterpapier verzameld werd. Ook de acht muizen waarbij na 60 dagen nog geen trypanosomen in het bloed gevonden konden worden onder de microscoop, testten positief op 18ST PCR.

Nadien werd op het staal uit de **18ST PCR** reactie nog een **RFLP** uitgevoerd. Uit de vergelijking van onze resultaten (Fig. 37) met een gel waarop gekende resultaten te zien zijn (Fig. 28 wordt herhaald), blijkt dat het hier telkens om een ***T. congolense* van het savannah type** ging.



Figuur 37: 18ST PCR-RFLP van het bloed van 20 muizen uit de resistentietesten.

1	<i>T. congolense</i> IL1180
2	<i>T. congolense</i> sav
3	<i>T. congolense</i> TRT17
4	<i>T. congolense</i> WARP
5	<i>T. congolense</i> Kilifi
6	<i>T. brucei</i>
7	<i>T. vivax</i>
8	<i>T. theileri</i>
9	<i>T. simiae</i>

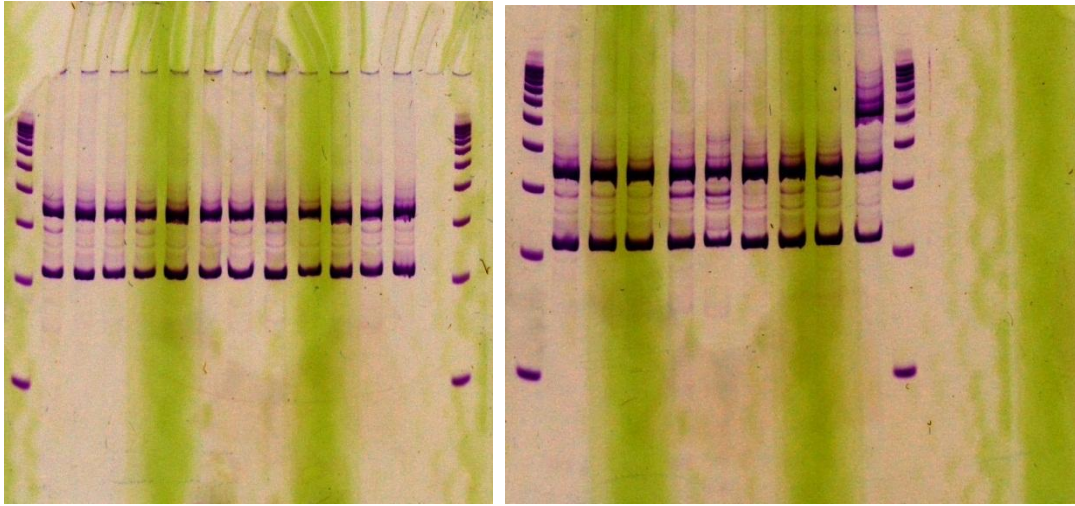


Figuur 28

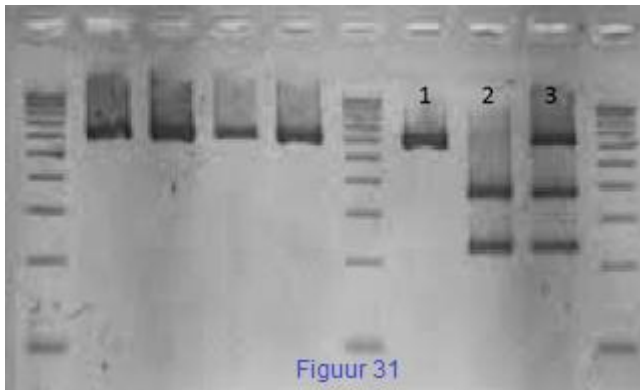
Na de **Ade2 PCR reactie** is sowieso nog een RFLP test nodig voordat we conclusies kunnen trekken over de resistentie van de aanwezige trypanosomen tegen DA. Hieronder worden de resultaten van deze RFLP weergegeven (Fig. 38).

Als referentie nemen we de resultaten van een **Ade 2 PCR-RFLP** analyse van trypanosomen met een gekende resistentiestatus (Fig. 31 wordt herhaald). Na het scheiden van de fragmenten kregen we het bandenpatroon dat overeenkomt met de resistentiestatus van de respectievelijke trypanosomen: (1) Eén band: gevoelig aan DA, (2) Twee banden: resistent aan DA, (3) Drie banden: gemengd (resistente en gevoelige trypanosomen samen) of heterozygoot (Delespaux *et al.*, 2006).

Uit de vergelijking van dit bandenpatroon met onze resultaten, blijkt dat alle trypanosomen die in deze muizen aanwezig waren, **resistent** waren **tegen DA** en dat er bovendien geen gevoelige parasieten aanwezig waren. Dit was ook te verwachten aangezien de dieren die met de twee verschillende dosissen DA behandeld waren niet genazen en aangezien de dieren uit de controle- en uit de ISM-groep met dezelfde trypanosomen als de DA-groepen geïnjecteerd waren.



Figuur 38: Resultaten van de PCR-RFLP Ade2 reactie.



