

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

(Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher)

der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV

(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Etablierung und Evaluierung eines molekularen Wurmdiagnostikverfahrens (Real-Time-PCR) in Tansania

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Myrna Benninghoff

aus Düsseldorf

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Sören Schubert

Priv. Doz. Dr. Dr. Heinz Rinder

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christof Geldmacher

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

**In Liebe meinen Eltern
und Großeltern gewidmet.**

Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die zu dieser Doktorarbeit beigetragen haben und in den Entstehungsprozess involviert waren. Hierzu gehört an erster Stelle mein Betreuer Dr. Christof Geldmacher, der mich während der gesamten Zeit beraten und ermuntert hat diese Arbeit fertig zu stellen. Auch bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Hölscher vom Tropeninstitut der Universität München und dem Projektleiter der Wurm-HIV-Interaktionsstudie (WHIS) Dr. Elmar Saathoff, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großer Dank gebührt außerdem den Mitarbeitern des Mbeya Medical Research Center (MMRC) in Mbeya, Wilbroad Nyembe und Rachel, die für mich die Mikroskopie der Stuhlproben durchführten, Dr. med. Petra Clowes, die die Feldarbeit und Probenbeschaffung koordinierte und dem Laborleiter Dr. Anthony Nsojo, der mir beim Einrichten der Laborräume und beim Durchführen der Real-Time-PCR geholfen hat.

Auch ohne die anderen Mitarbeiter des MMRC und des Tropeninstitutes in München, insbesondere Erna Fleischmann, Dr. Mkunde Chachage, Dr. Lilli Podola und Dr. Asli Bauer, wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Dr. Jaco J. Verweij von der Universität Leiden für die Bereitstellung seiner PCR-Protokolle und dem ugandischen MRC/UVRI für die Veranstaltung des Workshops „Molecular diagnosis of intestinal parasites“ bedanken, der uns wichtige Kenntnisse zur Durchführung unserer Arbeit vermittelte. Außerdem danke ich IDEA und der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit und Gudrun Mattern für ihre Geduld bei der abschließenden Durchsicht des Manuskripts.

Ich bin von Dank erfüllt für die grenzenlose Gastfreundschaft, die mir in Mbeya zuteilwurde und fühle mich all den teilnehmenden Probanden für ihre Zustimmung und Mitarbeit an unserem Projekt sehr verbunden.

Ich wünsche allen für zukünftige Vorhaben nur das Beste!

Asante sana.

Vielen Dank.

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung..... | 8 |
| 1.1 Helminthosen - Hintergrund dieser Untersuchung..... | 8 |
| 1.2 Untersuchungsgebiet..... | 10 |
| 1.3 Epidemiologie von Helminthosen..... | 12 |
| 1.4 Erreger, Übertragung und Pathogenese..... | 14 |
| 1.4.1 Ascaris lumbricoides..... | 14 |
| 1.4.2 Hakenwürmer..... | 16 |
| 1.4.3 Strongyloides stercoralis..... | 18 |
| 1.4.4 Schistosoma mansoni/haematobium..... | 19 |
| 1.5 Klinik von Helminthosen..... | 21 |
| 1.6 Diagnostik von Helminthosen | 23 |
| 1.6.1 Mikroskopische Verfahren..... | 26 |
| 1.6.2 Serologische Verfahren..... | 30 |
| 1.6.3 Molekulardiagnostische Verfahren..... | 30 |
| 1.6.3.1 Begriffsklärung..... | 30 |
| 1.6.3.2 Aktueller Forschungsstand..... | 33 |
| 1.7 Therapie von Helminthosen..... | 33 |
| 1.8 Prävention von Helminthosen..... | 35 |
| 1.9 Helminthosen und HIV | 37 |
| 2 Problemstellung und Zielsetzung..... | 38 |
| 3 Material und Methoden..... | 40 |
| 3.1 Material..... | 40 |
| 3.2 Methoden..... | 42 |
| 3.2.1 Untersuchungsgebiet und –population..... | 42 |
| 3.2.2 Studiendesign und Einschlusskriterien..... | 44 |
| 3.2.3 Labormethoden..... | 49 |
| 3.2.3.1 Gewinnung des Probenmaterials..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3.2 Mikroskopische Stuhluntersuchung | 49 |
| 3.2.3.3 Molekulardiagnostische Stuhluntersuchung..... | 52 |
| 3.2.4 Statistische Analysemethoden | 60 |
| 4 Ergebnisse | 62 |
| 4.1 Etablierung der Real-Time-PCR | 62 |
| 4.1.1 Optimierung..... | 62 |
| 4.1.2 Qualitätskontrolle durch externes Labor..... | 64 |
| 4.2 Evaluierung der Real-Time-PCR | 65 |
| 4.2.1 Untersuchtes Studienkollektiv | 65 |
| 4.2.2 Vergleich von Mikroskopie und Real-Time-PCR | 66 |
| 4.2.2.1 Diagnostische Sensitivität und Übereinstimmung der Verfahren | 67 |
| 4.2.2.2 Einfluss der Eizahl auf die Detektierbarkeit..... | 76 |
| 4.2.2.3 Korrelation zwischen CT-Wert und Mikroskopieergebnis..... | 77 |
| 4.3 Mehrfachinfektionen..... | 81 |
| 4.4 Behandlungserfolge..... | 83 |
| 4.5 Helminthen-HIV-Koinfektion..... | 85 |
| 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen | 87 |
| 5 Diskussion..... | 88 |
| 5.1 Diskussion der Untersuchungsmethoden und -materialien..... | 89 |
| 5.1.1 Studienpopulation..... | 89 |
| 5.1.2 Probenqualität | 90 |
| 5.1.3 Mikroskopie | 90 |
| 5.1.4 Real-Time-PCR | 92 |
| 5.2 Diskussion der Ergebnisse | 95 |
| 5.2.1 Externe Validierung | 95 |
| 5.2.2 Interne Validierung anhand eines Methodenvergleichs | 95 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.2.1 Verfahrensvergleich mit und ohne Goldstandard..... | 96 |
| 5.2.2.2 Übereinstimmung der Verfahren und einflussnehmende Faktoren..... | 97 |
| 5.2.2.3 Zusammenhang zwischen Eizahl/CT und Detektierbarkeit | 99 |
| 5.2.3 Mehrfachinfektionen | 101 |
| 5.2.4 Behandlungserfolge | 102 |
| 5.2.5 Helminthen-HIV-Koinfektion | 104 |
| 5.3 Konsequenzen der Arbeit und Ausblick | 105 |
| 6 Zusammenfassung..... | 107 |
| 7 Annex | 109 |
| 7.1 Literaturverzeichnis..... | 109 |
| 7.2 Tabellenverzeichnis | 116 |
| 7.3 Abbildungsverzeichnis | 117 |
| 7.4 Abkürzungen..... | 120 |
| 7.5 Eidesstattliche Versicherung..... | 122 |

1 Einleitung

1.1 Helminthosen - Hintergrund dieser Untersuchung

Etwa ein Viertel der Weltbevölkerung ist mit Würmern infiziert [1].

Vor allem in tropischen und subtropischen Entwicklungsländern, in denen ein feucht-warmes Klima und schlechte hygienische Bedingungen vorherrschen, sind Infektionen mit Helminthen (griech.: Würmer) häufig und folgenreich. Betroffen ist vor allem die ländliche und sozial benachteiligte, städtische Bevölkerung, die unter der Armutsgrenze lebt [1].

Der oft chronische und schleichende Krankheitsverlauf kann durch Mangelernährung und damit einhergehender mentaler und physischer Unterentwicklung in Erscheinung treten [2].

Wurmerkrankungen stellen so neben dem persönlichen Leid der Betroffenen eine große Belastung für das öffentliche Gesundheitswesen dar und haben weitreichende Auswirkungen auf die ökonomische Entwicklung endemischer Länder. Helminthosen können zu einem Teufelskreis aus Infektion, Produktivitätsminderung, Armut und inadäquater sozioökonomischer Entwicklung führen [1, 3].

Immer mehr Studien legen nahe, dass Helminthen eine tiefgreifende Wirkung auf das menschliche Immunsystem haben und so unter anderem Erkrankungen wie Malaria, Tuberkulose und HIV/AIDS beeinflussen und die Wirkung verschiedener Impfstoffe herabsetzen [4, 5].

Gleichzeitig gibt es zunehmend Hinweise auf einen protektiven Effekt der Würmer und einen therapeutischen Nutzen bei allergischen Erkrankungen wie Asthma und einigen Autoimmunerkrankungen, da die Würmer das menschliche Immunsystem supprimieren und herunterregulieren, um selbst nicht abgestoßen zu werden [6, 7].

Um derartige Zusammenhänge in Zukunft weiter zu erforschen, bedarf es einer Methode, die Wurminfizierte sicher identifiziert.

Die mikroskopische Stuhluntersuchung ist der derzeitige Goldstandard bei der Suche nach gastrointestinalen Wurminfektionen. Da die Mikroskopie jedoch

nicht ausreichend sensitiv ist, kommt es gehäuft zu Fehldiagnosen, die eine inadäquate oder verspätete Behandlung der Betroffenen zur Folge haben [8]. Eine sensitivere Diagnostik ist dringend notwendig, um die Wirksamkeit der verfügbaren Medikamente gegen Helminthen zu überprüfen und um das Aufkommen und die Verbreitung von Arzneimittelresistenzen aufzudecken [3]. Da es bisher keine Impfstoffe gibt, die eine Immunität gegenüber Würmern erzeugen, ist die derzeitige globale Strategie zur Kontrolle und Eindämmung der Helminthosen eine wiederholte, präventive, medikamentöse Behandlung von Hochrisikogruppen in Endemiegebieten [9, 10]. In Gegenden, in denen solche Kontrollprogramme durchgeführt werden, verändert sich die Intensität der Wurminfektionen. Verbleiben nach der Behandlung nur wenige Würmer im Darm, so können diese mit der klassischen Mikroskopie oft nicht mehr detektiert werden [11]. Um die wirkliche Prävalenz an Helminthosen in solchen Gebieten zu bestimmen und die Stärke einer Infektion zu ermitteln, bedarf es einer sensitiveren Diagnostik.

Eine Gruppe von Wissenschaftlern um den Mikrobiologen Dr. Jaco Verweij von der Universität Leiden in den Niederlanden entwickelte aufgrund dieser diagnostischen Missstände ein molekulares Untersuchungsverfahren, eine Multiplex-Real-Time-PCR, die der jahrzehntelang angewandten klassischen Stuhlmikroskopie in vielerlei Hinsicht überlegen sein soll [8, 12-14].

Ziel der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studie war es, dieses neue, zum Zeitpunkt unserer Untersuchung nicht an anderen Laboren validierte Verfahren, am NIMR-MMRC-Labor (National Institute for Medical Research – Mbeya Medical Research Center) in Mbeya, Tansania zu etablieren und anhand eines Methodenvergleiches zu überprüfen. Bei nachweislich besserer Sensitivität sollte es anschließend im Rahmen weiterführender Studien wie der weiter unten aufgeführten Wurm-HIV-Interaktionsstudie (WHIS) am MMRC-Labor angewandt werden.

Die Untersuchung hinsichtlich der Sensitivität des neuen Verfahrens (Anteil der echt-Wurmpositiven, die auch als wurmpositiv erkannt wurden) erfolgte anhand gesammelter Stuhlproben aus der Region Mbeya in einem direkten Vergleich mit der klassischen Stuhlmikroskopie.

Da auch nicht bekannt war, ob die neue Diagnostikmethode im Rahmen von Medikamentenwirksamkeitsstudien Vorteile bringen könnte, testeten wir im weiteren Verlauf unserer Untersuchung mit Hilfe der RT-PCR die Wirksamkeit zweier gängiger Medikamente zur Behandlung von Wurminfektionen und achteten dabei vor allem auf Besonderheiten bei HIV-positiven Probanden.

Um weiter in die Thematik dieser Arbeit einzuführen, möchte ich im Folgenden auf verschiedene Aspekte des Untersuchungsgebietes und der aktuellen Helminthenforschung eingehen, die für das Verständnis meiner Arbeit von Bedeutung sind.

1.2 Untersuchungsgebiet

Die Vereinigte Republik Tansania ist mit einer Fläche von 947.300 km² (Deutschland: 357.120 km²) das größte Land Ostafrikas.



Abbildung 1: Tansania in Ostafrika. Die offizielle Hauptstadt ist mit etwa 800.000 Einwohnern Dodoma. Das wirtschaftliche und kulturelle Zentrum Dar es Salaam hat etwa 4,5 Millionen Einwohner und liegt am Indischen Ozean. Das Untersuchungsgebiet dieser Studie, Mbeya, ist rot umrandet [15].

Die im Folgenden genannten landesspezifischen Daten zu Tansania wurden den Datenbanken der Weltbank entnommen [16].

Eine Volkszählung der tansanischen Regierung im Jahr 2011 ergab eine Einwohnerzahl von 46.218.486. Das Bevölkerungswachstum betrug im selben Jahr 3,03 % (Deutschland: -0,06%). Die Lebenserwartung liegt bei etwa 60 Jahren. Mehr als zwei Drittel der Bevölkerung lebt in ländlichen Gebieten. Fast die Hälfte der Bevölkerung ist unter 15 Jahre alt. Nur etwa 3% sind 65 Jahre oder älter.

Zwei Drittel der Tansanier leben in extremer Armut und müssen mit weniger als 1,25 US-Dollar pro Tag auskommen. Das Bruttonationaleinkommen pro Kopf pro Jahr in US-Dollar belief sich im Jahr 2011 auf nur 540 US-\$ (Deutschland: 43.980 US-\$).

34 % (2008) der Bevölkerung ist unterernährt.

Die Kindersterblichkeit vor dem 5. Geburtstag liegt bei 67,6 (2011) von 1000 Lebendgeburten (Deutschland: 4/1000) und die Müttersterblichkeit bei 460 (2010) von 1000 Müttern. (Deutschland: 7/1000 Müttern). Die HIV-AIDS-Quote (Erwachsene zwischen 15 und 49 Jahren) lag 2009 in Tansania bei 5,6%, während sie in Deutschland bei 0,1% lag.

Nur etwa die Hälfte der Bevölkerung besitzt einen angemessenen Anschluss an die Trinkwasserversorgung und nur 10% sind an eine angemessene Abwasserversorgung angeschlossen [16].

In zahlreichen Studien stellten sich mangelnde Schulbildung, Armut, ein fehlender Zugang zu sauberen Sanitäreinrichtungen und unzureichende Hygiene (kein Händewaschen nach dem Toilettengang und vor dem Essen und Barfuß gehen) als wichtige Risikofaktoren beim Erwerb intestinaler Helminthosen heraus [17, 18].

1.3 Epidemiologie von Helminthosen

Durch Flüchtlingsbewegungen, rural-urbane Migrationsströme und Ökotourismus in abgelegene Gegenden erhalten humanpathogene Würmer Einzug in immer neue Gebiete [19]. Am häufigsten kommen Infektionen mit dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides*, dem Peitschenwurm *Trichuris trichuria* und den Hakenwürmern *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* vor. Diese Gruppe wird auch als Soil-transmitted Helminths (STHs) zusammengefasst. Außerdem sind Infektionen mit den Pärchenegeln *Schistosoma mansoni* und *haematobium*, dem Zwergfadenwurm *Strongyloides stercoralis* sowie den Verursachern der Onchozerkose (Flussblindheit) und der lymphatischen Filariose (Elephantiasis) sehr häufig [20]. In Tabelle 1 sind die weltweite Krankheitslast durch Helminthosen und die Verbreitung der verschiedenen Wurmspezies dargestellt.

Tabelle 1: Weltweite Krankheitslast durch Helminthosen und deren Verbreitung

| Infektion | Erreger | Region mit höchster Prävalenz | Zahl Infizierter (Millionen) | Todesfälle im Jahr (Tausend) |
|--|--|--|------------------------------|------------------------------|
| Askariasis | <i>Ascaris lumbricoides</i> | Asien, Afrika, Lateinamerika | 807-1221 | 3-60 |
| Trichuriasis | <i>Trichuris trichuria</i> | Asien, Afrika, Lateinamerika | 604-795 | 3-10 |
| Hakenwurm-infektion | <i>Necator americanus</i> ; <i>Ancylostoma duodenale</i> | Asien, Afrika, Lateinamerika | 576-740 | 3-65 |
| Schistosomiasis | <i>S. mansoni</i> ; <i>S. haematobium</i> | Subsaharisches Afrika, Lateinamerika | 207 | 15-280 |
| Strongyloidiasis | <i>Strongyloides stercoralis</i> | Tropen, Subtropen | 30-100 | |
| Onchozerkose (Flussblindheit) | <i>Onchozerka volvulus</i> | Subsaharisches Afrika | 37 | 0,05 |
| Lymphatische Filariose (Elephantiasis) | <i>Wucheria bancrofti</i> ; <i>Brugia malayi</i> | Indien, Südostasien, Subsaharisches Afrika | 120 | 0,4 |

Modifiziert aus den Quellen:[1, 20-22]

Die Ausprägung der Erkrankung ist von der Infektionsschwere und dem Immunstatus des Einzelnen abhängig [23] .

Wurminfektionen werden häufig unterschätzt, da sich klassische pathologische Veränderungen oft erst verspätet zeigen.

Die meisten Infektionen persistieren lange und zeigen wenig klinische Symptome, mindern aber Lebensqualität und Produktivität der Betroffenen, auch wenn der Verlauf nur selten zum Tode führt [19, 24]. Während Erwachsene häufiger an leichten Infektionen leiden, kommen bei Kindern gehäuft schwere Infektionen mit hohem Wurmbefall vor [25].

Folgen wie Anämien, Wachstumsverzögerungen, eine geringere körperliche Belastbarkeit und Gedächtniseinschränkungen können schlechtere Schulleistungen und ein Verbleiben in Armut bedingen [21].

Bei Schwangeren kann eine Wurminfektion zu Frühgeburten, einem geringeren Geburtsgewicht des Feten und zu erhöhter mütterlicher Morbidität und Mortalität führen [26].

Wurminfektionen in Entwicklungsländern sind eine der bedeutendsten Ursachen dafür, dass arme Menschen in einer Abwärtsspirale verbleiben [27].

Koinfektionen mit HIV/AIDS, Malaria und Tuberkulose sind häufig [28].

Oftmals liegt ein Polyparasitismus vor, bei dem der Betroffene zu einem bestimmten Zeitpunkt mit mehr als nur einer Wurmspezies infiziert ist [29, 30].

In Studien stellte sich heraus, dass Personen mit multiplen Infektionen häufig schwerere Infektionen hatten [31] als Personen, die nur von einer Wurmart befallen waren. Durch einen synergistischen Effekt kann es zu einer vermehrten Schwächung des Immunsystems kommen und eine Anämie kann verstärkt werden [32].

Trotz der Vielzahl an Betroffenen, zählen Wurmerkrankungen noch immer zu den vernachlässigten Erkrankungen, den sogenannten Neglected Tropical Diseases (NTDs). Dies hat zur Folge, dass viele Teilaspekte der Helminthosen bisher nur wenig erforscht sind und noch immer viel zu wenig finanzielle Mittel zur Bekämpfung und Prävention bereitgestellt werden. Weniger als 1% der weltweiten Forschungsgelder fließen in die Helminthenforschung und es gibt derzeit nur sechs Medikamente auf dem Markt, um die häufigsten Erreger in Entwicklungsländern zu bekämpfen [2].