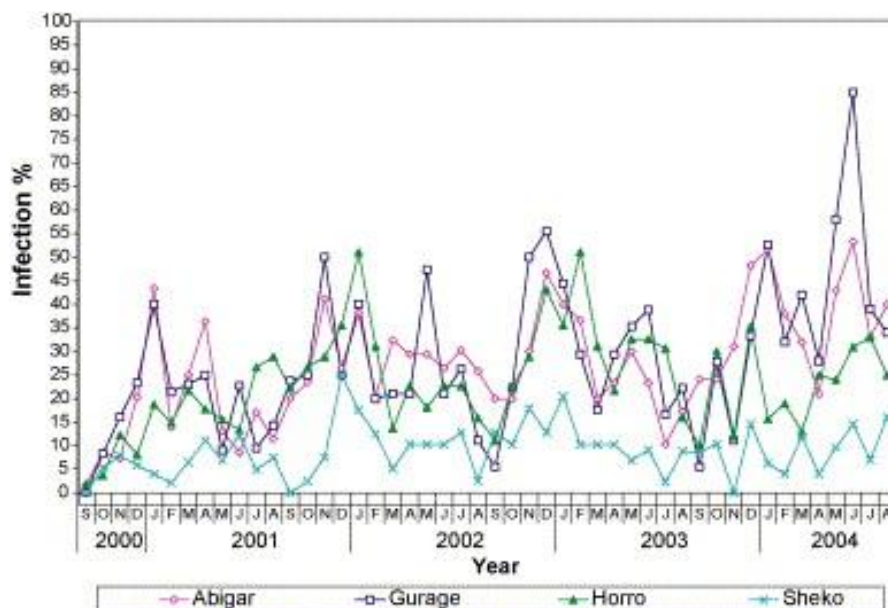
4.	Gevoelig aan DA
5.	Resistent aan DA
6.	Gemengd of heterozygoot

6. Discussie

6.1. *T. congolense* in runderen

De dag vóór de collectie van runderbloed werden de boeren via de lokale dierenarts of dierenartsassistent op de hoogte gebracht van de komende controles en van het feit dat de parasitemische dieren behandeld zouden worden. Men moet hiermee rekening houden wanneer later de prevalentie van de ziekte in de streek geschat wordt. Het kan immers zijn dat vooral de boeren die trypanosomiasis als probleem in hun kudde ervaren, op deze oproep ingingen, wat een **overschatting** van het probleem zou kunnen veroorzaken. Verder is het ook onwaarschijnlijk dat alle veehouders een kudde runderen meebrachten naar de plaats van bloedafname die representatief was voor hun hele kudde. Vooral degene die van verder komen, zullen waarschijnlijk enkel die dieren meegebracht hebben die in hun ogen ziek of verzwakt waren en een behandeling nodig hadden. Anderzijds zou het ook kunnen dat juist de mensen die het best voor hun dieren zorgen op zo'n oproep ingingen. De dieren van zulke boeren zullen dan eerder een **onderschatting** van de prevalentie veroorzaken, doordat zij bijvoorbeeld regelmatig preventief behandeld werden of doordat hun immuunsysteem sterker was en een eventuele parasitemie dus langer onder het detectieniveau van de microscoop bleef.

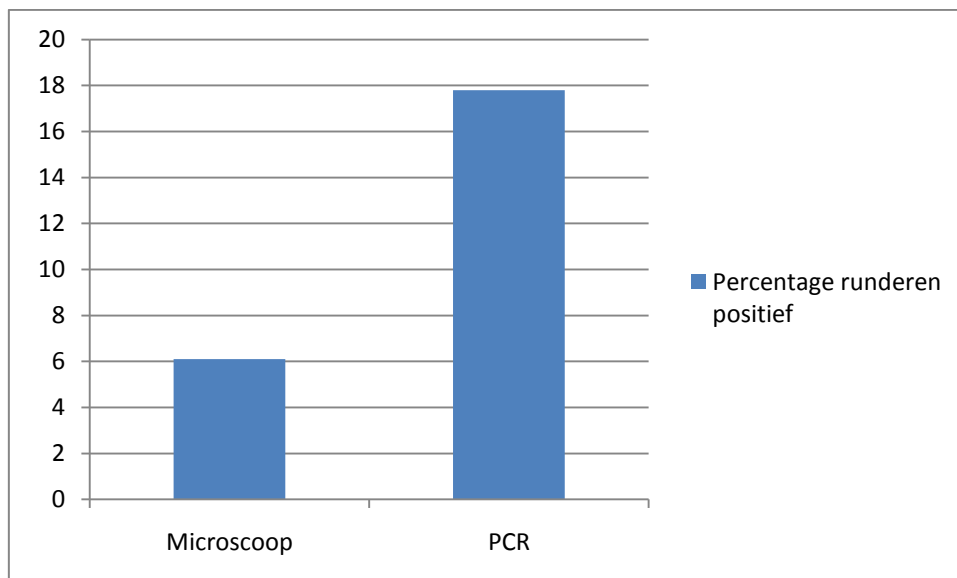
Onder de microscoop (Woo methode) werd een prevalentie van **11.9%** gevonden voor trypanosomen in het algemeen. In een studie van Lemesha *et al.* (2006) werden rond de Ghibe vallei gemiddelde prevalenties **tussen 9 en 27%** waargenomen na controle met de buffy coat techniek (Fig. 39). De vier runderrassen die hier besproken worden komen allen voor in de Ghibe vallei, maar het Horro en het Gurage ras zijn het frequentst aanwezig. Voor deze rassen werden de gemiddelde prevalenties aan trypanosomiasis op respectievelijk 23 en 27% geschat. De waarden uit dit onderzoek liggen dus hoger dan bij ons. Op PCR-RFLP vonden wij een prevalentie van 32.6%. In de studie van Lemesha *et al.* werden de stalen niet met PCR geanalyseerd.



Figuur 39: Per ras wordt de gemiddelde maandelijkse trypanosoma prevalentie weergegeven tussen september 2000 en augustus 2004 (Lemesha *et al.*, 2006).

De onderzoekers kozen de dieren **ad random** uit de kuddes, waarbij zij dieren van elke leeftijd, geslacht en gezondheidsstatus in de proef opnamen. Echter, er was **geen protocol** opgesteld om exact te bepalen van welke runderen al dan niet bloed genomen moest worden. Op die manier is het niet uit te sluiten dat de onderzoekers, onbewust en ongewild, bijvoorbeeld eerder naar de zieke of gemakkelijk te hanteren runderen neigden.

In het veld was het onmogelijk om een meer exacte detectiemethode te gebruiken dan de microscoop. Op die manier zijn echter veel *T. congolense* stammen onopgemerkt gebleven, niet geïnoculeerd in de muizen en aldus ook niet in de proef opgenomen. **PCR analyse** van de 411 stalen gaf een prevalentie voor *T. congolense* van **17.8%**, waar **microscopisch** slechts bij **6.1%** een parasitemie met dit species onderkend werd. Dit wil zeggen dat slechts iets meer dan een derde van de geïnfekteerde stalen met de microscoop herkend werden (Fig. 40). Vooral de stammen die een lage parasitemie veroorzaakten, gingen waarschijnlijk verloren. Ook tegenover de veehouders konden wij hierdoor niet garanderen dat al hun geïnfekteerde dieren een behandeling kregen.



Figuur 40: Het verschil in detectievermogen tussen microscopische en PCR analyse voor deze studie.

Na microscopisch onderzoek van de 411 veldstalen, werd 7.5% positief voor *T. vivax* bevonden en 6.1% positief voor *T. congolense*. Dit komt overeen met respectievelijk 63.3% en 51.0% van de dieren waarbij trypanosomiasis onderkend werd (de gemengde infecties werden meegerekend). Nochtans blijkt uit voorgaande onderzoeken in de Ghibe vallei, dat *T. congolense* het meest voorkomende species is in besmette runderen: Leak (1996) vond, onder de individuen die geïnfecteerd waren met trypanosomiasis, dat 84% met *T. congolense* besmet was. Lemesha *et al.* (2006) vonden in deze groep een prevalentie van 60% voor *T. congolense*. Tadesse en Tsegaye (2010) vonden een twee keer zo hoge prevalentie voor *T. congolense* als voor *T. vivax*. De oorzaak van de gewijzigde verhouding moet waarschijnlijk gezocht worden bij de beperkingen van de microscoop. Op PCR-RFLP vonden wij immers dat *T. congolense* in 17.8% van de dieren aanwezig was en dat *T. vivax* slechts

0.5% geïnfecteerd had (Fig. 32). Dit kan deels verklaard worden doordat de PCR-RFLP techniek die gebruikt werd minder gevoelig is voor *T. vivax* dan voor *T. congolense*, hierdoor kan het aantal *T. vivax* stammen immers onderschat worden.

Indien een rund positief bleek onder de microscoop werd het, ongeacht zijn gewicht, **standaard behandeld** met één volledig zakje Veriben® (DA) van 2,36g. De Ade 2 PCR-RFLP analyses van dit onderzoek toonden echter aan dat alle trypanosomen **resistent** waren tegen DA. Toch was de DA injectie niet volledig waardeloos aangezien behandelen, zelfs in geval van resistentie, nog een positieve invloed heeft op de klinische toestand van de dieren (Delespaux *et al.*, 2010).

6.2. *T. congolense* in de muizen

De bemerking dat stammen, afkomstig van runderen uit eenzelfde gebied, vergelijkbare tijdspannes (**prepatente periodes**) nodig hadden om een microscopisch detecteerbare parasitemie bij de muizen te veroorzaken, mag niet als statistisch relevant aanvaard worden aangezien hier niet specifiek voor getest werd. Dit was eerder “een toevallige ontdekking” die tot een vermoeden leidde. Het zou erop kunnen wijzen dat de trypanosomen die in eenzelfde gebied geïsoleerd werden, vaak tot dezelfde stam behoorden. De resultaten hierboven (Tabel 6) worden ter informatie weergegeven maar er mogen dus geen wetenschappelijke conclusies uit getrokken worden vóór deze hypothese getest wordt in een speciaal hiervoor ontworpen proef.