Die NTDs stehen im Kontrast zu den drei großen Erkrankungen AIDS, Malaria und Tuberkulose, denen eine größere Aufmerksamkeit und mehr Forschungsgelder gewidmet werden, da sie auch in Industrieländern vorkommen, in denen es kaufkräftige Kunden gibt, die teure Forschungs- und Entwicklungskosten bezahlen können [24, 33].

1.4 Erreger: Übertragung und Pathogenese

Im Folgenden sind einige Grundlagen zu den Organismen aufgeführt, die mit dem von uns neu etablierten Verfahren, der Multiplex-Real-Time-PCR, detektiert wurden (Tabelle 2). Die Entwicklungszyklen der Askariden, Hakenwürmer und Schistosomen sind in den Abbildungen 2, 3 und 4 dargestellt. Symptome und klinische Manifestationen der verschiedenen Helmintheninfektionen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Allgemeine Informationen zu den von uns gesuchten Helminthen

| | Ascaris lumbricoides | Hakenwürmer | Strongyloides stercoralis | Schistosomen |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Infektionsweg | Fäkal-oral | Perkutan | Perkutan | Perkutan |
| Vorkommen im Menschen | V.a. Dünndarm | V.a. Dünndarm | V.a. Dünndarm | Kolon, GI-Venen |
| Lungenpassage | ja | ja | ja | nein |
| Derzeitiger diagnostischer Goldstandard | Mikroskopie (Eier im Stuhl) | Mikroskopie (Eier im Stuhl) | Mikroskopie (Larven im Stuhl) | Mikroskopie (Eier im Stuhl) |
| Zwischenwirt | nein | nein | nein | ja |

1.4.1 Ascaris lumbricoides

Mit dem Spulwurm sind weltweit etwa 1,2 Milliarden Menschen infiziert, also mehr als 17% der Weltbevölkerung [21]. Betroffen sind vor allem Kinder im schulfähigen Alter. Jährlich sterben schätzungsweise 60.000 Menschen an der Infektion, weitaus mehr leiden an den Komplikationen [34]. Die im

menschlichen Dünndarm lebenden ausgewachsenen weiblichen Würmer können eine beträchtliche Größe von 20-25 cm x 3-6 mm, die männlichen eine Größe von 15-31 cm x 2-4 mm erreichen [35].

Die Infektion mit Spulwürmern (Askariasis) erfolgt über die orale Aufnahme larvenhaltiger Eier. Diese befinden sich in der Erde, im Wasser oder auf Lebensmitteln, die mit infizierten Fäkalien kontaminiert sind. Die Erkrankung kommt weltweit, vor allem jedoch in den Tropen und Subtropen vor, da die Spulwürmer nur in warmfeuchter Erde optimal heranreifen können. Eine hohe Prävalenz liegt in Gegenden mit schlechter Abwasserversorgung, mangelnder Hygiene und an Orten vor, an denen menschlicher Stuhl als Düngemittel verwendet wird [30] .

Der Entwicklungszyklus des Spulwurms ist in Abbildung 2 dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert. Das ausgewachsene Spulwurmweibchen legt im menschlichen Dünndarm täglich bis zu 200.000 unreife, befruchtete Eier, die mit dem Stuhl ausgeschieden werden [36]. Sie sind nicht infektiös. In feuchter Erde wächst bei optimalen 25 Grad Celsius in ihnen in etwa drei Wochen ein Embryo heran. Nach dem unabsichtlichen Verschlucken der Eier schlüpfen im Dünndarm infektiöse Larven, die die Darmwand durchdringen und so in den Blutkreislauf gelangen. Über die Blutbahn erreichen sie die Lunge, wo sie die Lungenbläschen durchbrechen, da sie die feinen Lungenkapillaren nicht mehr passieren können. Nachdem sie über die Trachea in den Larynx aufgehustet und dann über den Ösophagus und den Magen wieder in den Darm verschluckt werden, sind sie zu erwachsenen Würmern herangereift. Selten dringen auf dieser Wanderung Larven in die Augen oder das Gehirn ein, wo sie zu schweren Gewebsschäden führen können.

Die Präpatenz, der Zeitraum zwischen Infektion und nachweisbarer Eiausscheidung im menschlichen Stuhl, beträgt etwa 60-70 Tage. Die Lebensdauer erwachsener Spulwürmer beträgt 1-1,5 Jahre [35] .

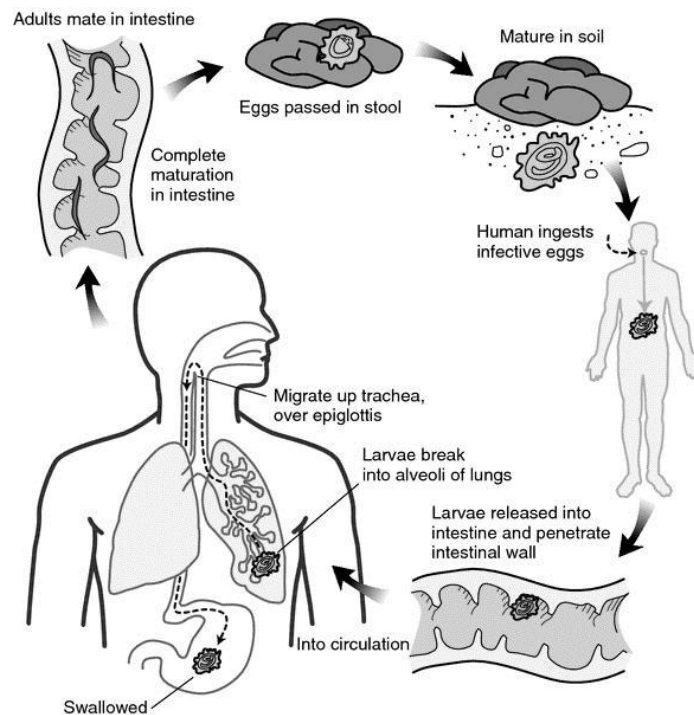


Abbildung 2: Lebenszyklus des Spulwurms *Ascaris lumbricoides* [37]

1.4.2 Hakenwürmer

Mit den Hakenwürmern *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* sind weltweit etwa 740 Millionen Menschen infiziert [21]. Die ausgewachsenen Würmer haften mit ihrem Zahnapparat an den Wänden des Dünndarms und ernähren sich vom menschlichen Blut und Proteinen. Häufig kommt es hierdurch zu Eisenmangelanämien und Mangelernährung. Während stark ausgeprägte Askaritiden vor allem bei Kindern im schulfähigen Alter auftreten, kommen schwere Hakenwurminfektionen auch im Erwachsenenalter vor.

Hakenwürmer sind in allen tropischen und subtropischen Ländern endemisch. Während *Ancylostoma duodenale* in Südeuropa, Nordafrika und dem Mittleren Osten vorherrschend ist, findet man *Necator americanus* vorwiegend in Subsaharischer Afrika, Südasien, Ozeanien, im Süden der USA und in Zentral- und Südamerika [38].

A. duodenale-Männchen sind 0,8-1,1 cm x 0,5 cm und Weibchen 1-1,3 cm x 0,6 cm groß. *N. americanus* ist mit 0,9-1,1 cm x 0,5 cm etwas schmaler und kürzer. *N. americanus* lebt durchschnittlich drei bis zehn Jahre. Die Weibchen legen etwa 10.000 Eier am Tag. *Ancylostoma duodenale* überlebt nur etwa ein bis

drei Jahre, die Weibchen legen ca. 30.000 Eier am Tag. Die Präpatenzzeit beträgt etwa 42 Tage.

Der Entwicklungszyklus der Hakenwürmer ist in Abbildung 3 dargestellt und wird im Folgenden erläutert. Der Mensch infiziert sich hauptsächlich beim Barfußgehen auf abwasserbelasteten Böden, indem infektiöse, etwa 0,6 mm kleine Hakenwurmlarven die menschliche Haut penetrieren. Über das Gefäßsystem erreichen sie am dritten Tag die Lungen und nehmen fortan den gleichen Weg wie *Ascaris lumbricoides* (siehe oben). Eine Infektion mit *Ancylostoma duodenale* ist auch über die Nahrungsaufnahme ohne Körperwanderung möglich [38]. Selten wird *A. duodenale* sogar über die Muttermilch übertragen [29].

Der Blutverlust wird bei einer Infektion mit Hakenwürmern auf bis zu 30 Mikroliter pro Wurm am Tag geschätzt. In Eisenmangelgebieten reicht eine Infektion mit 40-160 Würmern aus, um eine Anämie hervorzurufen [39].

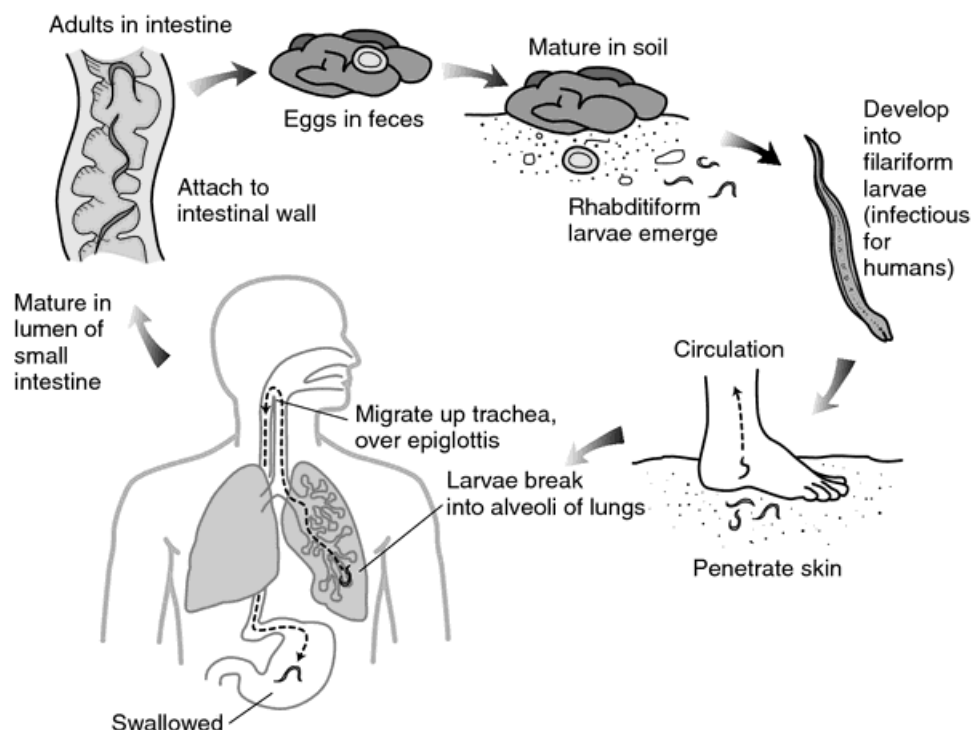


Abbildung 3: Lebenszyklus der Hakenwürmer *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* [37]

1.4.3 Strongyloides stercoralis

Geschätzte 30-100 Millionen Menschen sind weltweit mit Strongyloides stercoralis infiziert. Genaue Daten aus den Endemiegebieten liegen nicht vor, da viele der Infektionen symptomlos verlaufen und ausreichend sensitive Methoden zur Diagnostik fehlen [40].

Infektionen häufen sich in tropischen und subtropischen Gegenden, kommen aber auch in gemäßigten Klimazonen vor [41].

Zur Infektion kommt es wie bei den Hakenwürmern über einen direkten Hautkontakt mit infektiösen Larven in der Erde und einer anschließenden Wanderung dieser durch den Körper bis ins Intestinum. Dort reifen sie zu ausgewachsenen, eierlegenden Würmern heran. Aus diesen schlüpfen noch im Darmlumen Larven, die über den Stuhl ausgeschieden werden. Die Präpatenzzeit beträgt etwa einen Monat [29].

Eine Besonderheit ist die Autoinfektion. Nicht alle Larven werden ausgeschieden, sondern invadieren die Darmwand oder die Haut der Perianalregion, sodass sich der Erreger im Körper anhäuft und die Infektion bestehen bleibt. Infektionen können so ein Leben lang andauern, ohne dass es zu einem erneuten äußeren Kontakt mit dem Erreger kommt [42].

Derzeit gibt es auf globaler Ebene keine etablierten Programme, um die Strongyloidiasis zu kontrollieren und einzudämmen [40, 43].

1.4.4 *Schistosoma mansoni*/*haematobium*

Die Schistosomiasis, nach ihrem Entdecker Theodor Bilharz auch Bilharziose genannt, ist eine chronische Erkrankung, die durch Pärchenegel, die der Klasse der Saugwürmer angehören, hervorgerufen wird. Sie kommt vor allem in armen tropischen und subtropischen Gegenden vor, in denen sauberes Trinkwasser und adäquate Sanitäreinrichtungen fehlen. Weltweit sind etwa 240 Millionen Menschen infiziert, von denen laut WHO geschätzte 90% in Afrika leben [44].

Schistosoma mansoni ist der wichtigste humanpathogene Erreger einer intestinalen Bilharziose und überall dort vertreten, wo die Posthornschncke als Zwischenwirt in stehenden und langsam fließenden Gewässern vorkommt. Eine weitere wichtige humanpathogene Art ist *Schistosoma haematobium*, die urogenitale Bilharziosen verursacht. Aus Schistosomeneiern geschlüpfte Wimpernlarven (Miracidien) dringen im Wasser in einen Zwischenwirt (i.d.R. die Posthornschncke *Biomphalaria pfeifferi*) ein. Diese setzt nach einigen Zwischenentwicklungsstufen ca. 1 mm lange Gabelschwanzzercarien frei, die frei im Gewässer zirkulieren. Finden sie einen geeigneten Endwirt wie den Menschen, penetrieren sie die Haut und gelangen in die Blutbahn. Hier wird der Gabelschwanz abgeworfen und die Larve entwickelt sich in der Lunge zum etwa 1 cm langen Schistosomulum weiter.

Später kommt es in der Pfortader zur Paarung, bei der das Weibchen in die Bauchfalte des Männchens aufgenommen wird. Die Pärchenegel bleiben ein Leben lang miteinander verbunden, was ihnen ihren Namen einbrachte. Schistosomen parasitieren je nach Art vorrangig im Mesenterialvenensystem (*S. mansoni*) oder in den Harnblasenvenen (*S. haematobium*). Die dort freigesetzten Eier führen in den Venen zu lokalen Entzündungsreaktionen. Durch die daraus resultierende gesteigerte Gefäßwandpermeabilität gelangen etwa 50% der Eier in den Darm oder die Harnblase, wo sie mit den Exkrementen den Körper verlassen, um den parasitären Lebenszyklus aufrechtzuerhalten (Abbildung 4).

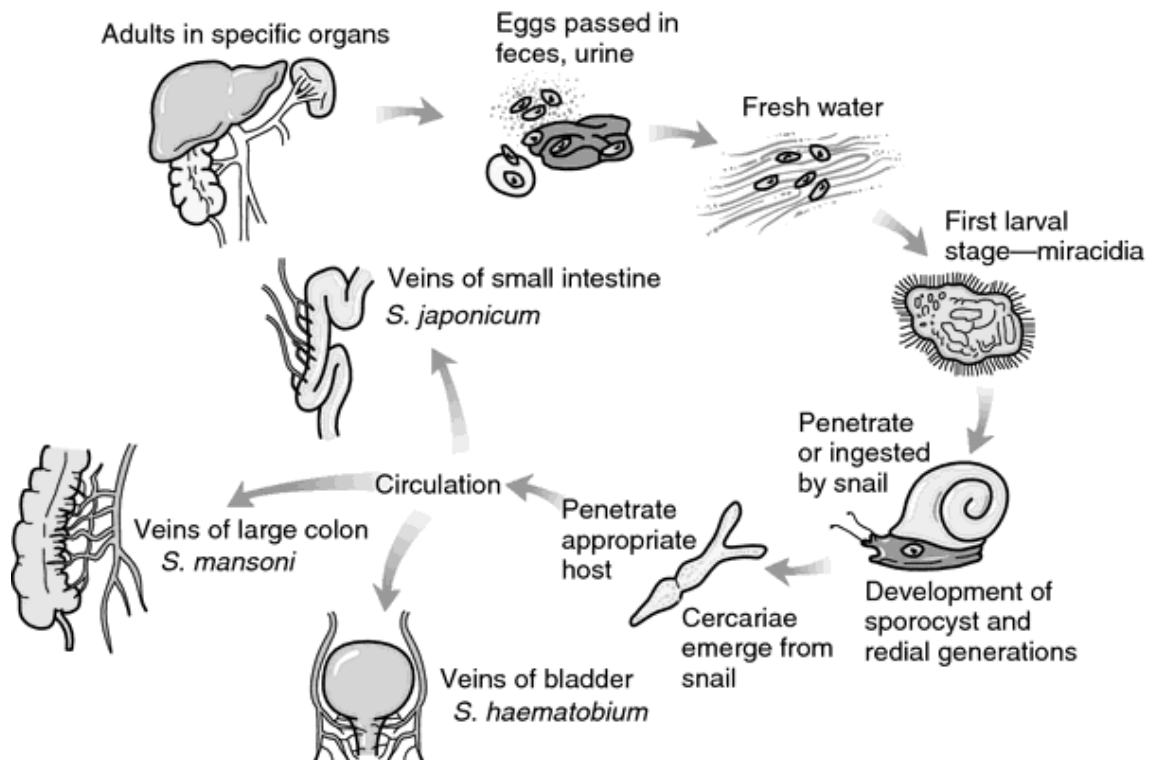


Abbildung 4: Lebenszyklus der Pärchenegel *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma haematobium* [37]

Die andere Hälfte der Eier gelangt über den Blutstrom in andere Körperorgane wie Niere, Darm, Leber und Gehirn, wo sie eine Immunreaktion des Körpers induzieren und durch Granulombildung zu progressiven Organschäden führen. Die Präpatenzzeit von *S. mansoni* beträgt etwa 7-8 Wochen, die von *S. haematobium* 10-12 Wochen. Während *S. haematobium* täglich etwa 20-200 Eier mit endständigem Stachel ausscheidet, sezerniert *S. mansoni* etwa 100-300 Eier, die einen Stachel an der Seite tragen, der unterm Mikroskop die Unterscheidung der beiden Arten erlaubt [45].