Van de **vijftwintig veldstalen** die onder de microscoop *T. congolense* leken te bevatten, bleken later, op PCR, slechts veertien ervan ook werkelijk *T. congolense* te bevatten (Fig. 33). Van de **veertien *T. congolense* stammen** die in muizen werden geïnjecteerd, waren er **twee die niet vermenigvuldigden in muizen**. Er werden telkens drie muizen, intra peritoneaal ingespoten, dus de kans dat het om een technische fout ging, is zeer klein. De muizen werden een maand lang gecontroleerd op parasitemie en nadien werden zij als “negatief” bestempeld en uit de proef verwijderd. Het is immers geweten dat een passage van rund naar muis enkele dagen tot een maand nodig kan hebben om aan te slaan (persoonlijke communicatie Delespaux, 2011). De eigenlijke reden voor het onder het detectieniveau blijven van de parasitemie of voor het uitblijven van de infectie, is onbekend.

In de resistentietesten werden de muizen die a) met dezelfde stam geïnoculeerd werden en b) met hetzelfde product behandeld werden, **in dezelfde kooi gehuisvest**. Aangezien de factor “kooi” de resultaten zou kunnen beïnvloeden is dit geen optimaal design. Het was beter geweest alle dieren samen te huisvesten of ze ad random te mengen. Echter, omwille van praktische redenen en teneinde de kans op fouten te minimaliseren, werd dit niet gedaan.

Alhoewel het niet binnen het doel van deze studie lag om de **virulentie** van de stammen te testen, zagen we toch dat, in de tijdspanne van minimum een maand waarin de muizen in leven gehouden werden, symptomen, zoals koorts of lethargie, mild tot afwezig waren. Bovendien bezweek geen enkel dier aan trypanosomiasis. Van den Bossche *et al.* (2010) beschreven dat de virulentie van verschillende *T. congolense* stammen gemeten kon worden aan de hand van de overlevingstijd van geïnfecteerde muizen (van vijf tot meer dan zestig dagen). Bovendien beschreven Masumu *et al.* (2006) dat het gemiddelde van de prepatente periode voor laag virulente stammen 3.5 ± 1.6 dagen

was (Tabel 10). De controlegroepen in onze studie hadden een gemiddelde van 8.2 dagen (de dieren die duidelijke tekens van een geïnfecteerde injectieplaats bezaten werden hierbij niet meegerekend). Als we aannemen dat de virulentie van een stam bij muizen overeenkomt met de virulentie die dezelfde stam bij runderen tentoonspreidt, zouden we kunnen vermoeden dat de geïsoleerde stammen weinig klinische problemen veroorzaakten bij het vee. Dit zou kunnen verklaard worden doordat jarenlange behandeling tegen trypanosomiasis niet enkel selectie in het voordeel van de resistente stammen zou veroorzaakt hebben (Leak, 1996), maar ook in het voordeel van de minder virulente stammen (Masumu *et al.*, 2006). Indien een dier geen symptomen vertoont, zal het immers ook minder vaak behandeld worden. Zelfs in gebieden waar de dieren niet behandeld worden, zal een natuurlijke selectie in het voordeel van de laag virulente stammen gebeuren. Dieren die snel na het moment van infectie sterven, geven tseetseevliegen immers weinig tijd om de infectie over te dragen (Masumu *et al.*, 2006). Verdere studies omtrent de virulentie van trypanosomen in dit gebied zijn weliswaar nodig voor er wetenschappelijk verantwoorde conclusies kunnen getrokken worden. In dit onderzoek werd deze hypothese niet specifiek getest. Verder onderzoek naar de virulentie van de aanwezige stammen en naar de evolutie van de virulentie in functie van het al dan niet behandelen, zou interessant kunnen zijn. Indien blijkt dat, zonder behandeling, de aanwezige *Trypanosoma*-stammen niet zullen evolueren naar stammen met een leefbaar virulentieniveau, zou het inkruisen van lokale trypanotolerante dieren, zoals het Sheko ras, voor de veehouders die met dit probleem te kampen krijgen, waarschijnlijk één van de meest realistische oplossingen op lange termijn betekenen.

Tabel 10: De verschillende parameters die onderzocht werden bij trypanosomen van verschillende virulentie categorieën (naar Masumu *et al.*, 2006).

Parameters	Virulence category		
	Extreme	Moderate	Low
Median survival time (days).	6	13	60
Average prepatent period (days).	2.3±0.3	3.2±1.6	3.5±1.6
Average decline in PCV on day 7 (in absolute values).	15.6±1.1	14.2±0.6	9.7±0.6

Het is niet duidelijk hoe het komt dat **enkele muizen genezen**, terwijl bij de andere muizen uit dezelfde kooi wel een parasitemie onder de microscoop gezien kon worden. Bovendien werd aangetoond dat alle trypanosomen in het bloed van deze muizen **resistent waren tegen DA** (Fig. 34), terwijl toch twee van de acht genezen muizen afkomstig waren uit een kooi die behandeld werd met DA. Het duurde voor de overige vier muizen in deze kooi en voor alle muizen die met deze stam geïnoculeerd waren, wel een lange tijd voor zij positief werden (Tabel 11). De muizen die na 60 dagen nog niet positief waren, werden “genezen” verklaard. Misschien was de parasitemie van de vier “negatieve” muizen na de 60 dagen nog zodanig laag dat zij met de microscoop niet detecteerbaar

was. De PCR-RFLP analyses van de DA10- en DA20groep van stam F058 toonden in ieder geval aan dat de hier aanwezige trypanosomen resistent waren tegen DA.

Tabel 11: De prepatente periodes voor de muizen van de verschillende behandelingsgroepen die geïnfecteerd waren met stam F058 uit Abelti.

Controlegroep	ISM	DA10	DA20
13	23	23	20
Dood vóór parasitemie	27	28	40
9	27	Negatief	20
20	Negatief	Negatief	13
9	Negatief	23	27
20	23	20	20

6.3. Conclusie

Het doel van deze studie was om 1) de prevalentie van *T. congolense* in de Ghibe vallei te bepalen en 2) om aan de hand van muismodellen de resistentiestatus van deze stammen te achterhalen.

We kunnen uit deze studie concluderen dat *T. congolense* in dit gebied aanwezig is met een prevalentie van 17.8% en dat resistentie van *T. congolense* tegen DA en tegen ISM een feit is dat bij alle onderzochte stammen bewezen werd a.d.h.v. muismodellen. De resistentie van deze stammen tegen DA werd nog bevestigd door PCR-RFLP analyse.

7. Referenties

- Agriwiki, 2009, Boran cattle. http://www.agriwiki.co.za/index.php?title=Boran_cattle.
- Ancelle, T., Paugam, A., Bourlioux, F., Merad, A., Vigier, J.P., 1997. Detection of trypanosomes in blood by the Quantitative Buffy Coat (QBC) technique: experimental evaluation. *Med Trop.* 57, 245-8.
- Barrett, M.P., Fairlamb, A.H., 1999. The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitol. Today* 15, 136-140.
- Barry, J.D., McCulloch, R., 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Adv. Parasitol.* 49, 1-70.
- Bekele, J., Asmarea, K., Abebe, G., Ayelet, G., Gelayec, E., 2009. Evaluation of deltamethrin applications in the control of tsetse and trypanosomiasis in the southern rift valley areas of Ethiopia. *Vet Parasitol.* 168, 177-84.
- Bengaly, Z., Sidibe, I., Ganaba, R., Desquesnes, M., Boly, H., Sawadogo, L., 2002a. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet. Parasitol.* 108, 1-19.
- Bengaly, Z., Sidibe, I., Boly, H., Sawadogo, L., Desquesnes, M., 2002b. Comparative pathogenicity of three genetically distinct *Trypanosoma congolense*-types in inbred Balb/c mice. *Vet. Parasitol.* 105, 111-118.
- Budd, L.T., 1999. DFID-funded tsetse and trypanosome research and development since 1980. Vol. 2: Economic Analysis.
- Cavalcanti, D.P., Fragoso, S.P., Goldenberg, S., de Souza, W., Motta, M.C., 2004. The effect of topoisomerase II inhibitors on the kinetoplast ultrastructure. *Parasitol Res.* 94, 439-48.
- CDC (Centers for disease control and prevention), 2010, Parasites – African Trypanosomiasis. (http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/health_professionals/index.html).
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Büscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev.* 18, 133-46.
- Clausen, P.H., Leendertz, F.H., Blankenburg, A., Tietjen, U., Mehlitz, D., Sidibe, I., Bauer, B., 1998. A drug incubation *glossina* infectivity test (DIGIT) to assess the susceptibility of *Trypanosoma congolense* bloodstream forms to trypanocidal drugs (Xenodiagnosis). *Acta tropica.* 72, 111-117.
- Clausen, P.H., Bauer, B., Zessin, K.H., Diall, O., Bocoum, Z., Sidibe, I., Affognon, H., Waibel, H., Grace, D., Randolph, R., 2010. Preventing and containing trypanocide resistance in the cotton zone of West Africa. *Transbound Emerg Dis.* 57, 28-32.
- Courtin, D., Berthier, D., Thevenon, S., Dayo, G., Garcia, A., Bucheton, B., 2008. Host genetics in African trypanosomiasis. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 229-238.
- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hilde, G., Welburn, S., 2005. A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology* 111, 24-29.
- Cox, A.P., Tosas, O., Tilley, A., Picozzi, K., Coleman, P., Hilde, G., Welburn, S.C., 2010. Constraints to estimating the prevalence of trypanosome infections in East African zebu cattle. *Parasites & vectors.* 3, 82.
- Dayo, G.K., Thevenon, S., Berthier, D., Moazami-Goudarzi, K., Denis, C., Cuny, G., Eggen, A., Gautier, M., 2009. Detection of selection signatures within candidate regions underlying trypanotolerance in outbred cattle populations. *Mol. Ecol.* 18, 1801-13.
- de Almeida, P.J., Ndao, M., Van Meirvenne, N., Geerts, S., 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Trop.* 66, 45-50.
- Delespau, V., Geerts, S., Brandt, J., Elyn, R., Eisler, M.C., 2002. Monitoring the correct use of isometamidium by farmers and veterinary assistants in Eastern Province of Zambia using the isometamidium-ELISA. *Vet. Parasitol.* 110, 117-122.
- Delespau, V., Geysen, D., Majiwa, Phelix.A.O., Geerts, S., 2005. Identification of a genetic marker for isometamidium chloride resistance in *Trypanosoma congolense*. *Int. J. Parasitol.* 35, 235-243.
- Delespau, V., Chitanga, S., Geysen, D., Goethals, A., Van den Bossche, P., Geerts, S., 2006. SSCP analysis of the P2 purine transporter TcoAT1 gene of *Trypanosoma congolense* leads to a simple PCR-RFLP test allowing the rapid identification of diminazene resistant stocks. *Acta Trop.* 100, 96-102.
- Delespau, V., de Koning, H.P., 2007. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist Updat.* 10, 30-50.
- Delespau, V., Geysen, D., Van den Bossche, P., Geerts, S., 2008. Molecular tools for the rapid detection of drug resistance in animal trypanosomes. *Trends Parasitol* 24, 236-242.
- Delespau, V., Vitouley, H.S., Marcotty, T., Speybroeck, N., Berkvens, D., Roy, K., Geerts, S., Van den Bossche, P., 2010. Chemosensitization of *Trypanosoma congolense* strains resistant to isometamidium chloride by tetracyclines and enrofloxacin. *PLoS Negl Trop Dis.* 49.
- Desquesnes, M., Dávila, A.M., 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* 109, 213-31.
- d'Ieteren, G.D., Authié, E., Wissocq, N., Murray, M., 1998. Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis. *Rev Sci Tech.* 17, 154-75.
- FAO, 1980, Trypanotolerant livestock in West & Central Afrika – Vol. 1. General study, chapter 3. <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5468E/x5468e04.htm>.