1.5 Klinik von Helminthosen

Tabelle 3: Symptome und klinische Manifestation verschiedener Helmintheninfektionen

| Parasit | Symptome |
|---|---|
| Ascaris lumbricoides | <p><u>Leichte Infektion:</u> Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Schwächegefühl, Bauchschmerzen</p> <p><u>Schwere Infektion:</u> Koliken, massige Wurmansammlungen mit Gefahr des Darmverschlusses und der Perforation</p> <p><u>Umherwandernde Askariden:</u> Darmentzündung, Appendizitis, Gallenwegsverschlüsse, Leberabszesse, Pankreasinsuffizienz, Ulcera und Perforationen (Magen, Duodenum, Ösophagus, Genitaltrakt)</p> <p><u>Migration der Larven durch die Lunge:</u> Löffler Syndrom: Fieber, Husten, Auswurf, Asthma, Hautausschlag, Eosinophilie, radiologisch sichtbare pulmonare Infiltration [35]</p> |
| Necator americanus und Ancylostoma duodenale | <p><u>Hauteintrittsstelle:</u> Juckreiz, Rötung und Bläschenbildung</p> <p><u>Migration der Larven durch die Lunge:</u> Wakana Erkrankung: Dyspnoe, trockener Husten, Nausea, Emesis, ausgeprägte Eosinophilie [46]</p> <p><u>Etablierte Infektion:</u> Eisenmangelanämie, gastrointestinale Beschwerden, Hypoproteinämie mit Ödemen, Unterernährung [47], Geschmacksverirrungen (Geophagie-Verlangen Erde zu essen) [48]</p> <p><u>Bei Kindern:</u> Verzögerung der körperlichen und geistigen Entwicklung (Abnahme der Schulbesuche und -leistungen) [1]</p> <p><u>Bei Schwangeren:</u> Anämie kann zu niedrigerem Geburtsgewicht, verminderter Milchproduktion, erhöhter Mutter-Kind-Sterblichkeit führen [26]</p> |

| Parasit | Symptome |
|--|---|
| Strongyloides stercoralis | <p><u>Hauteintrittsstelle:</u> petechiale Einblutung, Ödem, juckender Hautausschlag (Larva currens), oder Urtikaria</p> <p><u>Migration der Larven durch die Lunge:</u> Husten, Dyspnoe, Bronchopneumonie</p> <p><u>Etablierte Infektion:</u> abdominelle Beschwerden, Diarrhö und Gewichtsverlust, Bildung von Abszessen und Gewebnekrosen in Leber, Lungen, Nieren und Gallenblase bei Darmwandperforation</p> <p><u>Immunsupprimierte:</u> Hyperinfektionen mit hoher Wurmlast: starke abdominelle Schmerzen, sprueähnliche Durchfälle, paralytischer Ileus, Fieber, Hypertension, Eiweißverlustenteropathie, generalisierte Ödeme, neurologische Auffälligkeiten; septischer Schock oder Ateminsuffizienz bei Wurmbefall der Lunge [49]</p> |
| Schistosoma mansoni und Schistosoma haematobium | <p><u>Hauteintrittsstelle:</u> Zerkariendermatitis mit Pruritus</p> <p><u>Katayamasyndrom:</u> in einigen Fällen Immunkomplexbildung durch die im Körper heranreifenden Schistosomen 14-84 Tage nach Primärinfektion: nächtliches Fieber, Myalgien, Husten und abdominelle Schmerzen; ZNS Beteiligung möglich [50].</p> <p><u>Leichte Infektion:</u> subklinisch bis symptomlos</p> <p><u>Darmbilharziose:</u> rezidivierende abdominellen Beschwerden, Diarrhö, okkultes Blut im Stuhl, ulzerös hämorrhagische Kolitis, Polyposis; Spätstadium: Hepatosplenomegalie, portaler Hypertonie, Kolonkarzinom (chronische Schistosomeninfektion Präkanzerose) [51]</p> <p><u>Urogenitale Bilharziose:</u> Hämaturie, Hämospermie, Dysurie, Zystitis, Urethritis, Salpingitis, Prostatitis, Epididymitis, Papillome und polypoide Veränderungen von Blase, Vulva, Vagina oder Zervix, Sterilität, Ureterstenose, Hydronephrose, Plattenepithelkarzinom der Harnblase; gesteigertes Risiko einer HIV-Infektion [52]</p> <p><u>Komplikationen:</u> Lungenfibrose, Cor pulmonale, Meningoenzephalitis, Radikulitis</p> |

1.6 Diagnostik von Helminthosen

Eine Übersichtsarbeit von Moran et al. von 2009 zeigte, dass nur etwa 1,8% der globalen Ausgaben im Bereich der Helminthenforschung für die Erforschung und Entwicklung (Research&Development Funding) diagnostischer Tests verwendet werden [53].

Die bisher verfügbaren Diagnostikmethoden (Tabelle 4) können eingeteilt werden in:

- 1) Parasitologische Tests, bei denen der Erreger mit Hilfe des Mikroskops in Körperflüssigkeiten oder Geweben dargestellt wird
- 2) Serologische Untersuchungen, bei denen parasitenspezifische Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden
- 3) Antigendetektionstests, bei denen parasitäre Biomarker detektiert werden
- 4) Molekulardiagnostische Verfahren, die parasitäre Nukleinsäuren nachweisen
- 5) Andere sehr spezifische Verfahren, die Parasiten in Schnecken oder anderen Zwischenwirten nachweisen

Die verschiedenen Methoden kommen in den unterschiedlichen Stadien einer Wurmerkrankung (Tabelle 5) und je nach Verfügbarkeit und finanziellen Möglichkeiten zum Einsatz.

Tabelle 4: Zur Verfügung stehende Diagnostikverfahren

| Diagnostisches Verfahren und Ziel | Soil-Transmitted Helminths | Strongyloides stercoralis | S. mansoni und S. haematobium |
|--|--|---|--|
| Mikroskopie | Methode der Wahl | Nicht optimal | Methode der Wahl |
| Koprokultur | Harada Modi zur Differenzierung der Hakenwurmspezies | Methode der Wahl | Keine |
| Antikörpersuchtest | Keine | Möglich | Möglich |
| PCR und Antigensuchtest | In Erprobung | In Erprobung | Möglich |
| Bestimmung der Infektionsstärke | Quantitative Eizählung im Stuhl; PCR in Erprobung | PCR in Erprobung | Quantitative Eizählung im Stuhl bzw. Urin; PCR in Erprobung |
| Bestimmung der Medikamenten-wirksamkeit | Reduktion der Eizahl im Stuhl | Negative Koprokultur; Abnahme des Ak-Titers | Reduktion der Eizahl im Stuhl bzw. Urin, Abnahme des Ak-Titers |

Modifiziert nach McCarthy et al. [54]

Tabelle 5: *Bisherige Diagnostikverfahren für die verschiedenen Stadien einer Wurmerkrankung*

| Infektion | Frühstadium | Fortgeschritten | Spätstadium | Ref. |
|------------------------------------|--|---|---|------|
| STHs | Semiquantitative Eizählung mit validierten Methoden wie Kato-Katz oder MIF | Eikonzentrations-techniken wie FLOTAC [55] | Hochsensitive Verfahren notwendig | [56] |
| Intestinale Schistosomiasis | Siehe oben | Notwendigkeit einer Validierung PCR-basierter Verfahren in Niedrigendemiegebieten | Eliminierung des Reservoirs (Schnecken) | [57] |
| Strongyloides stercoralis | Anfärben der Larven im Stuhl mit Lugolscher Lösung | Filtermethoden wie Baermann- oder Agarplatten-Methode | Hochsensitive Verfahren notwendig | [58] |

Modifiziert nach McCarthy et al. [54]

1.6.1 Mikroskopische Verfahren

Der derzeitige WHO-Goldstandard zur Detektion von STH- und Schistosomeneiern im Stuhl ist das Kato-Katz-Verfahren [23, 59]. Mikroskopische Verfahren sind in der Regel ausreichend empfindlich, sofern geeignete Methoden angewandt werden. Das Hinzufügen eines Konzentrationsschrittes, wie bei der Kato-Katz- oder der Merthiolat-Jod-Formalin-Methode, verbessert die Sensitivität, allerdings auf Kosten der Aussagekraft über die Infektionsstärke. Vor allem die Verarbeitung von Hakenwürmern und *Strongyloides stercoralis* ist anspruchsvoll. Kommt es zu Verzögerungen bei der Prozessierung von Stuhlproben, z.B. wenn die Proben erst nach mehr als drei Stunden gekühlt bzw. anders präserviert werden oder die Weiterverarbeitung im Labor nach Entnahme aus der Kühlung mehr als eine Stunde in Anspruch nimmt, vermindert sich die Eizahl um etwa 50%. Außerdem können Hakenwurmeier lysieren, wenn Kato-Katz-Objektträger nicht innerhalb von 30 Minuten mikroskopisch untersucht werden [60].

Für eine relativ sensitive Detektion von *Strongyloides stercoralis* Larven (Abbildung 5) sind die Kultivierung der Stuhlprobe auf Koga-Agarplatten und die mikroskopische Untersuchung mehrerer Stuhlproben notwendig [61].



Abbildung 5: *Filariforme (L3) Larve von Strongyloides stercoralis* [62].

Mit dem KK-Verfahren lassen sich die Hakenwürmer *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* nicht voneinander unterscheiden (Abbildung 6). Um sie dennoch differenzieren zu können, ist eine Koprokultur nach der Harada Modi-Technik zu erstellen. Die Würmer sind dann anhand der unterschiedlichen

Mundwerkzeuge der Larven voneinander zu unterscheiden [35]. Die Unterscheidung ist von Relevanz, da *A. duodenale* zu einem bis zu fünfmal größeren Blutverlust und somit zu einer ausgeprägteren Eisenmangelanämie als *N. americanus* führen kann [63]. Außerdem sind unterschiedliche Medikamente gegen die beiden Spezies wirksamer. Während gegen *A. duodenale* Bephenium am wirksamsten scheint, ist es Tetrachlorethylen bei *N. americanus* [64].

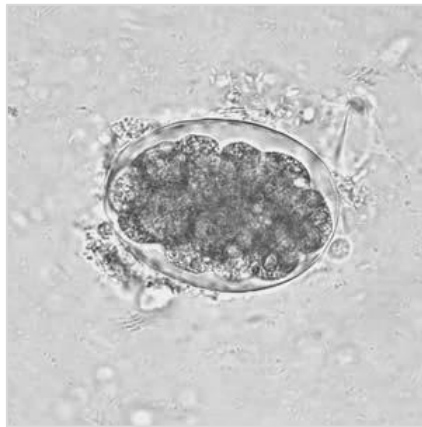


Abbildung 6: *Hakenwurmei bei 400-facher Vergrößerung. Die Eier der Hakenwürmer *N. americanus* und *A. duodenale* können mikroskopisch nicht unterschieden werden [65].*

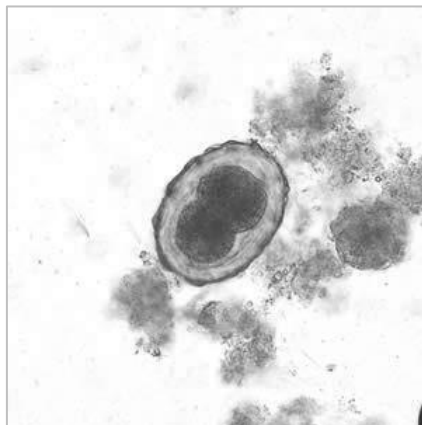


Abbildung 7: *Befruchtetes Ei von *A. lumbricoides* in einem ungefärbten Stuhlpräparat bei 200-facher Vergrößerung [66].*

Intestinale Infektionen mit *Schistosoma mansoni* und *japonicum* werden wie die STHs meist mit der KK-Methode im Stuhl nachgewiesen. Die bei der Methode gewonnenen Eizahlen können zur semiquantitativen Bestimmung der Infektionsstärke herangezogen werden [35].

Die Berechnung der Eizahl pro Gramm Stuhl geht davon aus, dass die Dichte des Stuhls gleich 1 ist, wonach Proben ein bestimmtes Volumen anstelle eines bestimmten Gewichts haben. Variationen in der Stuhlkonsistenz beeinflussen daher die Ergebnisse. Bei einer trockenen Stuhlprobe kann die Eizahl sieben Mal so hoch sein wie bei einer feuchten Probe derselben Person [67]. Sehr wässrige, sowie zu dunkle Stühle können nicht untersucht werden und auch trockene, faserige Stühle führen zu Problemen [68]. Im heißen, trockenen Klima der Endemiegebiete trocknen Proben oft ein und sind dann schwieriger zu beurteilen [69].



Abbildung 8: *S. mansoni* Ei in einer ungefärbten Stuhlmikroskopie. Mit einem prominenten lateralen Stachel [70].

Infektionen mit *Schistosoma haematobium* werden mit Hilfe der Urinfiltration untersucht. Die Gewinnung des Urins sollte idealerweise nach körperlicher Betätigung und zwischen 10 Uhr und 14 Uhr erfolgen, da die Eiexkretion einem zirkadianem Rhythmus unterliegt. Für die Detektion von *Schistosoma haematobium* hat sich auch die Suche nach Zeichen einer Mikro- bzw. Makrohämaturie als sinnvoll bewiesen. Hierzu können Urinuntersuchungen mit Hilfe eines Urinteststreifens oder auch die Anamneseerhebung Aufschluss geben [68].



Abbildung 9: *S. haematobium* Ei in einer mikroskopierte Urinprobe mit einem charakteristischen terminalen Stachel [71].

Wird nur ein Objektträger aus einer einzigen Stuhlprobe angefertigt, nimmt die Sensitivität drastisch ab; vor allem bei leichten Infektionen. Dies kann zu falsch niedrigen Prävalenzzahlen in Endemiegebieten führen. Um die Sensitivität von Urinfiltration und Kato-Katz zu steigern, müssen idealerweise mehrere Proben eines Probanden untersucht werden, was jedoch höhere Kosten und eine geringere Compliance auf Probandenseite nach sich ziehen könnte [72, 73].

Nachteile des KK-Verfahrens sind, dass sich Mitarbeiter beim Bearbeiten der Stuhlproben infizieren können und es leicht zu Kontaminationen der Stuhlproben untereinander kommt. Außerdem ist es nicht besonders geeignet, um Zysten, Larven, Trematoden (Saugwürmer) oder dünnwandige Eier wie die der Hakenwürmer zu untersuchen, da diese schnell lysieren, falls die Probe nicht sofort untersucht wird [60, 74]. Die Bestimmung der Infektionsstärke ist nur semiquantitativ möglich. Bei abnehmender Infektionsstärke, also geringeren EPG (eggs per gram stool), ist die Sensitivität der KK-Methode nicht mehr ausreichend [75]. Vorteile der KK-Methode sind die leichte Erlernbarkeit, die geringen Kosten und die gute Durchführbarkeit mit wenigen Mitteln auch unter Feldbedingungen [76].

1.6.2 Serologische Verfahren

Antikörper-Tests

Für die Strongyloidiasis sind sowohl Antikörper-ELISA-Diagnostiktests für Larvenantigene als auch für rekombinante Proteine vorhanden [77].

Zur Detektion von Schistosomen kann mit Hilfe eines ELISA-Tests lösliches Ei-Antigen (Soluble egg antigen) nachgewiesen werden. Dieses Verfahren unterscheidet jedoch nicht zwischen einer akuten und einer durchgemachten Infektion, da die Antikörper noch lange nach der Heilung im Blut zirkulieren. Eine Bestimmung der Infektionsstärke ist nicht möglich [78].

Antigen-Detektion

Schistosomenantigene sind im Serum und im Urin des Patienten zu finden. Aufgrund ihres Wanderungsverhaltens in der Immunelektrophorese werden sie als CAA (circulating anodic antigens) und CCA (circulating cathodic antigens) bezeichnet [79]. Der ELISA-Test scheint spezifischer und sensitiver als die Eizählung zu sein, brachte jedoch in Feldstudien nur für intestinale Schistosomeninfektionen verlässliche Ergebnisse. Zurzeit sind die Kosten für dieses Verfahren noch mehr als US\$ 2 pro Test [80].

1.6.3 Molekulare Diagnostik

1.6.3.1 Begriffsklärung

PCR und Real-Time-PCR

1993 erhielt der US-amerikanische Biochemiker Kary Banks Mullis den Chemie-Nobelpreis für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die er bereits im Jahr 1983 entwickelte [81]. Das Verfahren ist heutzutage unentbehrlich und gewinnt weiterhin zunehmend an Bedeutung bei der Detektion diverser Infektions- und Erbkrankheiten, beim Generieren und Prüfen genetischer Fingerabdrücke und der Klonierung von DNA.

Die PCR basiert auf der sich in Zyklen wiederholenden künstlichen Verdoppelung und damit exponentiellen Vervielfältigung eines Teilabschnittes der Erbsubstanz DNA (Desoxyribonukleinsäuren) mit Hilfe von thermostabilen Enzymen, den DNA-Polymerasen [82, 83].

Für einen PCR-Lauf werden benötigt:

- DNA, die den gewünschten zu vervielfältigenden Teilabschnitt enthält
- Zwei Oligonukleotid-Primer (Forward und Reverse), die sich an die DNA anlegen, den zu vervielfältigenden Teilabschnitt seitlich begrenzen und den Startpunkt der Elongation festlegen
- Thermostabile DNA-Polymerase, sowie Mg^{2+} -Ionen und Pufferlösungen für deren Funktion
- Vier verschiedene Desoxyribonucleosidtriphosphate (Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang)

Der Reaktionsablauf findet in einem Thermocyclergerät statt, das die einzelnen Reagenzien während der einzelnen Teilschritte (Denaturierung: Trennung der DNA-Stränge in Einzelstränge; Primerhybridisierung: Anlagerung der Primer an die DNA und Elongation: DNA-Polymerasen synthetisieren die komplementären Stränge) richtig temperiert [84] (Abbildung 10).

Polymerasekettenreaktion - PCR

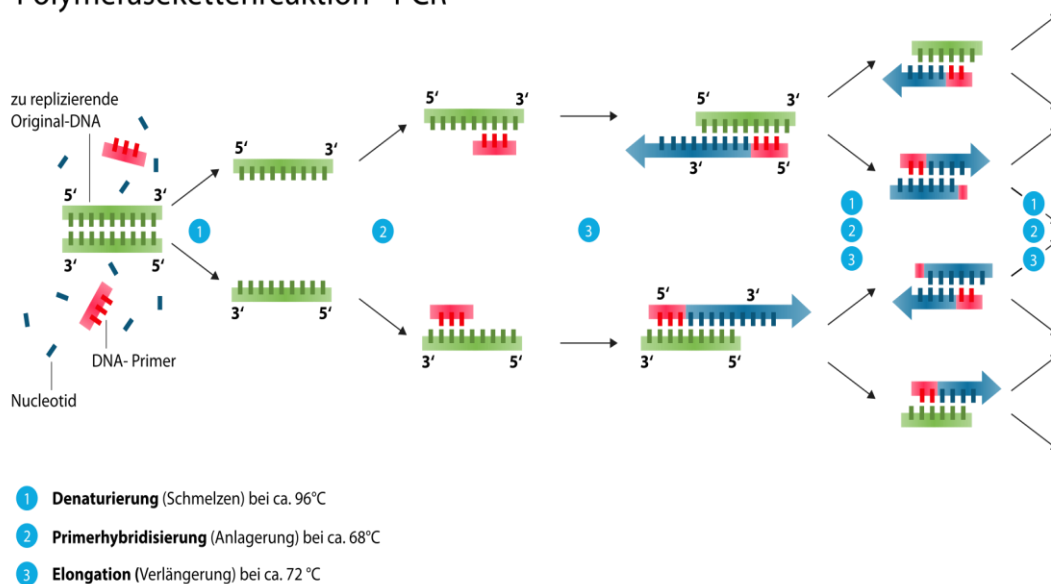


Abbildung 10: Bildliche Darstellung des PCR-Reaktionsverlaufs im Thermocycler [85]

Im Anschluss wird das entstandene PCR-Produkt mit Hilfe der sogenannten Gelelektrophorese und UV-Licht sichtbar gemacht. Da die DNA hierbei in ein Gel pipettiert werden muss, besteht große Kontaminationsgefahr.

Mit der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR) kann die Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer Nukleinsäureabschnitte in Echtzeit während des RT-PCR-Laufs, also ohne nachfolgende Untersuchungen und Arbeitsschritte und damit einhergehender Kontaminationsgefahr, visualisiert werden. Zudem erlaubt sie teilweise eine quantitative Aussage über die Menge an Desoxynukleinsäuren (DNA) in einer Probe, also indirekt z.B. über die Stärke einer Infektion.

Einem Reaktionsgemisch, welches die vermeintliche DNA eines gesuchten Organismus enthält, werden neben den Primern auch DNA-Sonden (Oligonukleotide) beigemischt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem sogenannten Quencher (löscht die Fluoreszenz zunächst) markiert sind und sich an Teilstränge heften. Legt sich ein korrekt basenpaarender Gegenstrang an diesen Teilstrang, wird der Quencher vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt und die Fluoreszenzlöschung wird aufgehoben. Ein für das menschliche Auge nicht sichtbares Leuchtsignal entsteht, welches vom Real-Time-PCR-Gerät detektiert wird.

Hierbei gibt der Schwellenwertzyklus (engl.: Cycle Threshold/CT) den PCR-Zyklus an, bei dem das exponentiell zunehmende Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA erstmals so stark ist, dass es einen zuvor festgelegten Schwellenwert überschreitet. Je mehr DNA in einer Probe vorhanden ist, desto mehr Kopien entstehen in den RT-PCR-Zyklen und umso schneller kommt es zu Fluoreszenzsignalen und einer Übersteigung des Schwellenwertes.

Die Menge an Fluoreszenzsignal korreliert also mit der Menge an DNA, sodass höhere DNA-Mengen in niedrigeren CT-Werten resultieren, der Schwellenwert also früher erreicht wird und umgekehrt. Durch die Verwendung von Standardkurven kann mit dem Verfahren DNA quantifiziert werden.

1.6.3.2 Aktueller Forschungsstand

Ein Multiplex-Real-Time-PCR-Ansatz zur gleichzeitigen Detektion von *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* und *Strongyloides stercoralis* wurde entwickelt und in einer Pilotstudie erprobt [14]. Außerdem wurde eine Real-Time-PCR zur Detektion von *Schistosoma mansoni* und *haematobium* entwickelt und getestet [13]. Derartige Tests versprechen die Möglichkeit, in Zukunft die Intensität einer Infektion quantifizieren zu können.

Das Verfahren scheint weitaus spezifischer und sensitiver als die herkömmlichen mikroskopischen Diagnostikmethoden zu sein, ist jedoch aufgrund des hohen Kostenaufwandes, der benötigten Infrastruktur und der aufwendigen Schulung von Personal bisher nicht als Standardverfahren etabliert.

Ziel unserer Untersuchung war es, die oben beschriebenen PCR-Ansätze am Mbeya Medical Research Center in Tansania zu etablieren und anhand eines eigenen Studienkollektivs auf ihre Reproduzierbarkeit und Validität hin zu prüfen.

1.7 Therapie von Helminthosen

Es stehen nur wenige Medikamente zur Behandlung von Helminthosen zur Verfügung. Viele der eingesetzten Präparate wurden ursprünglich in einkommensstarken Ländern für die Tiermedizin und nicht für menschliche Wurminfektionen entwickelt. Die Entwicklung und Verbreitung von Resistenzen gegen diese wenigen Arzneien ist wahrscheinlich [1, 19, 86].

Die wirksamste Medikamentendosis und der beste Zeitpunkt zur Behandlung unterscheiden sich bei den einzelnen Wurmspezies [87]. Während die breit angewandten und von der WHO empfohlenen Anthelmintika Albendazol und Mebendazol aus der Wirkstoffgruppe der Benzimidazol-Carbamate besonders gut gegen *Ascaris lumbricoides* und *Necator americanus* wirken, kommt es bei *Strongyloides stercoralis* gehäuft zu Therapieversagen [87].

Gegen *Ancylostoma duodenale* scheint Bephenium noch wirksamer zu sein, Tetrachlorethylen gegen *Necator americanus* [64].

Für Strongyloideninfektionen empfiehlt die WHO eine Einmaldosis von 200 µg/kg Ivermectin, die nach einer Woche wiederholt wird. Das Medikament ist jedoch nicht in allen Endemiegebieten erhältlich [88, 89]. Praziquantel ist das einzige Medikament gegen die Schistosomiasis auf dem Markt [50]. Als in den 90er Jahren das Patent für das Medikament Praziquantel auslief, kamen erschwingliche Generika auf den Markt.

Mebendazol und Albendazol werden bei der Bekämpfung von STHs am verbreitetsten präventiv eingesetzt. Sie haben kaum Nebenwirkungen und werden meist gut toleriert [90].

In Mbeya untersuchten wir unser Probandenkollektiv vor und nach Gabe einer Einmaldosis Albendazol und Praziquantel, um die Wirksamkeit dieser häufig und im großen Stil eingesetzten Medikamente zu überprüfen.

Die Human Hookworm Vaccine Initiative arbeitet zurzeit an einem Impfstoff gegen Hakenwürmer, da es insbesondere bei dieser Wurmsspezies gehäuft zu Therapieversagen nach einer Einmaldosis Mebendazol und rascher Reinfektion kommt [91].

1.8 Prävention von Helminthosen

In Anbetracht der großen Krankheitslast, der sozioökonomischen sowie bildungspolitischen Folgen der Helminthosen, wird seit Jahren versucht, im Rahmen großer weltweiter Interventionsprogramme Hochrisikogruppen regelmäßig und präventiv zu behandeln. Hierzu zählen vor allem Kinder im Schulalter und Frauen im gebärfähigen Alter, aber auch Erwachsene, die im Berufsleben mit den Würmern in Kontakt kommen [19].

Im Rahmen von MDA (mass drug administration)-Programmen werden in einkommensschwachen Ländern ganze Bevölkerungsgruppen präventiv mit Anthelmintika behandelt [74]. Die Verteilung der Chemoprophylaxe findet dabei hauptsächlich über gemeinschaftsbasierte Verteilungssysteme und über Schulen statt. So können bestimmte Alters- und Berufsgruppen, aber auch ganze Gemeinden kosteneffektiv behandelt werden.

MDA umgeht aufwendige und kostspielige Diagnostik und Massenscreenings. Die WHO empfiehlt eine jährliche Behandlung von Kindern zwischen 1-15 Jahren in STH-endemischen Ländern mit einer Einzeldosis Albendazol (oder Mebendazol). Die Wurmkur führt normalerweise zu einer direkten Verbesserung der körperlichen und geistigen Entwicklung der Kinder. Mehr Schulbesuche und verbesserte schulische Leistungen können erreicht werden. Zusätzlich findet durch die MDA eine Entlastung der ohnehin schon beanspruchten Gesundheitssysteme in Entwicklungsländern statt [19].

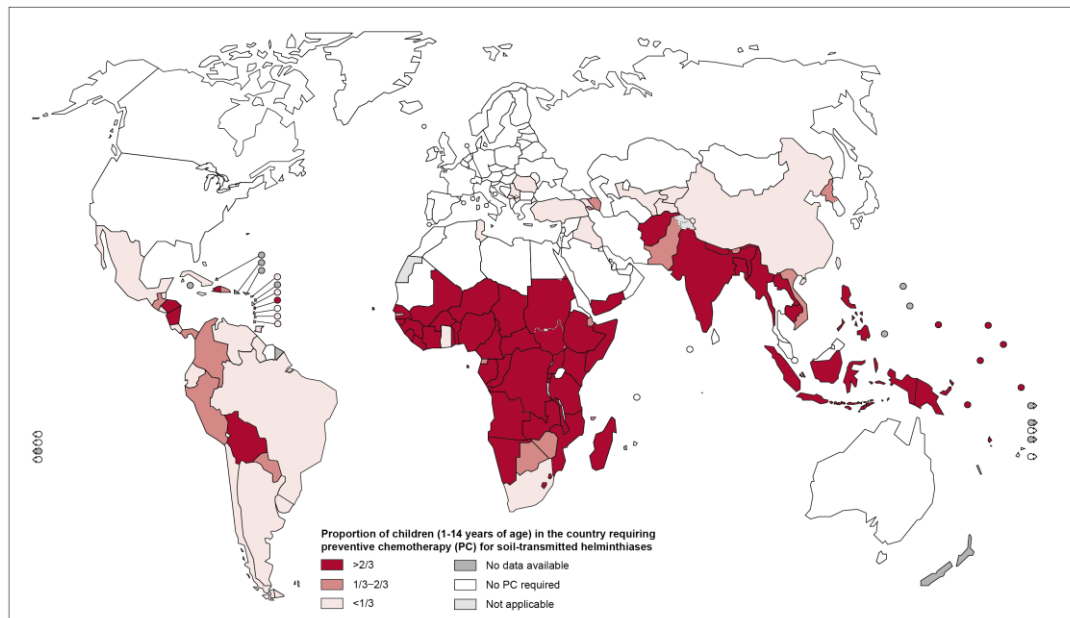
Die am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe Albendazol und Mebendazol sind für Schwangere im ersten Trimester sowie Kinder unter einem Jahr nicht geeignet [74]. Unlängst werden sie von der WHO auch mit anderen Medikamenten wie Praziquantel gegen Schistosomiasis und Ivermectin gegen lymphatische Filariose kombiniert, da Koinfektionen häufig sind [3].

Dies hat vielerorts zu einer deutlichen Abnahme der Prävalenz, Infektionsstärke und Morbidität geführt. Durch die wiederholte Exposition der Helminthen gegenüber subkurativen Dosen besteht jedoch die Gefahr von Resistenzentwicklungen oder einem relativen Anstieg von Wurmspezies, die mit den gewöhnlichen Anthelmintika nur unzureichend oder gar nicht behandelt werden können [2, 56]. Da trotz bisheriger Kontroll- und Interventionsprogramme noch immer zwei Drittel der in Riskiogeieten

lebenden Schulkinder keinen Zugang zu Anthelmintika haben, verfolgt die WHO derzeit das ambitionierte Ziel, bis 2020 mindestens 75% aller Vorschul- und Schulkinder in endemischen Ländern regelmäßig präventiv zu behandeln [10]. Um diese Interventionen besser koordinieren und überwachen zu können, sind sensitivere und quantitative Diagnostikmethoden von Nöten [11].

Langfristig müssen neben der medikamentösen Therapie vor allem Verbesserungen der Grund- und Abwasserversorgung, der Bereitstellung von hygienischen Sanitäranlagen und der sozioökonomischen Entwicklung der betroffenen Länder vorangetrieben werden [92].

Proportion of children (1-14 years of age) in the country requiring preventive chemotherapy (PC) for soil-transmitted helminthiasis, worldwide, 2011



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2012. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Abbildung 11: Anteil an Kindern (1-14 Jahre), die eine präventive Chemotherapie gegen Soil-transmitted Helminths (*Ascaris lumbricoides*, Hakenwürmer, *Trichuris trichuria*) benötigen [93]

1.9 Helminthosen und HIV

Von den weltweit mehr als zwei Milliarden [94] wurminfizierten Menschen sind allein im subsaharischen Afrika über 22 Millionen gleichzeitig mit HIV koinfiziert [95].

Studien zeigten, dass bei HIV-positiven Patienten häufig ausgeprägte Infektionen sowie ein Polyparasitismus vorliegen [96-98].

In einigen Studien wurde außerdem beschrieben, dass HIV-Schistosomen-koinfizierte Patienten weniger Schistosomeneier am Tag ausscheiden als HIV-negative Probanden. Dem liegt die Hypothese zu Grunde, dass ein funktionierendes Immunsystem die Eiausscheidung begünstigt. Bei HIV-Infizierten ist die Zahl der peripheren CD4-Zellen erniedrigt und es liegt eine Immunschwäche vor [99-101]. Wenn eine anthelmintische Therapie eine antiretrovirale Therapie bei HIV-positiven Patienten hinauszögern oder sogar die Morbidität und Mortalität senken würde, wäre die Entwurmung HIV-positiver Patienten für das öffentliche Gesundheitswesen von großer Bedeutung [102]. Mit Hilfe eines sehr sensitiven Diagnostikverfahrens könnten derartige Zusammenhänge näher untersucht werden.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl ein großer Teil der Weltbevölkerung mit Würmern infiziert ist und Betroffene durch einen meist chronischen Krankheitsverlauf mit einhergehender Produktivitäts- und Leistungsminderung oft in eine Abwärtsspirale geraten, fließen wenig Gelder in Studien und in die Erforschung sensitiver Diagnostikmethoden zur sicheren und frühzeitigen Detektion von Wurminfektionen. Mit der Real-Time-PCR, einem molekulardiagnostischen Untersuchungsverfahren, welches spezifische Nukleinsäuresequenzen der Würmer nachweist, könnten, laut einer Gruppe niederländischer und malaysischer Wissenschaftler, selbst leichte Wurminfektionen zuverlässig nachgewiesen werden. Dieses neue Verfahren wurde bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchung jedoch nur an einem Labor mit einem begrenzten Probandenkollektiv getestet [14].

Unser Bestreben war es daher, die Methode erstmals in einem anderen Endemiegebiet zu überprüfen und zu validieren. Vor diesem Hintergrund, waren Ziele der hier vorgestellten Untersuchung:

- 1) Etablierung molekulardiagnostischer Untersuchungsmethoden zur Detektion von Helminthen am MMRC-Labor in Mbeya, Tansania
- 2) Direkter Vergleich der Real-Time-PCR mit der herkömmlich zur Diagnostik von Wurminfektionen eingesetzten parasitologischen Mikroskopie anhand gesammelter Stuhlproben aus der Region Mbeya. Bestimmung der Sensitivität und Ermittlung von Vor- und Nachteilen, Problemen und Fehlerquellen der beiden Methoden
- 3) Ermittlung der Wirksamkeit einer Einmaldosis Albendazol und Praziquantel, zwei von der WHO empfohlenen Wurmtherapeutika, mit Hilfe des neuen Diagnostikverfahrens
- 4) Beschreibung von Auffälligkeiten und Besonderheiten bei der Diagnostik HIV-Helminthen-koinfizierter Probanden

Die Studie sollte eine Methode identifizieren, die eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität aufweist, robust funktioniert und bei aktuellen und zukünftigen Studien am MMRC-Labor in Mbeya angewandt werden kann.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen Wissenschaftler und Gesundheitspolitiker bei der Planung des zukünftigen Vorgehens in der Individualdiagnostik, bei großen Interventionsprogrammen, Studien zur Medikamentenwirksamkeit und Resistenzentwicklung sowie Studien zur Erforschung von Interaktionen zwischen Würmern und anderen immunmodulierenden Erkrankungen wie HIV/AIDS, Tuberkulose und Malaria u.v.m. unterstützen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

| | |
|------------------|--|
| Pipetten: | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Hitzeblöcke: | Rotilabo-Block Heater H250, Carl Roth, Hamburg, Deutschland |
| Tischzentrifuge: | Mikro 200R Hettich Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland |
| Waage: | Kernwaage min 0,5 g max. 2000 g |
| Schüttler: | Vortex Mixer neo lab, 1-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| PCR-Gerät: | Rotor-Gene 6000 Multiplexing System, Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australien |
| PCR-Software: | Rotor-Gene 6000 Series Software Version 1.7.75, Corbett Life Science, Cambridge, UK |

Plastikwaren

| | |
|----------------------|---|
| Pipettenspitzen: | Kisker Pipettenspitzen (10 ul, 20 ul, 200 ul), Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland |
| Einfrierröhrchen: | Kryoröhrchen, Nunc, Dänemark |
| Mikroröhrchen: | 0,5 ml aus Kunststoff (Polypropylen) mit Klappdeckel, Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| PCR-Reaktionsgefäße: | 72-Well Loading Block mit 0,1 ml Strip Tubes und Caps, Qiagen, Hilden, Deutschland |

Chemikalien

| | |
|---------------------|---|
| DNA-Extraktionskit: | QIAamp DNA minikit, Qiagen, Hilden, Deutschland |
| PVPP: | Polyvinylpolypyrrolidone, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Ethanol: | 96-100% |
| PBS: | Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Magnesium: | MgCl ₂ , Roche Diagnostics, Almere, Niederlande |
| H ₂ O: | Molekularbiologisches Wasser, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| BSA: | Bovines Serum Albumin, Roche Diagnostics, Almere, Niederlande |

Enzyme

| | |
|-----------------|---|
| Taq-Polymerase: | HotStarTaq Master Mix Kit (1000 U), Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Proteinase K: | Qiagen, Hilden, Deutschland |

Nukleotide

| | |
|--------------------|---|
| Primer und Sonden: | Thermofischer, Ulm, Deutschland bis auf N. americanus- und S. stercoralis-Sonden (Biologio, Niederlande); siehe Tabelle 6 |
|--------------------|---|

Tabelle 6: *Verwendete Primer und Sonden für die Real-Time-PCR*

| Zielorganismus | Oligonukleotid | Oligonukleotidsequenz | Größe der Zielsequenz in Basenpaaren | Zielgen | Genbank Zugangscode der Zielorganismen |
|--------------------------|----------------|---|--------------------------------------|----------|--|
| N. americanus | Na58F | 5'-CTGTTTGTCTGAACGGTACTTGC-3' | 101 bp | ITS2 | AJ001599 |
| | NA158R | 5'-ATAACAGCGTGACACATGTTGC-3' | | | |
| | Na81MGB | FAM-5'-CTGTACTACGCATTGTATAC-3'-XS | | | |
| A. duodenale | Ad125F | 5'-GAATGACAGCAAACCTCGTTGTTG-3' | 71 bp | ITS2 | AJ001594 |
| | Ad195R | 5'-ATACTAGCCACTGCCGAAACGT-3' | | | |
| | Ad155MG B | 5'-ATCGTTTACCGACTTTAG-3'-XS | | | |
| A.lumbricoides | Alum96F | 5'- GTAATAGCAGTCGGCGGTTTCTT-3' | 87 bp | ITS1 | ALJ000895 |
| | Alum183R | 5'- GCCCAACATGCCACCTATTC -3' | | | |
| | Alum124T | YY -5'- TTGGCGGACAATTGCATGCGAT-3'- BHQ1 | | | |
| S. mansoni + S. haem. | Ssp48F | 5'- GGTCTAGATGACTTGATTGAGATGCT-3' | 77 bp | ITS2 | AF503487; DQ677661 |
| | Ssp124R | 5'-TCCCGAGCGTGTATAATGTCATTA-3' | | | |
| | Ssp78T | FAM-5'- TGGGTTGTGCTCGAGTCGTGGC-3' | | | |
| S. stercoralis | Stro18S-1530F | 5'- GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3' | 101 bp | 18S rRNA | AF279916 |
| | Stro18S-1630R | 5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3' | | | |
| | Stro18S-1586T | Qu705-5'-ACACACCGGCCGTCGCTGC-3'-XS | | | |
| PhHV-1 | FPhHV-267s | 5'-GGGCGAATCACAGATTGAATC-3' | 69 bp | gB | |
| | RPhHV-337as | 5'-GCGGTTCCAAACGTACCAA-3' | | | |
| | PhHV-305tq | Tex.Red-5'- TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-3'-BHQ2 | | | |

Oligonukleotidname: F: Forward primer, R: Reverse Primer; MGB: Minor Groove Binder-Sonde; T: TaqMan-Sonde; Oligonukleotidsequenzen: A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin und T: Thymin; Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, [13, 14]

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchungsgebiet und -population

Mbeya

Die Region Mbeya, aus der wir unsere Probanden rekrutierten, liegt im Südwesten Tansanias und ist über eine wichtige Fernstraße und eine Eisenbahnlinie mit Dar es Salaam verbunden. Im Süden grenzt sie an die Nachbarländer Sambia und Malawi. In der Region, die mit ihren 63420 m² etwa 6,4% der Gesamtfläche Tansanias ausmacht, leben mehr als 2 Millionen Menschen. Die Region Mbeya wird in acht Distrikte unterteilt (siehe Abbildung 12). Hauptstadt der Region ist die gleichnamige Stadt Mbeya.