- Gari, F.R., Ashenafi, H., Tola, A., Goddeeris, B.M., Claes, F., 2010. Comparative diagnosis of parasitological, serological and molecular tests in dourine-suspected horses. *Trop Anim Health Prod.* 42, 1649-1654.
- Geerts, S., Holmes, P.H., Eisler, M.C., Diall, O., 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.* 17, 25–28.
- Geerts, S., Holmes, P.H., 1998. Drug management and parasite resistance in animal trypanosomiasis in Africa. FAO, Rome.
- Geerts, S., Holmes, P.H., Eisler, M.C., Diall, O., 1998. Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. *Trends in Parasitology* 17, 25-28.
- Geysen, D., Delespau, V., Geerts, S., 2003. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet Parasitol* 110, 171-180.
- Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A., Soller, M., Teale, A., 2002. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100, 7443-8.
- Herbert, W.J., Lumsden, W.H.R., 1976. *Trypanosoma brucei*: A rapid “matching” method for estimating the host’s parasitaemia. *Exp. Parasitol.* 40, 427-431.
- Hide, G., Tait, A., 2004. Genetic and molecular epidemiology of trypanosomes. In: I. Maudlin, P.H. Holmes and M.A. Miles, Editors, *The Trypanosomiasis*. CAB International, London 77–93.
- Holmes, P.H., Eisler, M.C., Geerts, S., 2004. Current chemotherapy of animal trypanosomiasis. In: *The Trypanosomiasis* pp. 431–444, Maudlin, I., Holmes, P.H., Miles, M.A., 2004.
- Illembade, A.A., 2009. Tsetse and trypanosomiasis in Africa: the challenges, the opportunities. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 76, 35-40.
- ILRI(a) (International Livestock Research Institute), n.d., Trypanosomiasis. <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ilrad81/Trypanosomiasis.htm>.
- ILRI(b) (International Livestock Research Institute), n.d., Host immune responses to infection. http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/Ilrad90/Trypano.htm#P62_12052.
- ILRI(c) (International Livestock Research Institute), n.d., Drug resistance in trypanosomes, http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/ILRADre1992v10n4/Howtrypa.htm#P47_6847.
- IVM (Integrated vector management), n.d., Human African Trypanosomiasis. <http://www.ivmproject.net/about/index.cfm?fuseaction=static&label=hat>
- Jamal, S., Sigague, I., Macuamule, C., Neves, L., Penzhorn, B.L., Marcotty, T., Van den Bossche, P., 2005. The susceptibility of *Trypanosoma congolense* isolated in Zambezia Province, Mozambique, to isometamidiumchloride, diminazene aceturate and homidium chloride. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72, 333–338.
- Kinabo, L.D., 1993. Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. *Acta trop* 54, 169-83.
- Kristjanson, P.M., Swallow, B.M., Rowlands, G.J., Kruska, R.L., de Leeuw, P.N., 1999. Measuring the costs of African animal trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research. *Agricultural Systems.* 59, 79–98.
- Lane, C.D., 1914. Age determination in beef cattle. In: *The Stockman’s Handbook*, 7th ed.” by Ensminger, M.E., 1992.
- Leak, 1996. A contribution to the epidemiology and understanding of tsetse-transmitted trypanosomiasis.
- Lemecha, H., Mulatu, W., Hussein, I., Rege, E., Tekle, T., Abdisho, S., Ayalew, W., 2006. Response of four indigenous cattle breeds to natural tsetse and trypanosomiasis challenge in the Ghibe valley of Ethiopia. *Veterinary Parasitology* 141, 165–176.
- Limon-Flores, A.Y., Cervera-Cetina, R., Tzec-Arjona, J.L., Ek-Macias, L., Sánchez-Burgos, G., Ramirez-Sierra, M.J., Cruz-Chan, J.V., VanWynsberghe, N.R., Dumonteil, E., 2010. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine* 28, 7414-9.
- Lin, C.M., Chen, T.Y., Wang, L.F., HUI, C.F., Hwang, J., 2001. Characterization of drug resistance to VM-26 in A2780 ovarian carcinoma cells. *Zool. Stud.* 40, 71–78.
- Machila, N.A., Fèvre, E.M., Maudlin, I., Eisler, M.C., 2008. Farmer estimation of live bodyweight of cattle: Implications for veterinary drug dosing in East Africa. *Prev. Vet. Med.* 87, 394–403.
- MacLennan, K.J., Jones-Davies, W.J., 1967. The occurrence of a berenil-resistant *Trypanosoma congolense* strain in Northern Nigeria. *Vet Rec.* 80, 389-90.
- MacLeod, A., Turner, C.M., Tait, A., 1997. Detection of single copy gene sequences from single trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 84, 267–270.
- Maina, N.W., Kunz, C., Brun, R., 2006. Cryopreservation of *T. brucei gambiense* in a commercial cryomedium developed for bull semen. *Acta Trop.* 98, 207-11.
- Mamoudou, A., Zoli, A., Tanenbe, C., Andrikaye, J.P., Bourdanne, Marcotty, T., Delespau, V., Clausen, P.H., Geerts, S., 2006. Evaluation sur le terrain et sur souris de la résistance des trypanosomes des bovins du plateau de l’Adamaoua au Cameroun à l’acéturate de diminazène et au chlorure d’isométramidium. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays.* 59, 11–16.
- Marquis, J.F., Hardy, I., Olivier, M., 2005. Topoisomerase I amino acid substitutions, Gly185Arg and Asp325Glu, confer camptothecin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1441–1446.