Die Region ist überwiegend ländlich und bis zu 80% der Einwohner leben von der Landwirtschaft. Häufige Anbauprodukte sind Bohnen, Erdnüsse, Weizen, Kartoffeln, Kaffee, Bananen, Tee und Kakao. Der übrige Anteil der Bevölkerung lebt von Viehbesitz, Fischerei, Imkerei, Minenarbeit, der Kleinindustrie oder besitzt Kleinunternehmen [103].



Abbildung 12: Die Region Mbeya ist in acht Distrikte unterteilt. Mbeya Urban (Einwohnerzahl 2002: 265.000), Mbeya Rural (254.000), Rungwe (306.000), Kyela (174.000), Ileje (110.000), Mbozi (513.000), Chunya (206.000) und Mbarali (234.000). Unsere Probanden rekrutierten wir aus Gebieten in Mbeya Rural, Mbeya Urban, Rungwe, Kyela, Mbozi und Mbarali [104]

Das Klima in der Region Mbeya ist stark höhenabhängig. Während Mbeya Urban etwa 475 m über dem Meeresspiegel liegt, gibt es in Rungwe Berge, die bis zu 2981 m hoch sind. Auch die Niederschlagstärke variiert regional und führt zu Trocken- und Regenzeiten. Die Temperaturen liegen zwischen 25 Grad im Flach- und 16 Grad im Hochland.

Die Regenzeit liegt zwischen den Monaten Oktober und Mai. Im Rest des Jahres ist es trocken. In Kyela, dem Hochland von Rungwe und dem südlichen Ileje, fallen bis zu 2600 mm Regen. Es herrschen optimale klimatische Bedingungen für das Heranreifen von Helmintheneiern in feuchtwarmer Erde vor [105].

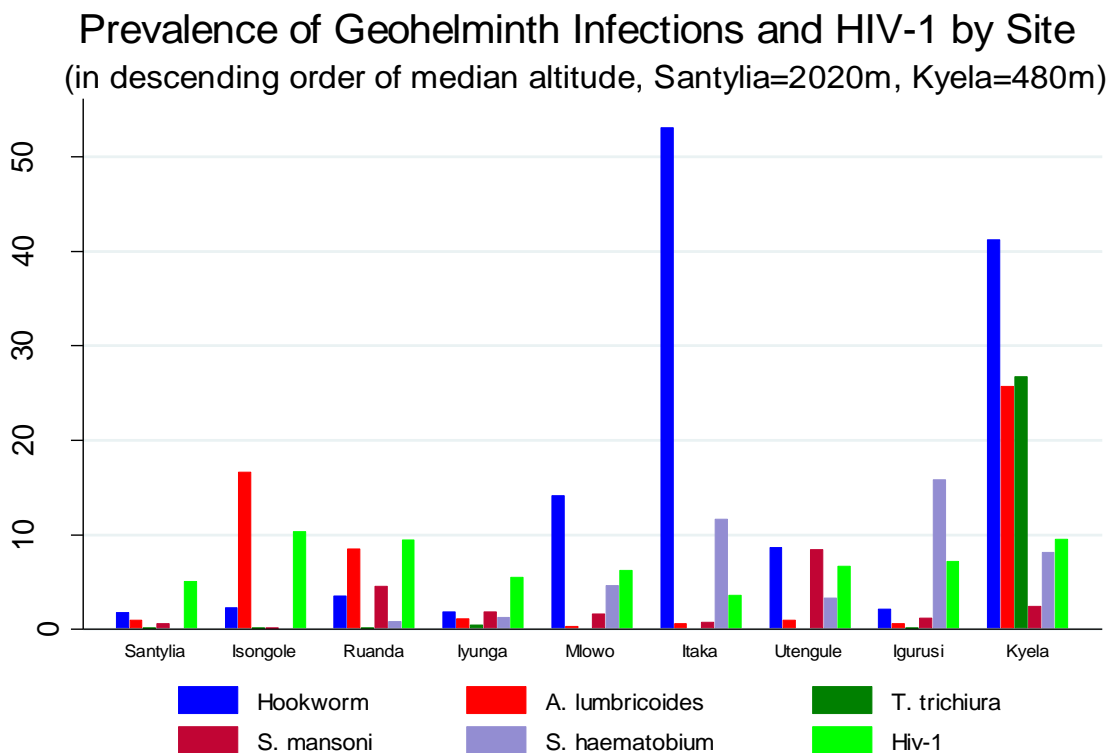


Abbildung 13: Prävalenz von Helminthosen und HIV-Infektionen nach Region in Mbeya (in absteigender Reihenfolge nach mittlerer Höhenlage, Santyia=2020 m, Kyela=480 m); Bestimmung des Wurminfektionsstatus mittels Kato-Katz-Mikroskopie im Rahmen der EMINI-Studie

3.2.2 Studiendesign und Einschlusskriterien

Die vorliegende Untersuchung wurde am Mbeya Medical Research Center durchgeführt. Das MMRC (Abbildung 15) ist ein seit dem Jahre 2000 bestehendes Partnerschaftsprojekt zwischen dem National Institute for Medical Research (NIMR), dem Mbeya Referral Hospital, dem Mbeya Regional Medical Office, dem U.S. Military HIV Research Program und der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Universität München. Das Labor nimmt in Tansania eine Pionierstellung bei der Erforschung verschiedener Erkrankungen wie Malaria, Tuberkulose und HIV/AIDS ein.

Die Probensammlung und Datenerhebung für unsere Untersuchung erfolgte im Rahmen der von Herrn Dr. Elmar Saathoff initiierten und geleiteten Wurm-HIV-Interaktionsstudie WHIS, die von Juni 2009 bis April 2013 in Mbeya durchgeführt wurde. Die Studie ist ein Kooperationsprojekt zwischen der Abteilung für Infektions- und Tropenkrankheiten der LMU München und dem NIMR-MMRC und untersucht den Einfluss von Helmintheninfektionen auf die HIV-Epidemiologie und -Immunologie. Geldgeber war die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG).

Die Studienpopulation der WHIS-Studie (Worm infection and HIV Interaction Study) ging aus der schon zuvor bestehenden Kohortenstudie EMINI (Establishment of the infrastructure for the Evaluation and **M**onitoring of the **I**mpact of **N**ew Interventions) hervor, die von der Europäischen Union im Rahmen von EuropAid finanziert wurde.

Die beiden Studien, aus denen unsere Untersuchungskohorte hervorging, sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Das Studiendesign und die Einschlusskriterien bei der Probandenrekrutierung sind zudem grafisch in Abbildung 14 dargestellt.

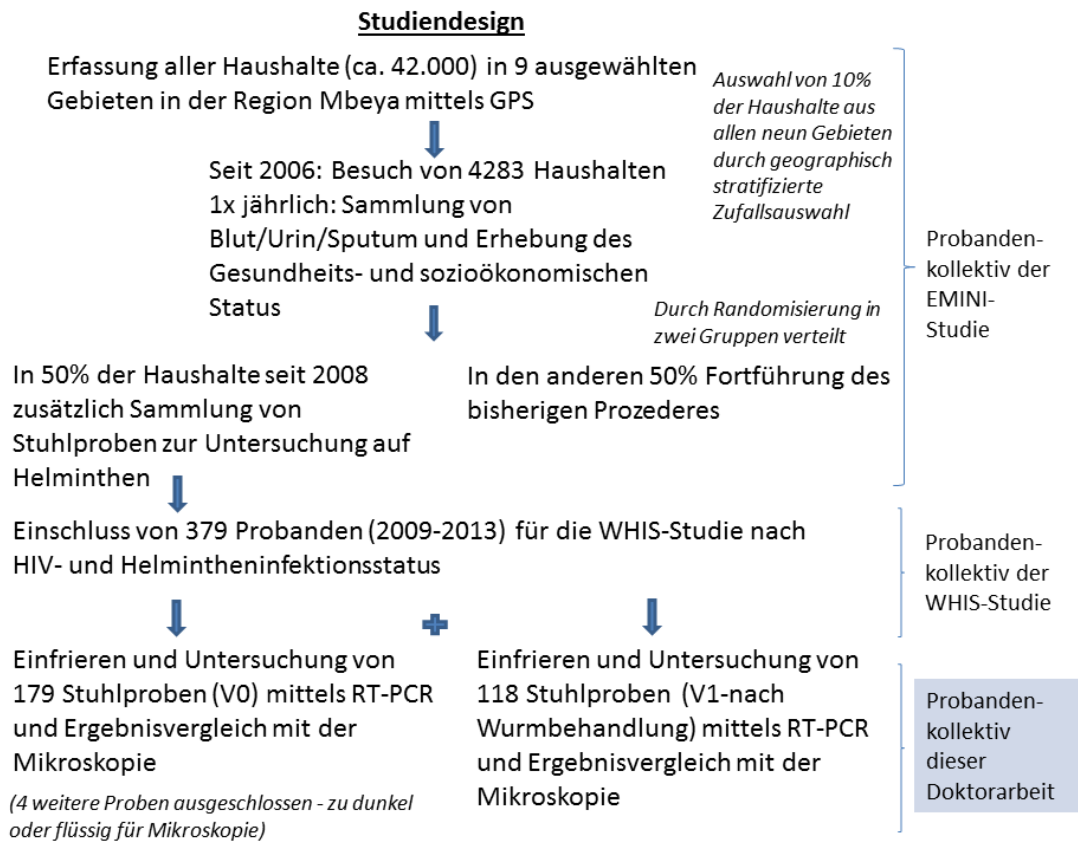


Abbildung 14: Studiendesign. Rekrutierung unseres, mit Hilfe der RT-PCR und Mikroskopie auf Helminthen untersuchten Kollektivs

EMINI (Establishment of the infrastructure for the Evaluation and Monitoring of the Impact of New Interventions)

Hauptziel der EMINI-Studie war es, die in der Region Mbeya bestehende gesundheitliche Infrastruktur zu stärken und die Auswirkungen neuer Interventionen zu beobachten und zu evaluieren. Außerdem galt es mit der Studie epidemiologische Daten zu verschiedenen infektiologischen Erkrankungen, unter anderem Wurminfektionen, zu generieren.

Vor dem Start wurden mit Hilfe von GPS-Geräten 42000 Haushalte ausfindig gemacht. Diese verteilten sich auf insgesamt neun unterschiedliche Gebiete der Region Mbeya, sodass das Kollektiv eine Vielfalt an infrastrukturellen und umgebungsbedingten Merkmalen abdeckte (z.B. städtische und ländliche Standorte, unterschiedlicher Abstand zu Hauptverkehrsstraßen und Höhe über dem Meeresspiegel).

Für die EMINI-Kohorte wurden 10% (4283) aller Haushalte durch geschichtete Zufallsauswahl aus den neun Gebieten ausgewählt. Seit 2006 wurden diese Haushalte einmal jährlich besucht, um biologische Proben (Blut, Urin und Sputum) zu sammeln, sozio-demographische Daten und den Gesundheitsstatus aller Hausbewohner zu erheben.

Im dritten Studienjahr, 2008, wurde zusätzlich mit dem Sammeln von Stuhl begonnen, der mit Hilfe des Kato-Katz-Mikroskopieverfahrens auf Helminthen untersucht wurde. Aufgrund logistischer Schwierigkeiten konnte dies nur bei 50% der Probanden durchgeführt werden, die hierfür randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt wurden.



Abbildung 15: Die Verarbeitung der Stuhlproben und die Durchführung der RT-PCR wurden am MMRC-Labor in Tansania durchgeführt

WHIS (Worm-HIV-Intervention-Study)

Ziel der WHIS-Studie war es, mehr über den möglichen Einfluss verschiedener Helminthen (Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Hakenwürmer, Schistosoma mansoni und Schistosoma haematobium) auf die Prävalenz, Inzidenz und Progression einer HIV-Infektion herauszufinden. Hierzu wurden viele der bereits in EMINI generierten epidemiologischen Daten verwendet.

Zusätzlich wurden in einer Subpopulation von EMINI detaillierte immunologische Daten erhoben, um den möglichen Einfluss von Helminthen-Infektionen auf die Immunologie von HIV-Infizierten und Nicht-Infizierten näher zu beleuchten.

Die WHIS-Partizipanten wurden in Bezugnahme auf ihren Kato-Katz-Wurminfektionsstatus und ihren HIV-Status aus den EMINI-Teilnehmern ausgewählt. Hierbei wurden für jede der untersuchten Helmintheninfektionen HIV-positive und HIV-negative Teilnehmer eingeschlossen. Als Kontrollgruppen wurden zudem Helminthen-freie Teilnehmer mit und ohne HIV-Infektion eingeschlossen.

Es wurde versucht, die WHIS-Teilnehmer gleichmäßig aus allen neun Gebieten zu rekrutieren, was aber aufgrund der ungleichen Verteilung von HIV- und Helmintheninfektionen im Studiengebiet nur bedingt möglich war. Zum Zeitpunkt meines Aufenthaltes in Tansania waren 289 der EMINI-Probanden für die WHIS-Immunologie registriert (Tabelle 7).

Tabelle 7: *WHIS-Probandenregistrierung nach HIV- und Wurmstatus zum Zeitpunkt unserer Untersuchung*

| | Fallzahl | HIV-Status | Wurmstatus |
|--------------|------------|-------------|-------------|
| | 44 | Negativ (-) | Negativ (-) |
| | 154 | Negativ (-) | Positiv (+) |
| | 49 | Positiv (+) | Negativ (-) |
| | 51 | Positiv (+) | Positiv (+) |
| Total | 298 | | |

Der zeitliche Ablauf der WHIS-Studie ist in Abbildung 16 grafisch dargestellt. Bei jedem Teilnehmer waren drei Besuche vorgesehen, bei denen je 40 ml Blut, eine Urinprobe und eine Stuhlprobe gesammelt wurden. Beim Baseline-Besuch (Visit 0) wurden Blut, Stuhl und Urinproben von jedem Teilnehmer gesammelt. Zudem wurden ein kurzes Interview und eine kurze medizinische Untersuchung vorgenommen, die beide auf einem Fragebogen dokumentiert wurden.

Danach wurden alle Teilnehmer mit 400 mg Albendazol gegen intestinale Nematoden und mit 40 mg/kg Praziquantel gegen Schistosomeninfektionen behandelt. Weitere Besuche erfolgten etwa sechs Wochen (Visit 1) und ca. ein Jahr (Visit 2) nach dem Erstbesuch. Bei diesen beiden Besuchen wurden erneut Proben und Daten gesammelt wie beim Erstbesuch (V0). Die HI-Viruslast und CD4- Zellzahl konnten im NIMR-MMRC-Labor bestimmt werden. Alle diagnostischen Laboruntersuchungen wurden am NIMR-MMRC durchgeführt.

Ein Teil der Stuhlproben wurde eingefroren und bildete die Grundlage meiner späteren molekulardiagnostischen Untersuchungen.



Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der WHIS-Studie und Vorgehen bei den einzelnen Besuchen

Ethik

Die EMINI-Studie wurde von der lokalen (Mbeya), nationalen (Tansania) und der deutschen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München begutachtet.

Alle Teilnehmer der WHIS-Studie wurden vorher ausführlich über die WHIS-Studie und die Studienprozeduren informiert und haben vor Studieneintritt schriftlich ihre Einwilligung (informed consent) erteilt.

3.2.3 Labormethoden

3.2.3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Jeder Proband erhielt einen Stuhlbehälter mit Schraubverschluss, der mit Personenidentifikationsnummer und Namen gekennzeichnet war. Am Folgetag wurden die Probanden erneut aufgesucht, um den Stuhlbehälter einzusammeln. Konnte zu diesem Zeitpunkt von dem Studienteilnehmer noch keine Probe abgegeben werden, wurde der Teilnehmer erneut am dritten und siebten Tag nach der Verteilung der Behälter aufgesucht. Für den Transport zurück zum Labor wurden die Behälter in einer Styroporkiste bei ca. 4°C Grad gelagert. Bis zur mikroskopischen Untersuchung in den diagnostischen Labors vergingen 4-24 Stunden Zeit. Etwa ein Gramm jeder Probe wurde in einem Einfrierröhrchen bei -20°Celsius für die später durchgeführte DNA-Extraktion und Untersuchung mittels Real-Time-PCR eingefroren.

3.2.3.2 Mikroskopische Stuhluntersuchung

Die mikroskopischen Untersuchungen der WHIS-Stuhlproben wurden zwischen Juni 2009 und Juni 2011 im parasitologischen EMINI-Labor des NIMR-MMRC durchgeführt. Die Aufarbeitung der Stuhlproben und die Mikroskopie erfolgten durch ein geschultes Team aus zwei Labormitarbeitern.

Kato-Katz-Methode: Die im Rahmen der EMINI-Studie gesammelten Stuhlproben wurden mit der Kato-Katz-Methode [59] auf Wurmeier untersucht. Hierzu wurden von jedem Probandenstuhl zwei Teilproben (je 41.7 mg) erstellt, auf die die Methode angewandt wurde (Abbildungen 17-20).

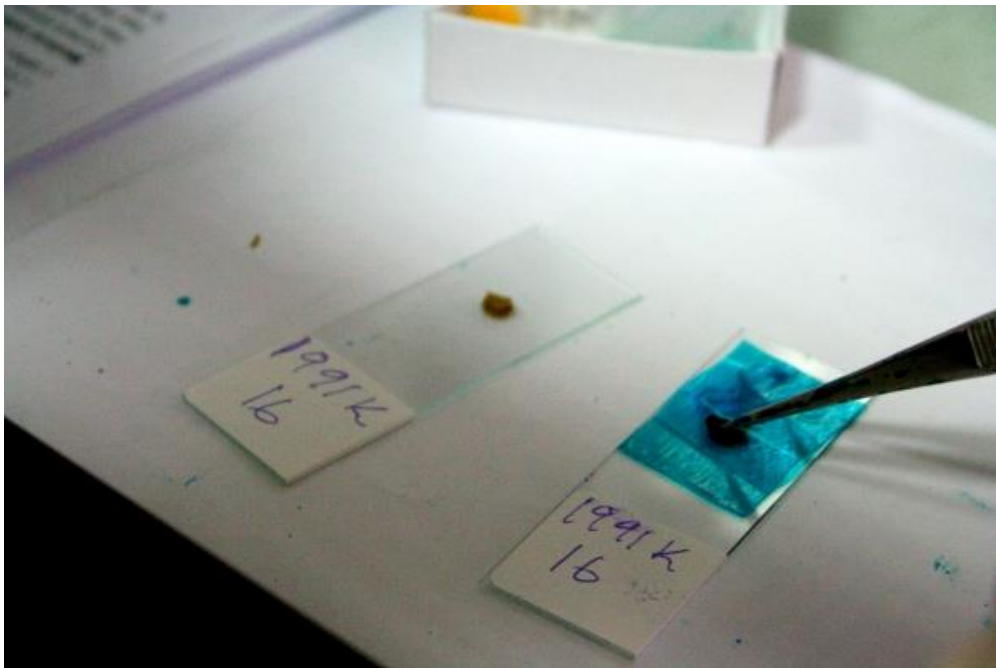
Merthiolat-Jod-Formalin (MIF)- Konzentrationsmethode: Die im Rahmen der WHIS-Studie gesammelten Stuhlproben wurden zunächst mit der MIF-Lösung konzentriert, bevor sie mikroskopisch nach Parasiten untersucht wurden. Durch die Konzentrierung sollte die Sensitivität und damit die Wahrscheinlichkeit, vorhandene Parasiten zu detektieren, gesteigert werden.

1 Liter MIF-Lösung enthielt: Ethanolamin 1000 mg, Ethylendiamin 280 mg, Natriumchlorid 8000 mg, Natriumtetraborat Decahydrat 2650 mg, destilliertes Wasser 1000 ml (Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine. *Dispensary Handbook*. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich)



Abbildungen 17 und 18: Einzelne Teilschritte der Kato-Katz-Methode. Die parasitologischen Verfahren und die Mikroskopie wurden von geschulten, erfahrenen Mitarbeitern des NIMR-MMRC durchgeführt





Abbildungen 19 und 20: Beim KK-Verfahren wird der Stuhl zunächst auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem quadratischen Zellglas, welches mit Glycerin durchtränkt ist, abgedeckt. Im Anschluss an diese Aufbereitung werden die Wurmeier und Larven unter dem Mikroskop gezählt. Die durchschnittlich gezählte Eizahl beider Teilproben wird mit 24 multipliziert, um die Eizahl pro Gramm Stuhl zu erhalten



Vor Beginn der WHIS-Studie wurde entschieden, dass am MMRC fortan die MIF-Mikroskopie anstelle der KK-Mikroskopie (EMINI-Studie) zur Helminthendetektion zum Einsatz kommen sollte, um ein zweites Mikroskopieverfahren zu validieren. Diese Entscheidung stellte sich als Fehlgriff heraus, da die Labormitarbeiter mit dem neuen Verfahren weniger vertraut waren und die Sensitivität dadurch geringer ausfiel. Daher verglichen wir die RT-PCR-Ergebnisse im Ergebnisteil nicht nur mit der MIF-Mikroskopie, die an denselben Stuhlproben angewandt wurde, aus denen wir auch die DNA für die Molekulardiagnostik extrahierten, sondern zusätzlich mit den EMINI-KK-Ergebnissen von Stuhlproben, die im Durchschnitt 75 Tage vor den WHIS-Stuhlproben gesammelt wurden.

3.2.3.3 Molekulardiagnostische Stuhluntersuchung

Seit 2009 wurde ein Teil der Stuhlproben der WHIS-Probanden eingefroren, um ihn zu einem späteren Zeitpunkt mit der RT-PCR nachuntersuchen zu können. Die Etablierung der RT-PCR und die Prozessierung der Proben fanden im Rahmen dieser Doktorarbeit von März bis Juni 2011 statt.

Die Nematoden *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* und *Strongyloides stercoralis* konnten gleichzeitig in einer Multiplex RT-PCR detektiert werden und die Trematoden *Schistosoma mansoni* und *haematobium* in einer separaten Singleplex-RT-PCR. Unsere Vorgehensweise bei der DNA-Extraktion aus Stuhl und bei der Durchführung der RT-PCR-Methode basierte auf publizierten Protokollen von Dr. Jaco J. Verweij et al. von der Universität Leiden in den Niederlanden [13, 14].

Bevor wir das Verfahren am MMRC etablierten, führten wir erste Versuchsreihen am Tropeninstitut der LMU in München durch, um uns mit der Methodik und den Protokollen vertraut zu machen.

Des Weiteren konnte ich mit dem EMINI-Laborleiter Dr. Nsojo einen einwöchigen Trainingsworkshop zum Thema „Molecular diagnosis of intestinal parasites“ in Entebbe Uganda besuchen, der persönlich von Dr. Jaco J. Verweij geleitet wurde und uns tiefergehend in die Materie einführte, bevor wir im Anschluss die DNA-Extraktion aus Stuhlproben und die Helminthen-PCR in Mbeya etablierten.

Set-up des Labors

Um Kontaminationen zu vermeiden, richteten wir uns in drei voneinander getrennten Räumen im Labor ein (Abbildung 21): Einem zur Vorbereitung des PCR-Mastermix (mit UV-Lampen, um mögliche DNA- und RNA-Spuren auf Pipetten und Pipettenspitzen zu eliminieren), einem, in dem die aus den gesammelten, gefrorenen Stuhlproben extrahierte DNA hinzugefügt wurde und einem, in dem der Real-Time-Cycler stand und die PCR-Läufe durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Abbildungen 22 und 23).

Zudem entwickelten wir einen detaillierten Reinigungsplan der Böden und Arbeitsmaterialien, um keine Nukleinsäuren von einem Raum in den nächsten zu transferieren.

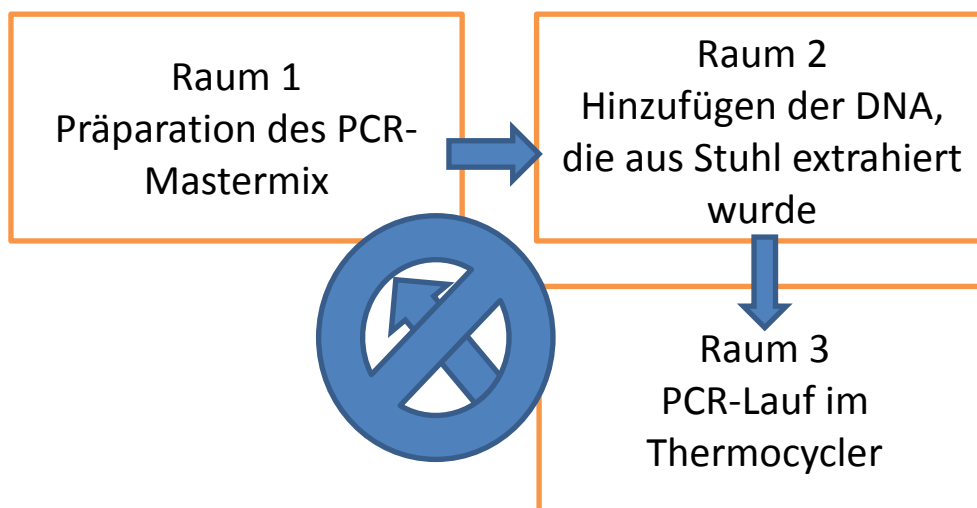


Abbildung 21: Raumschema mit Wegrichtung, um Kontaminationen zu vermeiden



Abbildung 22: Räumlichkeit zur Präparation des Mastermix (Raum 1). Zur Gewährleistung von Kontaminationsfreiheit kommen UV-Lampen zur Zerstörung von Nukleinsäuren zum Einsatz



Abbildung 23: Raum 3 - Rotorgene 6000 Thermocycler der Firma Corbett Life Science. Durchführung des Real-Time-PCR-Laufs und anschließende Auswertung am Computer

DNA-Isolierung

Die gereinigte DNA wurde aus den für WHIS eingefrorenen Stuhlproben mit Hilfe des „QIAamp DNA minikits“ von Qiagen gewonnen. Hierbei folgten wir den Anweisungen eines Protokolls, das uns freundlicherweise Herr Dr. Jaco J. Verweij von der Universität Leiden in den Niederlanden zur Verfügung stellte. Wir nahmen nur geringe Modifizierungen vor.

PhHV-1-DNA wurde der AL-Pufferlösung beigefügt und diente als interne Kontrolle des Extraktionsprozesses. Die PhHV-DNA wurde uns von Herrn Dr. Jaco J. Verweij bereitgestellt.



Abbildung 24: *Extraktionsraum. Isolierung der DNA aus Stuhlproben unter der Abzugshaube*

Tag 1

1. Etwa 0,25 g Stuhl in einem 0,5 ml Mikroröhrchen in PBS mit 2% PVPP lösen (z.B. 0,25 g in 500 µl; 0,28 g in 560 µl). Im Anschluss mit dem Vortex-Mixer gut vermischen.
2. Gemisch über Nacht bei -20 °C einfrieren.

Tag 2

3. Gemisch auftauen, vortexen, kurz zentrifugieren, Spitze der Pipette abschneiden, 200 µl der Suspension mit der Pipette aufnehmen.
4. Stuhlsuspension für 10 Minuten im Hitzeblock bei 100 °C erhitzen.
5. Zur Probe 180 µl Tissue Lysis Puffer (ATL) + 20 µl Proteinase K hinzufügen, vortexen, 2 Stunden oder über Nacht bei 55 °C im Hitzeblock inkubieren (nach einer Stunde kurz vortexen).
6. 400 µl AL Puffer (enthält interne Kontrolle PhHV-1) zu 400 µl der Probe hinzufügen, gut vortexen, für 10 Minuten bei 70 °C inkubieren. Eppendorf-Mikroröhrchen mit 400 µl Ethanol (96-100%) vorbereiten.
7. 30 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren und den Überstand anschließend in 400 µl Ethanol (96-100%) enthaltendes Eppendorf-Röhrchen pipettieren. Durch vortexen und kurzes Zentrifugieren (5-10 Sekunden) gut mischen.
8. Eine nummerierte QIAamp-Spinsäule in eine saubere 2 ml Qiamp Collection-Tube platzieren. Vorsichtig 600 µl der Mixtur aus Schritt 7 in Spinsäule pipettieren ohne den Rand zu befeuchten. Den Deckel schließen und bei 10000 r.p.m. eine Minute lang zentrifugieren.
9. Spinsäule in neue saubere Collection Tube platzieren und mit dem Rest der Mixtur aus Schritt 7 wie in Schritt 8 verfahren.
10. Spinsäule in neue, saubere 2 ml Collection Tube platzieren.
11. Die Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl des AW1 Puffers hinzufügen. Bei 10000 r.p.m. eine Minute lang zentrifugieren.
12. Die Collection Tube ausleeren und 500 µl des AW2 Puffers in Spinsäule pipettieren. Eine Minute bei 10.000 r.p.m. und 2 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren (die Geschwindigkeit nach einer Minute hochstellen, während Zentrifuge noch läuft).
13. Die Spinsäule in nummeriertes 1,5 ml Mikroröhrchen mit Klappdeckel platzieren. Spinsäule vorsichtig öffnen, die DNA mit 200 µl AE Puffer auswaschen und den Puffer etwa 1 Minute auf dem Filter belassen bevor für eine Minute bei 8000 r.p.m zentrifugiert wird.



Abbildung 25: Mehrere Spinsäulen bei der DNA-Extraktion



Abbildung 26: Die extrahierte DNA wurde bis zur Durchführung der RT-PCR bei -20°Celsius gelagert

Real-Time-PCR-Methode und Primer

Primer und Sonden

Die Sequenzen für die spezifischen Primer und Sonden der einzelnen Helminthen entnahmen wir Verweij et al. Protokollen (Tabelle 6).

Die verwendeten Primer und Sonden zeigten eine Spezifität von 100%, als sie von Mikrobiologen der Universität Leiden gegen DNA-Kontrollen einer Vielzahl von parasitären Mikroorganismen getestet wurden [8, 12].

Optimierung der RT-PCR-Methode:

Für jeden einzelnen Organismus bestimmten wir mit Hilfe von Verdünnungsreihen die optimalen Primerkonzentrationen. Dies geschah, sowohl in Singleplex- als auch in Multiplex-Reaktionsansätzen, um eine potenzielle Hemmung durch eventuell konkurrierenden Primerpaare oder Sonden aufdecken zu können. Außerdem wurden Tests mit und ohne die interne Kontrolle PhHV-1 durchgeführt, um einen möglichen Einfluss auf das Ergebnis zu detektieren.

Es wurde zudem getestet, ob mit der Methode auch gemischte Infektionen mit mehreren Helminthen gleichzeitig detektiert werden können, ohne dass sich die Reagenzien gegenseitig hemmen und damit die Detektion beeinflussen.

Durchführung der Real-Time-PCR

Reaktionsansätze (Mastermix)

Grundsätzlich enthielt die PCR-Mixtur (Gesamtvolumen 25 µL) PCR-Puffer (HotStar Taq master mix), 5 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL bovines Serumalbumin und 5 µL extrahierte DNA aus der zu untersuchenden Stuhlprobe.

Je nach Organismus wurden die zuvor als optimal ermittelten Mengen an Primern und Sonden beigelegt.

Amplifikation, Detektion und Datenauswertung wurden mit Hilfe des „Rotor Gene 6000 real-time Analyzers“ durchgeführt.

Reaktionsablauf

| | | |
|-------------------|------------|-----|
| 15 Minuten 95 °C | | 1x |
| 15 Sekunden 95 °C | Häufigkeit | 50x |
| 30 Sekunden 60 °C | | |
| 30 Sekunden 72 °C | | |

Die erste 15-minütige Phase bei 95°C diente der Denaturierung (Trennung der DNA-Stränge, bis nur noch Einzelstränge vorlagen). Es folgten 50 Zyklen der Primerhybridisierung (Anlagerung der Primer an die DNA) und der Elongation, während der die DNA-Polymerasen die fehlenden Stränge synthetisierten.

Die Fluoreszenz wurde jeweils während der Phase gemessen, in der sich die Primer an den komplementären DNA-Strang legten.

War keine Amplifikationskurve am Bildschirm zu sehen oder zeichnete sie sich erst nach über 40 Zyklen (CT>40) ab, wurde das Ergebnis der RT-PCR wie bei der malaysisch-niederländischen Forschungsgruppe als negativ gewertet.

Um die Kontaminationsfreiheit zu kontrollieren, fügten wir zu jedem Reaktionsansatz als Negativkontrolle Wasser hinzu. Der Durchgang galt als kontaminationsfrei, wenn in dieser Kontrolle keine Amplifikation stattfand.

Im menschlichen Stuhl und vor allem bei Kindern sind abhängig von der Nahrungsaufnahme häufig hemmende Substanzen enthalten, die den DNA-Extraktionsprozess inhibieren können. Um dies zu überwachen, fügten wir während des DNA-Extraktionsvorganges zu jeder Probandenprobe eine interne Inhibitionskontrolle, ein DNA-Fragment des Phocinen Herpesvirus (PhHV-1) hinzu. Wurde diese im späteren PCR-Lauf amplifiziert, konnten wir davon ausgehen, dass es während der DNA-Extraktion zu keiner Inhibition gekommen war.

Um auch eine Inhibition des PCR-Laufs an sich zu kontrollieren, ließen wir in jedem Durchgang Positivkontrollen der einzelnen Organsimen mitlaufen. Erzeugten diese das für sie zuvor bei einem bestimmten Schwellenwert

ermittelte typische Fluoreszenzsignal, war anzunehmen, dass sich unsere einzelnen Reagenzien während des Laufs nicht gegenseitig gehemmt hatten.

3.2.4 Statistische Analysemethoden

Die generierten Daten wurden zweimal in Microsoft Excel, Version 14.0.6129.5003 (2010, Microsoft Corporation), eingegeben. Unstimmigkeiten wurden nach Abstimmung mit den Originaldatenbanken korrigiert. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse jedes Probanden wurden unter einer eigenen ID-Kennnummer zusammengefasst.

Die statistischen Analysen wurden mit Prism 6 für Mac OS X, Version 6.0a, durchgeführt. Für den Methodenvergleich wurden nur Probanden eingeschlossen, von denen je ein MIF-, ein KK- und ein RT-PCR-Ergebnis vorhanden war. War das Ergebnis eines der drei Verfahren positiv, galt der Proband als echt-positiv. Hieraus ergaben sich auch die Prävalenzzahlen der einzelnen Diagnostikmethoden. Wir gingen von einer Spezifität von 100% der drei Verfahren aus, also einem vollständigen Fehlen falsch-positiver Diagnosen.

Die Sensitivität wurde für die RT-PCR, KK und MIF jeweils in Relation zu den anderen Verfahren sowie in Relation zum einem Pseudogoldstandard, der aus der Kombination aller drei Verfahren gebildet wurde, berechnet. Hierbei konnten nur Infektionen mit den Erregern Schistosomen, Hakenwürmer und Askariden verglichen werden. Strongyloidenerkrankungen können weder mit MIF, noch mit KK detektiert werden. Eine Differenzierung der genauen Hakenwurmspezies ist mit der Mikroskopie nicht möglich. Mit der RT-PCR ist eine Unterscheidung grundsätzlich möglich, in unserer Untersuchung wurde jedoch ausschließlich *N. americanus* und nie *A. duodenale* als Hakenwurmspezies nachgewiesen. Im Folgenden ist also mit einem Probanden, der mit der RT-PCR für „Hakenwürmer“ positiv getestet wurde, ein Proband gemeint, der mit der Spezies *N. americanus* infiziert ist.

Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen wurde mit Hilfe der Cohen-Kappa-Statistik nach Landis und Koch von 1977 untersucht und zusätzlich in Prozent angegeben. Werte von κ zwischen 0 und 0,20 sprachen für eine geringe (poor) Übereinstimmung, Werte von 0,21-0,40 für eine ausreichende (fair), 0,41-0,60 für eine mittelmäßige (moderate), 0,61-0,80 für eine beachtliche

(substantial) und Werte von 0,81-1,00 für eine fast vollkommene (almost perfect) Übereinstimmung [106].

Die Detektionsraten der Verfahren wurden zudem mittels des Chi-Quadrattests auf signifikante Unterschiede (p -Wert $<0,05$) analysiert.

Bei Nichtübereinstimmung der Ergebnisse wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnostikverfahren in Bezug auf den PCR-Cycle Threshold und die EPG mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, einem ungepaarten, nicht-parametrischen T-Test, näher untersucht. Statistische Signifikanz war bei p -Werten $<0,05$ gegeben.

Die Eizahlen jedes Probanden wurden als Eier pro Gramm Stuhl (EPG) angegeben. Die Eizahlen der zwei Kato-Katz-Objektträger wurden dafür summiert und mit dem Faktor 24 multipliziert. Mit Hilfe der errechneten Eizahlen ließen sich semiquantitative Aussagen über die Infektionsstärke treffen. Infektionen mit Hakenwürmern und *A. lumbricoides* werden nach den WHO-Richtlinien für STHs in leichte (light), mäßige (moderate) und schwere (heavy) Infektionen eingeteilt [10]. Für Hakenwürmer liegt die Grenze zu einer mäßigen Infektion bei 2000 und zu einer schweren bei über 4000 EPG. Bei Askariden liegt ab 5000 EPG eine mäßige und ab >50.000 EPG eine schwere Infektion vor. Bei einer Schistosomeninfektion liegt laut WHO ab 101 Eiern eine mäßige und bei mehr als 400 EPG eine schwere Infektion vor [107].

Bei 118 Studienteilnehmern, von denen uns sowohl der Wurmstatus des Baseline-Besuchs (V0) als auch das Ergebnis nach der Wurmbehandlung (V1) vorlagen, berechneten wir die Heilungsrate (CR=Cure Rate) und den Rückgang der Eizahl (ERR=Egg reduction rate).

Die Heilungsrate gab die Prozentzahl der Probanden wieder, die vor der Behandlung mit Anthelmintika laut unseres Pseudogoldstandards wurmpositiv waren und nach Behandlung im MIF bzw. RT-PCR-Verfahren negativ waren.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Real-Time-PCR

4.1.1 Optimierung

Damit die Real-Time-PCR unter optimalen Bedingungen ablaufen konnte, wurde das verwendete Protokoll zunächst an die verwendeten Reagenzien und das von uns verwendete PCR-Gerät, die Rotor-Gene 6000 von Corbett Life Science, angepasst.

Hierzu wurden Verdünnungsreihen erstellt, um die optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen zu bestimmen (Abbildung 27). Dabei wurde die kleinstmögliche Konzentrationsmenge angestrebt (kosten- und materialsparend), die noch konsistente Ergebnisse hervorbrachte (Tabelle 8).