- Mäser, P., Lüscher, A., Kaminsky, R., 2003. Drug transport and drug resistance in African trypanosomes. *Drug Resist. Updat.* 6, 281–290.
- Masumu, J., Marcotty, T., Geysen, D., Geerts, S., Vercruyse, J., Dorny, P., Van den Bossche, P., 2006. Comparison of the virulence of *Trypanosoma congolense* strains isolated from cattle in a trypanosomiasis endemic area of eastern Zambia. *International Journal for Parasitology* 36, 497-501.
- Mattioli, R.C., Feldmann, U., Hendrickx, G., Wint, W., Jannin, J., Slingenbergh, J., 2004. Tsetse and trypanosomiasis intervention policies supporting sustainable animal-agricultural development. *Food Agr Environ* 2, 310-314.
- Meyers Lexikon, n.d., Tsetsefliegen, <http://de.winelib.com/wiki/Tsetsefliegen>.
- Mihret, A., Mamo, G., 2007. Bovine trypanosomosis in three districts of East Gojjam Zone bordering the Blue Nile River in Ethiopia. *J Infect Dev Ctries.* 1, 321-5.
- MINITÜB GmbH, 2010, Semen extenders: http://www.minitube.de/DE_eng/Products-Services/Bovine/Semen-Extenders.
- Moloo, S.K., Kutuza, S.B., 1989. Expression of resistance to isometamidium and diminazene in *Trypanosoma congolense* in Boran cattle infected by *Glossina morsitans centralis*. *Acta Trop.* 47, 79-89.
- Mulugeta, W., Wilkes, J., Mulatu, W., Majiwa, P.A.O., Masake, R., Peregrine, A.S., 1996. Long-term occurrence of *Trypanosoma congolense* resistant to diminazene, isometamidium and homidium in cattle at Ghibe, Ethiopia. *Acta tropica.* 64, 205-217.
- Negash, M., Girma, M., Seyoum, E., 2007. Epizootiological importance of *Glossina morsitans submorsitans* (Diptera: Glossinidae) (Newstead) in the Ghibe River Valley, Southwest Ethiopia. *Acta Tropica* 102, 100–105.
- Nicholson, M.J., Butterworth, M.H., 1986. A guide to condition scoring of Zebu cattle.
- NRI (Natural resources institute), n.d., Bait technologies. <http://www.nri.org/tsetse/Technol/index.html>.
- Ofcansky, T.P., Laverle, B., 1991. Livestock. <http://countrystudies.us/ethiopia/95.htm>.
- Pathogen profile dictionary, n.d., Protozoan and helminth parasites. http://www.ppdictionary.com/parasites_3.htm.
- Picozzi, K., Tilley, A., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Magona, J.W., Odiit, M., Eisler, M.C., Welburn, S.C., 2002. The diagnosis of trypanosome infections: application of novel technology for reducing disease risk. *Afr JI of Biotechnol.* 1, 39–45.
- Radwanska, M., Guirnalda, P., De Trez, C., Ryffel, B., Black, S., Magez, S., 2008. Trypanosomiasis-Induced B Cell Apoptosis Results in Loss of Protective Anti-Parasite Antibody Responses and Abolishment of Vaccine-Induced Memory Responses. *PLoS Pathog.* 30.
- Rayaisse, J.B., Tirados, I., Kaba, D., Dewhirst, S.Y., Logan, J.G., Diarrassouba, A., Salou, E., Omolo, M.O., Solano, P., Lehane, M.J., Pickett, J.A., Vale, G.A., Torr, S.J., Esterhuizen, J., 2010. Prospects for the development of odour baits to control the tsetse flies *Glossina tachinoides* and *G. palpalis* s. *PLoS Negl Trop Dis.* 16.
- Robson, J., Ashkar, T.S., 1972. Trypanosomiasis in domestic livestock in the Lambwe Valley area and a field evaluation of various diagnostic techniques. *Bull World Health Organ.* 47, 727-34.
- Rodriguez, A.E.V., Zuñiga, E., Montes, C.L., Gruppi, A., 2003. Interleukin-4 biases differentiation of B cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *Journal of Leukocyte Biology* 73, 127-136.
- Rowlands G.J., Leak, S.G.A., Peregrine, A.S., Nagda, S.M., Mulatu, W., d'leteren, G.D.M., 2001. The incidence of new and the prevalence and persistence of recurrent trypanosome infections in cattle in southwest Ethiopia exposed to a high challenge with drug-resistant parasites. *Acta tropica.* 79, 149-163.
- Rowlands, G.J., Leak, S.G.A., Mulatu, W., Nagda, S.M., Wilson, A., d'leteren, D.M., 2000. Use of deltamethrin "pour-on" insecticide for the control of cattle trypanosomosis in the presence of high tsetse invasion. *Medical and veterinary entomology.* 15, 87-96.
- Rowlands, G.J., Leak, S.G., Mulatu, W., Nagda, S.M., Wilson, A., d'leteren, G.D., 2001. Use of deltamethrin "pour-on" insecticide for the control of cattle trypanosomosis in the presence of high tsetse invasion. *Med Vet Entomol.* 15, 87-96.
- SIT Africa (Pty) Ltd, 2011, How does SIT work?, http://www.sitafrica.co.za/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=28.
- Sones, K., 2001. Pharmaceutical companies: partners or enemies ? *ICPTV Newsletter* 3, 19-21.
- S.O.S. (Stamp out Sleeping Sickness campaign), n.d., tsetse flies– the transmitters of the sleeping sickness parasites, <http://www.stampoutsleepingsickness.com/about-sos-tsetse-and-trypanosomiasis-control.aspx>
- Stein, J., Ayalew, W., Rege, J.E.O., Mulatu, W., Malmfors, B., Dessie, T., Philipsson, J., 2009. Livestock keeper perceptions of four indigenous cattle breeds in tsetse infested areas of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 41, 1335–1346.
- Steven Mihok, 1999-2009, Biting flies, <http://www.nzitrap.com/Biting/biting.htm>.
- Tadesse, A., Tsegaye, B., 2010. Bovine trypanosomosis and its vectors in two districts of Bench Maji zone, South Western Ethiopia. *Trop anim health prod.* 42, 1757-1762.
- Talaki, E., Sidibe, I., Diall, O., Grace, D., Barry, A.M., Djiteye, A., Bocoum, Z., Clausen, P.H., Randolph, T., Affognon, H., Hendrickx, G., Pangui, L.J., Belem, A.M.G., 2006. Répartition spatiale des trypanosomoses animales en relation avec la chimiorésistance dans la zone cotonnière de l'Afrique de l'Ouest (Mali et Guinée). *Rev. Afr. Sante Prod. Anim.* 4, 45–50.