Tabelle 8: Einzelne Organismen mit dazugehöriger, als optimal ermittelter, Primerpaar- und Sondenkonzentration

| Zielorganismus | Optimale Konzentrationen |
|-----------------|--|
| PhHV-1 | 200 nM PhHV-1 F/R Primer, 50 nM Cy5-markierte Sonde |
| N. americanus | 80 nM Na F/R Primer, 100 nM FAM-markierte Sonde |
| A. duodenale | 80 nM AD F/R Primer, 100 nM Texas Red-markierte Sonde, (Keine deutliche Amplifikationskurve) |
| A. lumbricoides | 80 nM AL F/R Primer, 100nM YakimaYellow-markierte Sonde |
| S. stercoralis | 200 nM Stro F/R Primer, 100nM Quasar 105-markierte Sonde |
| Schistosomen | 40 nM SSp F/R Primer, 60nM FAM-markierte Sonde |

Bei Cy5, FAM, Texas Red, Yakima Yellow und Quasar 105 handelt es sich um die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Sonden markiert waren.

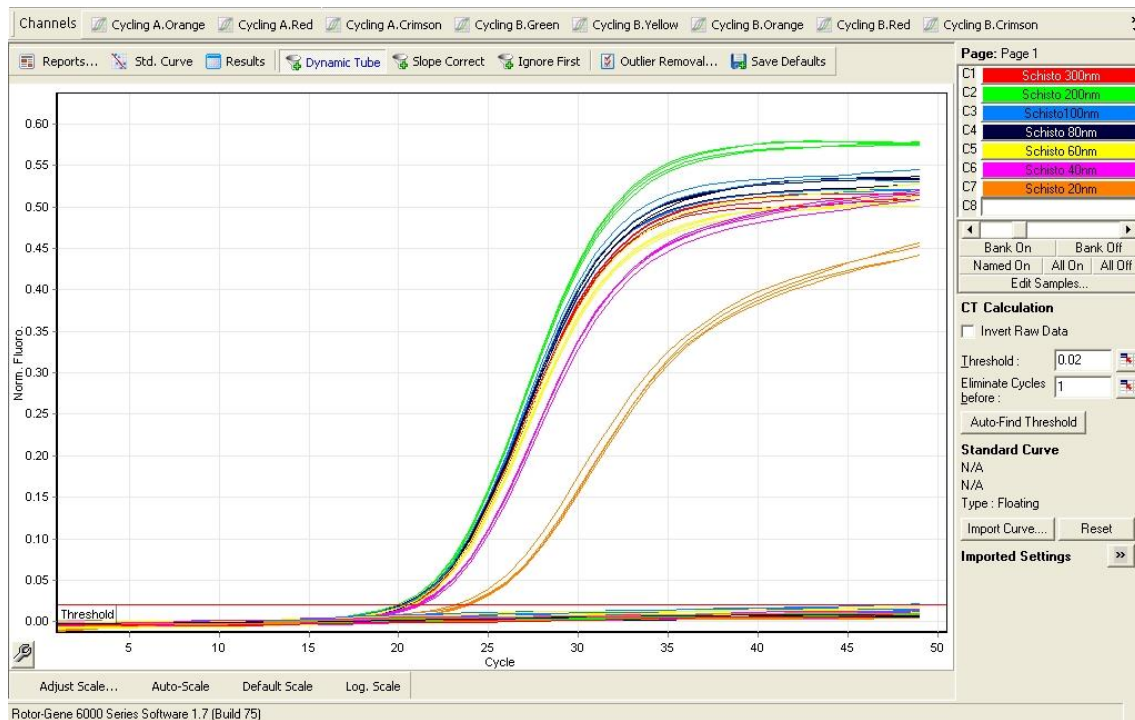


Abbildung 27: Optimierung der Primerkonzentration am Beispiel der Schistosomenprimerpaare. Zu sehen ist das Ausgabefenster im Rotor-Gene 6000 Softwareprogramm: Werden dem Mastermix 40 nM (pinke Linie) des Schistosomenprimerpaares beigelegt, werden Nukleinsäuren von Schistosomen (falls in der Stuhlprobe vorhanden) bei einem Schwellenwertzyklus (Cycle Threshold) von Anfang 20 früh und optimal amplifiziert. Die 40 nm Konzentration ist material- und kostensparend. Höhere Konzentrationen bedeuten mehr Material- und Kostenaufwand bei sehr ähnlichen Ergebnissen.

4.1.2 Qualitätskontrolle durch externes Labor

Um die Qualität unserer Arbeit zu überprüfen, überreichten wir Herrn Dr. Jaco J. Verweij beim IDEA-Workshop „Molecular diagnosis of intestinal parasites“ in Uganda 19 von uns extrahierte DNA-Proben, die er im niederländischen Mikrobiologielabor der Universität Leiden nachuntersuchte, ohne unsere Ergebnisse zu kennen.

Seine Ergebnisse stimmten bei einer CT-Obergrenze von 36 Zyklen zu 100% mit den unseren überein (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: *Externe Qualitätssicherung am mikrobiologischen Labor der Universität Leiden*

| Wurmspezies | NIMR-MMRC und Universität Leiden |
|---------------------------------|---|
| Schistosoma mansoni/haematobium | 89% Übereinstimmung (11 vs. 13 Positive) An der Universität Leiden wurden in zwei weiteren Proben Schistosomen mit einem sehr hohen CT>36 nachgewiesen |
| Ancylostoma duodenale | 100% Übereinstimmung (je 0 Positive) Aber: AD Positivkontrolle gab am NIMR-MMRC keine klare Amplifikationskurve (nur Rauschen) |
| Ascaris lumbricoides | 100% Übereinstimmung (je 3 Positive) |
| Necator americanus | 100% Übereinstimmung (je 6 Positive) |
| Strongyloides stercoralis | 100% Übereinstimmung (je 2 Positive) |
| Negative Proben | 100% Übereinstimmung (je 4 Negative) |

Einige Stuhlproben untersuchten wir im Rahmen des Optimierungsprozesses der Real-Time-PCR mit der konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese nach. Die Ergebnisse der beiden molekulardiagnostischen Verfahren stimmten ausnahmslos überein.

4.2 Evaluierung der Real-Time-PCR

4.2.1 Untersuchtes Studienkollektiv

Von den ursprünglich zum Zeitpunkt unserer Untersuchung 289 registrierten WHIS-Teilnehmern untersuchten wir zunächst 179 kryopreservierte Baseline-Stuhlproben mit der RT-PCR und verglichen die Ergebnisse anschließend mit denen der MIF-Mikroskopie.

Da die Ergebnisse der MIF-Mikroskopie nicht ausreichend aussagekräftig waren, verglichen wir die RT-PCR-Ergebnisse zusätzlich mit den im Rahmen von EMINI mit der Kato-Katz-Methode erhobenen Ergebnissen aus ein bis vier Monate älteren Stuhlproben derselben 179 Probanden.

Bei 50 der 179 untersuchten WHIS-Stuhlproben lag zudem ein KK-Ergebnis aus derselben Stuhlprobe vor, welches wir ebenfalls mit dem RT-PCR-Ergebnis verglichen.

Tabelle 10: Anzahl der für die RT-PCR eingefrorenen Stuhlproben der 298 WHIS-Teilnehmer und Infektionsstatus dieser

| | Fallzahl | HIV-Status | Wurmstatus |
|--------------|----------------|-------------|-------------|
| | 36/44 | Negativ (-) | Negativ (-) |
| | 96/154 | Negativ (-) | Positiv (+) |
| | 14/49 | Positiv (+) | Negativ (-) |
| | 33/51 | Positiv (+) | Positiv (+) |
| Total | 179/298 | | |

Wurmstatus nach Pseudogoldstandard. Diesen legten wir als Kombination der Ergebnisse von KK, MIF und RT-PCR fest. Ein Proband galt als negativ, wenn keine Infektion mit Hakenwürmern, Schistosomen oder Askariden vorlag, da diese Erreger von allen Verfahren detektiert werden konnten und somit ein Vergleich möglich war.

Bei 118 der 179 Probanden untersuchten wir außerdem eine zweite eingefrorene Stuhlprobe aus dem Nachbehandlungsbesuch V1, die etwa sechs Wochen nach der ersten Stuhlprobe gesammelt wurde. Da alle Probanden nach dem ersten Besuch mit einer Einmaldosis Albendazol gegen intestinale Nematoden und einer Einmaldosis Praziquantel gegen Schistosomen behandelt wurden, spiegeln die Ergebnisse dieser untersuchten Stuhlproben die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente wieder.

Vier weitere eingefrorene Proben konnten nicht in die Studie einbezogen werden, da die Stuhlproben zu dunkel oder zu flüssig waren, um eine mikroskopische Untersuchung durchzuführen.

Unter den 179 Probanden befanden sich 103 Frauen und 76 Männer, die jeweils zwischen 18 und 61 Jahren alt waren. Laut WHO-Richtlinien lag bei fast allen Teilnehmern eine leichte Infektion vor. Sechs Probanden wiesen mäßige Askarideninfektionen mit mehr als 5000 EPG auf. Es wurde keine ausgeprägte STH-Infektion gefunden (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: *Vorliegende Infektionsstärke bei unseren Probanden nach WHO-Kriterien*

| Wurmspezies | Eier pro Gramm Stuhl (Mittelwert) | Eier pro Gramm Stuhl (Median) | Infektionsstärke laut WHO |
|--------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Hakenwürmer | 242,6 | 108 | Leicht (low) |
| Askariden | 2687,8 | 1367 | Leicht (low) |
| Schistosomen | 120,4 | 48 | Leicht (low) |

4.2.2 Vergleich von Mikroskopie und Real-Time-PCR

Die in den PCR-Läufen eingesetzten Kontrollen verhielten sich bis auf die Positivkontrolle für *Ancylostoma duodenale* normgerecht. Diese zeigte keine deutliche Amplifikationskurve. Die anderen Positivkontrollen zeigten die erwarteten Amplifikationskurven. In der Negativkontrolle H₂O wurde keine DNA amplifiziert. Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn eine der

Diagnostikmethoden einen der gesuchten Organismen nachweisen konnte. Hierzu zählten: Schistosomen, *Ascaris lumbricoides* und Hakenwürmer.

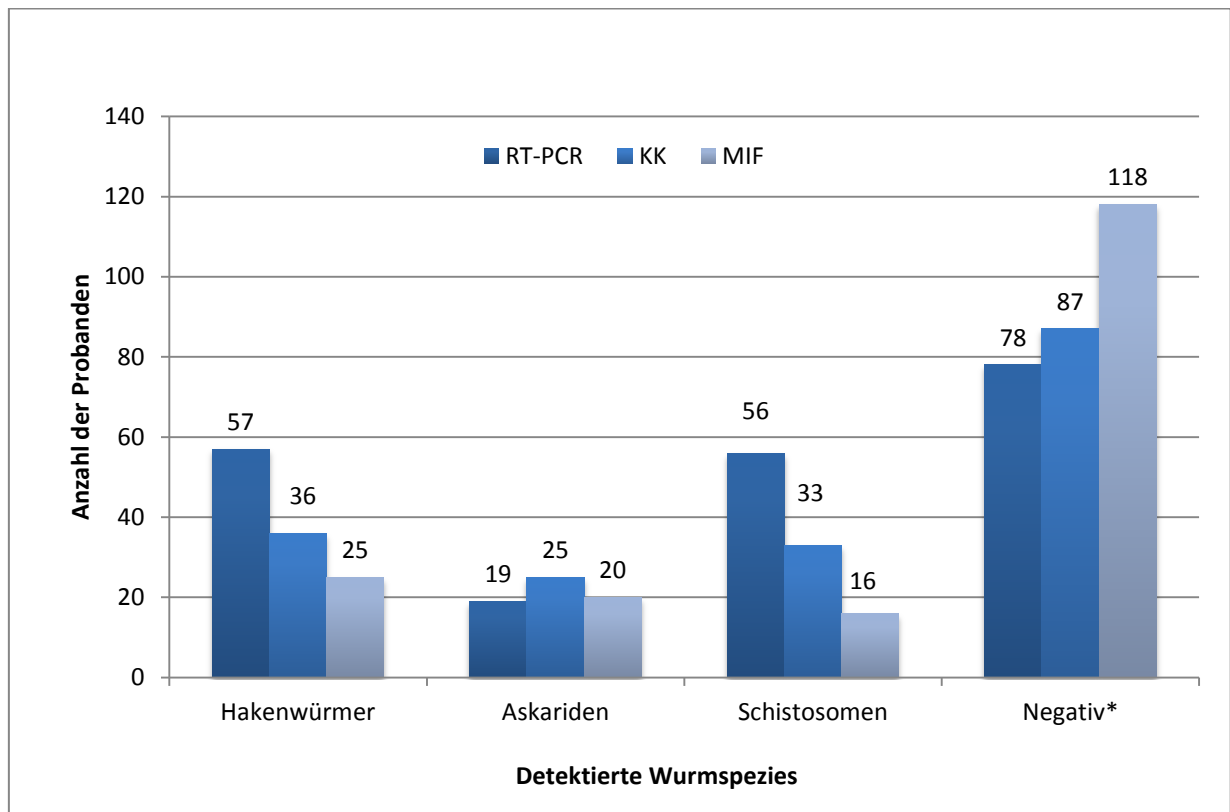


Abbildung 28: Mit den drei angewandten Verfahren detektierte Wurmspezies im Vergleich

Die Abbildung zeigt wie viele Probanden (y-Achse) für die in der x-Achse dargestellten Wurmspezies positiv getestet wurden. Hierbei wird zwischen den drei Untersuchungsverfahren (siehe Legende) unterschieden. Die MIF- und RT-PCR-Ergebnisse stammen aus derselben Stuhlprobe. Das KK-Ergebnis von durchschnittlich 74 Tage älteren Stuhlproben derselben Probanden. * Wurde keine der drei Spezies detektiert, galt der Proband als negativ.

4.2.2.1 Diagnostische Sensitivität und Übereinstimmung der Verfahren

Die RT-PCR detektierte bei den 179 untersuchten Probanden in 31,8% Hakenwürmer (*N. americanus*), in 10,6% Askariden und in 31,3% Schistosomen. 43,6% der Stuhlproben wurden negativ getestet (keine der drei zuvor genannten Erreger wurde gefunden). Zusätzlich wies die RT-PCR in 3,4% Strongyloideninfektionen nach, die mit den angewandten

Mikroskopietechniken technisch nicht nachzuweisen waren. Die MIF-Mikroskopie fand in 13,9% der Proben Hakenwürmer, in 11,1% Askariden, in 8,9 % Schistosomen und in 65,9% keinen der drei genannten Erreger; die KK-Mikroskopie in 20,1%, 14%, 18,4% und 48,6%.

Die Ergebnisse der Abbildungen 28 und 29 zeigen, dass die RT-PCR Hakenwürmer und Schistosomen mit einer höheren Sensitivität als das MIF- und das KK-Verfahren detektierte. Die Sensitivität bei der Detektion von Askarideninfektionen fiel bei der RT-PCR hingegen geringer aus. Die Sensitivität der RT-PCR betrug bei den 179 auf Hakenwürmer, Askariden und Schistosomen untersuchten Probanden gemessen am Pseudogoldstandard 83,6%, 51,4% und 82,6%. Die Sensitivität der MIF-Mikroskopie betrug 37,3%, 54,1%, 23,2% und die Sensitivität der KK-Mikroskopie 53,7%, 67,6% und 47,8% (Abbildung 29).

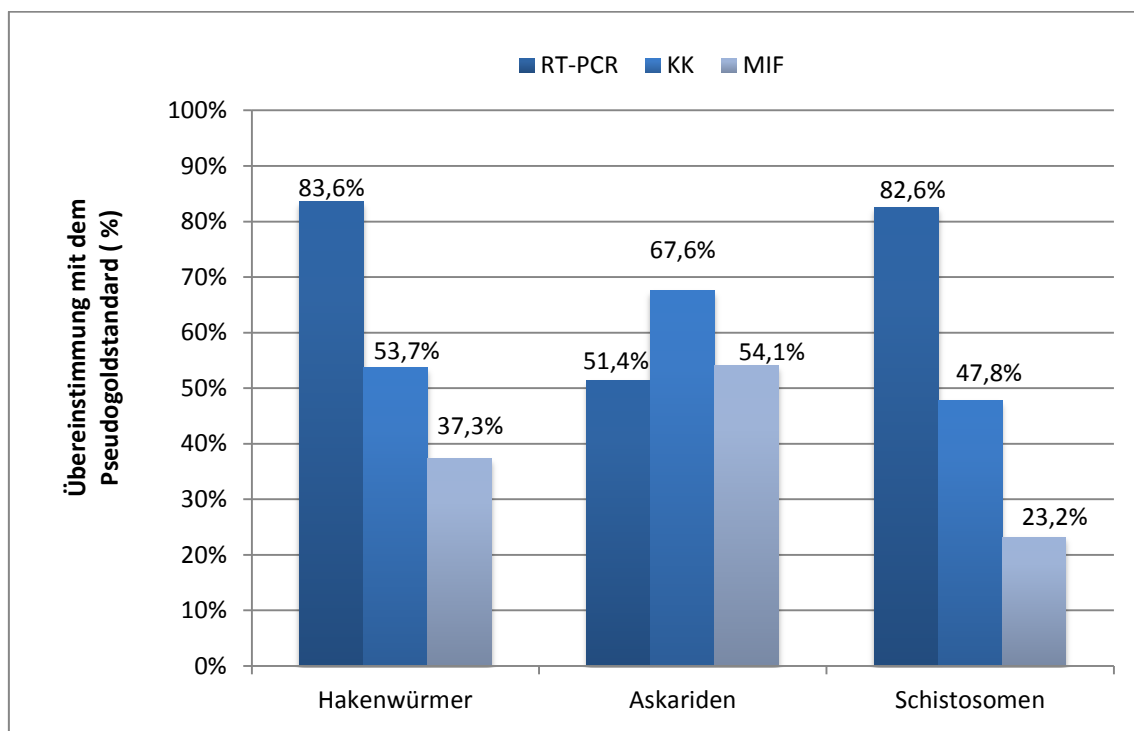


Abbildung 29: Übereinstimmung der verschiedenen Verfahren mit dem Pseudogoldstandard

Gezeigt wird die jeweilige Übereinstimmung von RT-PCR, KK und MIF für die einzelnen Wurmspezies (x-Achse) mit dem Pseudogoldstandard (y-Achse). Dieser wurde als Kombination der Ergebnisse aller drei Verfahren festgelegt.

Das MIF-Mikroskopieverfahren detektierte insgesamt 61 Wurminfektionen. In 46 Fällen konnten diese mit der RT-PCR bestätigt werden. In 15 Fällen nicht. Das KK-Mikroskopieverfahren, was an ein bis vier Monate älteren Stuhlproben derselben Probanden angewandt wurde, detektierte 94 Wurminfektionen. Die RT-PCR konnte davon 62 bestätigen, 32 nicht.

Die Übereinstimmung zwischen den Methoden unterschied sich demnach deutlich für alle Wurmspezies (Abbildungen 28 u. 29, Tabellen 15-17).

Die RT-PCR wies im Vergleich mit der MIF-Mikroskopie 86 zusätzliche Infektionen und im Vergleich mit den KK-Ergebnissen 70 zusätzliche Wurminfektionen nach. Also 2,2 mal mehr Infektionen als MIF und 1,4 mal mehr als KK.

Die RT-PCR bestätigte ca. 70% der durch die Mikroskopie als echt-positiv deklarierten Proben.