- Taylor, J.E., Rudenko, G., 2006. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet.* 22, 614-620.
- Vale, G.A., Torr, S.J., 2005. User-friendly models of the costs and efficacy of tsetse control: application to sterilizing and insecticidal techniques. *Medical and Veterinary Entomology.* 19, 293-305.
- Van den Bossche, P., Rowlands, G.J., 2001. The relationship between the parasitological prevalence of *Trypanosoma* infections in cattle and herd average packed cell volume. *Acta Trop.* 78, 163-170.
- Van den Bossche, P., Akoda, K., Kubi, C., Marcotty, T., 2006. The transmissibility of *Trypanosoma congolense* seems to be associated with its level of resistance to isometamidium chloride. *Veterinary parasitology.* 135, 365-367.
- Van den Bossche, P., Chitanga, S., Masumu, J., Marcotty, T., Delespaux, V., 2010. Virulence in *Trypanosoma congolense* Savannah subgroup. A comparison between strains and transmission cycles. *Parasite Immunol.* 10, 1365-3024.
- Verloo, D., Holland, W., My, L.N., Thanh, N.G., Tam, P.T., Goddeeris, B., Vercruyse, J., Büscher, P., 2000. Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from North Vietnam. *Veterinary Parasitology.* 92, 87-96.
- Vickerman, K., 1978. Antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 273, 613 – 617.
- Wang, Z., Englund, P.T., 2001. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 4674–4683.
- Whiteside, E.F., 1963. A strain of *Trypanosoma congolense* directly resistant to berenil. *J Comp Pathol.* 73, 167-75.
- Wilkes, J.M., Mulugeta, W., Wells, C., Peregrine, A.S., 1997. Modulation of mitochondrial electrical potential: a candidate mechanism for drug resistance in African trypanosomes. *Biochem. J.* 326, 755–761.
- Yamamoto, D.S., Nagumo, H., Yoshida, S., 2010. Flying vaccinator; a transgenic mosquito delivers a *Leishmania* vaccine via blood feeding. *Insect Molecular Biology* 19, 391–398.
- Zerba, E., 1988. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitol Today.* 4, S3-7.