Die mit Hilfe der Cohen-Kappa-Statistik ermittelte Übereinstimmung zwischen der RT-PCR und MIF war sehr gering bei der Hakenwurm- ($\kappa=0,02$) Askariden- und Schistosomendetektion (κ -Werte von je 0,01). Die Übereinstimmung zwischen RT-PCR und KK war hingegen bei der Hakenwurmdetektion immerhin mittelmäßig ($\kappa=0,53$), bei der Schistosomendetektion ($\kappa=0,39$) und bei der Askaridendetektion jedoch nur ausreichend (fair) mit ($\kappa=0,33$).

Tabelle 12: Übereinstimmung der einzelnen Testverfahren mit Hilfe der Cohen-Kappa-Statistik (%)

| | RT-PCR und MIF | RT-PCR und KK | KK und MIF |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Hakenwürmer | $\kappa=0,02$ (76,5%) | $\kappa=0,53$ (81,6%) | $\kappa=0,44$ (83,8%) |
| Askariden | $\kappa=0,01$ (93,9%) | $\kappa=0,33$ (85,5%) | $\kappa=0,41$ (87,2%) |
| Schistosomen | $\kappa=0,01$ (73,2%) | $\kappa=0,39$ (76,0%) | $\kappa=0,33$ (83,8%) |

* Wurden keine der drei obigen Spezies detektiert, galt der Proband als negativ, auch wenn er zusätzlich mit *Trichuris* oder *Strongyloides* infiziert war.

Die Detektionsraten von MIF und RT-PCR unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$). Die von KK und RT-PCR nicht (Tabellen 13 und 14).

Tabelle 13: *Chi-Quadrattest: Statistische Analyse der unterschiedlichen Detektionsraten von Real-Time-PCR und dem parasitologischen Mikroskopieverfahren KK für N. americanus, A. lumbricoides und Schistosomen*

| Angewandtes Verfahren | N | Positivfrequenz (%) | Negativfrequenz (%) | χ^2 -Wert | p-Wert |
|-----------------------|-----|---------------------|---------------------|----------------|--------|
| KK-Mikroskopie | 179 | 92 (51,4) | 87 (48,6) | 0,911 | 0,340 |
| RT-PCR | | 101 (56,4) | 78 (43,6) | | |

Tabelle 14: *Chi-Quadrattest: Statistische Analyse der unterschiedlichen Detektionsraten von Real-Time-PCR und dem parasitologischen Mikroskopieverfahren MIF für N. americanus, A. lumbricoides und Schistosomen*

| Angewandtes Verfahren | N | Positivfrequenz (%) | Negativfrequenz (%) | χ^2 -Wert | p-Wert |
|-----------------------|-----|---------------------|---------------------|----------------|--------|
| MIF-Mikroskopie | 179 | 61 (34,1) | 118 (65,9) | 18,040 | <0,001 |
| RT-PCR | | 101 (56,4) | 78 (43,6) | | |

Tabelle 15: Übereinstimmung zwischen KK und RT-PCR

| | | | RT-PCR | | |
|-----------|--------------|-------|-----------|------|-----------|
| | | | Pos. | Neg. | Total |
| KK | Hakenwürmer | Pos. | 30 | 6 | 36 |
| | | Neg. | 27 | 116 | 143 |
| | | Total | 57 | 122 | 179 |
| | Askariden | Pos. | 9 | 16 | 25 |
| | | Neg. | 10 | 144 | 154 |
| | | Total | 19 | 160 | 179 |
| | Schistosomen | Pos | 23 | 10 | 33 |
| | | Neg. | 33 | 113 | 146 |
| | | Total | 56 | 123 | 179 |

Die Kontingenztafel zeigt die Übereinstimmung zwischen dem KK-Mikroskopieverfahren und der RT-PCR bei der Diagnostik von Hakenwürmern, Askariden und Schistosomeninfektionen in 179 Stuhlproben aus der Region Mbeya in Tansania, 2010/11. In der RT-PCR wurde immer die Hakenwurmspezies *N. americanus* nachgewiesen. Mit den Mikroskopieverfahren ist keine Differenzierung der Hakenwurmspezies möglich.

Tabelle 16: Übereinstimmung zwischen MIF und RT-PCR

| | | | RT-PCR | | |
|------------|--------------|-------|-----------|------|-----------|
| | | | Pos. | Neg. | Total |
| MIF | Hakenwürmer | Pos. | 20 | 5 | 25 |
| | | Neg. | 37 | 117 | 154 |
| | | Total | 57 | 122 | 179 |
| | Askariden | Pos. | 14 | 6 | 20 |
| | | Neg. | 5 | 154 | 159 |
| | | Total | 19 | 160 | 179 |
| | Schistosomen | Pos. | 12 | 4 | 16 |
| | | Neg. | 44 | 119 | 163 |
| | | Total | 56 | 123 | 179 |

Die Kontingenztafel zeigt die Übereinstimmung zwischen dem MIF-Mikroskopieverfahren und der RT-PCR bei der Diagnostik von Hakenwürmern, Askariden und Schistosomeninfektionen in 179 Stuhlproben aus der Region Mbeya in Tansania, 2010/11. In der RT-PCR wurde immer die Hakenwurmspezies *N. americanus* nachgewiesen. Mit den Mikroskopieverfahren ist keine Differenzierung der Hakenwurmspezies möglich.

Tabelle 17: Übereinstimmung von MIF und KK

| | | | KK | | |
|------------|--------------|-------|-----------|------|-----------|
| | | | Pos. | Neg. | Total |
| MIF | Hakenwürmer | Pos. | 16 | 9 | 25 |
| | | Neg. | 20 | 134 | 154 |
| | | Total | 36 | 143 | 179 |
| | Askariden | Pos. | 11 | 9 | 20 |
| | | Neg. | 14 | 145 | 159 |
| | | Total | 25 | 154 | 179 |
| | Schistosomen | Pos. | 10 | 6 | 16 |
| | | Neg. | 23 | 140 | 163 |
| | | Total | 33 | 146 | 179 |

Die Kontingenztafel zeigt die Übereinstimmung zwischen dem MIF- und dem KK- Mikroskopieverfahren bei der Diagnostik von Hakenwürmern, Askariden und Schistosomeninfektionen in 179 Stuhlproben aus der Region Mbeya in Tansania, 2010/11. Mit den Mikroskopieverfahren ist keine weitere Differenzierung der Hakenwurmspezies möglich.

Die folgende Tabelle 18 gibt Infektionsfälle wider, die wir ohne die einzelnen Verfahren nicht detektiert hätten.

Tabelle 18: *Infektionen, die ohne bestimmte Verfahren übersehen worden wären*

| | ohne RT-PCR | ohne MIF | ohne KK |
|----------------------|-------------|----------|---------|
| Hakenwürmer | 22 | 4 | 6 |
| Ascaris lumbricoides | 4 | 3 | 13 |
| Schistosomen | 30 | 3 | 9 |
| Strongyloides | 6 | 0 | 0 |
| Gesamt | 66 | 10 | 28 |

Anzahl an Infektionen, die uns ohne die einzelnen Verfahren entgangen wären. Die Zahlen beziehen sich auf den Vergleich zwischen den WHIS-RT-PCR, WHIS-MIF und EMINI-KK-Ergebnissen (Pseudogoldstandard).

Vergleich von WHIS RT-PCR und WHIS-KK anhand von 50 Stuhlproben

50 der 179 untersuchten WHIS-Stuhlproben wurden sowohl mit MIF, als auch mit KK untersucht.

In der folgenden Abbildung 30 sind die KK- und RT-PCR-Ergebnisse aus derselben WHIS-Stuhlprobe gegenübergestellt.

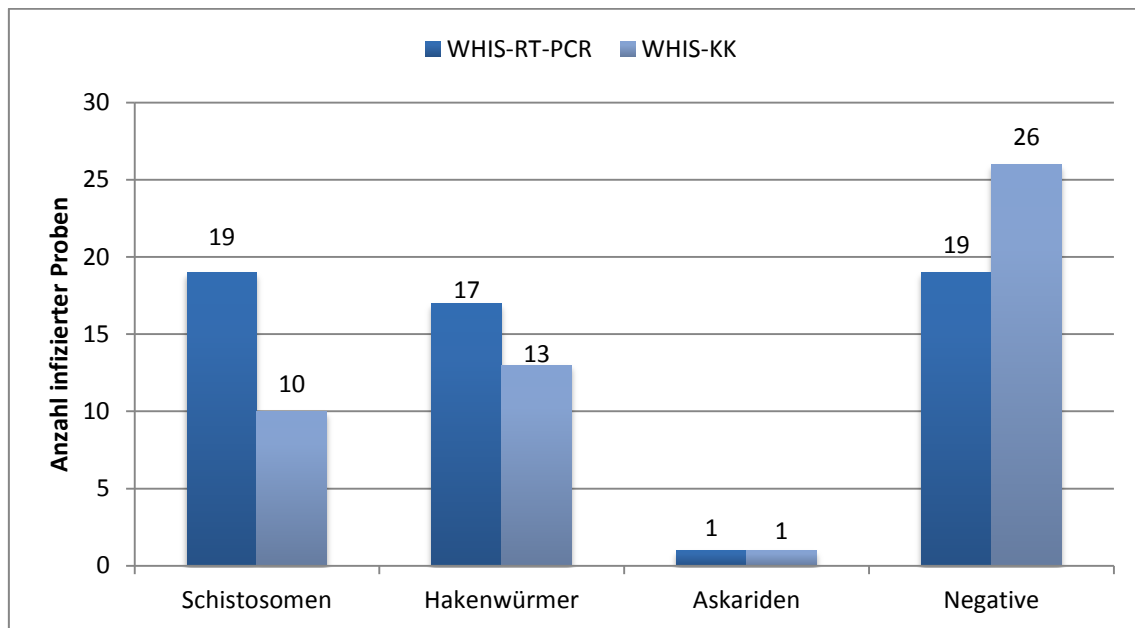


Abbildung 30: Von 50 WHIS-Baseline-Stuhlproben ausgehender Vergleich der RT-PCR- und KK-Ergebnisse. Auf der x-Achse ist die Wurmspezies, auf der y-Achse die Anzahl infizierter Proben dargestellt.

Eine Übereinstimmung der Diagnostikverfahren lag im Falle einer Schistosomeninfektion bei 80%, bei einer Hakenwurminfektion bei 76% und bei einer Askarideninfektion bei 100%.

Die RT-PCR detektierte acht zusätzliche Schistosomen- und zehn zusätzliche Hakenwurminfektionen mit *N. americanus*. Die KK-Methode 4 weitere Schistosomeninfektionen und eine zusätzliche Hakenwurminfektion (Tabelle 19).

Tabelle 19: *Zusätzlich detektierte Infektionen*

| | Hakenwürmer | Askariden | Schistosomen | Negative |
|--------|--------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| RT-PCR | 10 | 0 | 8 | 4 |
| KK | 1 | 0 | 4 | 11 |

Dargestellt ist die Anzahl an zusätzlich detektierten Wurminfektionen bei 50 WHIS-Probanden, die entweder nur von der RT-PCR oder nur mit Hilfe des KK-Verfahrens detektiert wurden.

4.2.2.2 Einfluss der Eizahl auf die Detektierbarkeit

In Stuhlproben, in denen nur die KK-Mikroskopie, nicht aber die RT-PCR, Schistosomen nachweisen konnte, waren die gezählten EPG signifikant ($p=0,0072$) niedriger als in Proben, in denen beide Verfahren den Erreger detektieren konnten (Abbildung 31). Auch für Askariden- und Hakenwurminfektionen zeigte sich diese Tendenz deutlich, war jedoch nicht signifikant. Dasselbe traf für die MIF-Mikroskopie zu.

Askarideninfektionen, die nur von der MIF-Mikroskopie, nicht aber von der RT-PCR detektiert wurden hatten im Durchschnitt 368 EPG. Die in beiden Verfahren detektierten Infektionen hingegen 1542 EPG (p -Wert: 0,3411). Allein in der MIF-Mikroskopie detektierte Hakenwurminfektionen hatten durchschnittlich 84 EPGs, im Gegensatz zu 288 EPGs in gemeinsam detektierten Proben (p -Wert: 0,0846). Nur in der MIF-Mikroskopie detektierte Schistosomeninfektionen hatten durchschnittlich 42 EPGs, im Gegensatz zu 74 EPGs in gemeinsam detektierten Proben (p -Wert: 0,2978).

Ausschließlich in der KK-Mikroskopie detektierte Schistosomen-, Hakenwurm- und Askarideninfektionen hatten durchschnittlich 54 EPGs, 98 EPGs und 1964 EPGs, im Gegensatz zu 145 EPGs, 445 EPGs und 5787 EPGs in gemeinsam detektierten Proben (p -Werte: 0,0072; 0,0683 und 0,0816).

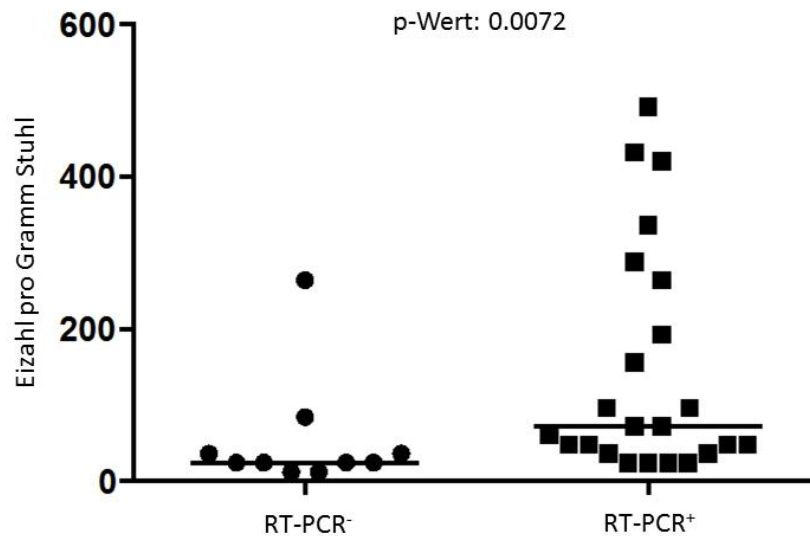


Abbildung 31: Die Detektion von Schistosomen-DNA in der RT-PCR geht mit höheren Schistosomeneizahlen in der KK-Mikroskopie einher

Gezeigt ist ein Vergleich der Eizahl pro Gramm Stuhl (y- Achse) von Proben, die nur mit der KK-Mikroskopie positiv getestet wurden (RT-PCR⁻; Median: 24), mit Proben, die sowohl mit KK als auch mit der RT-PCR positiv getestet wurden (RT-PCR⁺; Median: 72). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.2.2.3 Korrelation zwischen CT-Wert und Mikroskopieergebnis

Wie zuvor bei Verweij et al. beschrieben [8], ging ein niedriger PCR-Cycle Threshold (CT) tendenziell mit einer höheren Eizahl und damit größeren Mengen parasitärer DNA einher und umgekehrt. Die CT-Werte korrelierten teilweise signifikant mit der Eizahl pro Gramm Stuhl und zeigten in den anderen Fällen zumindest eine Tendenz in diese Richtung. Die nur in der RT-PCR positiven Hakenwurminfektionen wiesen einen signifikant höheren CT-Wert (i.e. niedrige DNA Menge) auf (p-Wert: 0,0082), was die hohe Sensitivität der RT-PCR bei leichten Infektionen unterstreicht, die mit der MIF- und Kato-Katz-Methode übersehen wurden (siehe Abbildungen 32 und 33).

Auch im Falle der allein in der RT-PCR Schistosomen-positiven Proben lag der CT signifikant höher (p-Wert: 0,0003) als bei den von der KK-Mikroskopie detektieren Proben (Abbildung 35) oder zeigte eine Tendenz in diese Richtung wie bei der MIF-Mikroskopie (Abbildung 34). Bei den Askarideninfektionen verhielt es sich entgegengesetzt. Infektionen, die lediglich von der RT-PCR detektiert wurden, wiesen einen niedrigeren CT-Wert (i.e. hohe DNA-Menge) als die MIF-Mikroskopie mit einem Median von 29,43 vs. 30,97 und der KK-Mikroskopie mit einem Median von 30,29 vs. 30,8 auf.

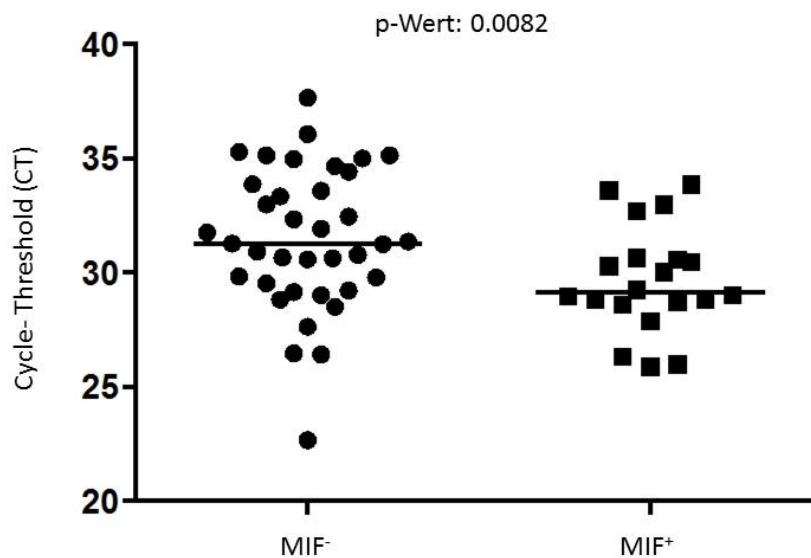


Abbildung 32: Die Detektion von Hakenwurmeiern mit der MIF-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher

Gezeigt ist ein Vergleich der CT-Werte (y-Achse) von Proben, die nur mit der RT-PCR positiv getestet wurden (MIF⁻; Median: 31,27), mit Proben, die sowohl mit MIF als auch mit der RT-PCR positiv getestet wurden (MIF⁺; Median: 29,15). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

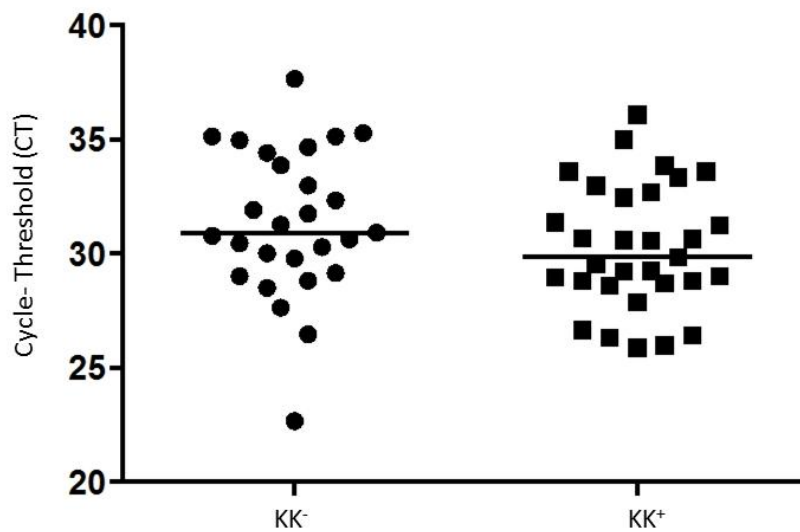


Abbildung 33: Die Detektion von Hakenwurmeiern mit der KK-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher

Gezeigt ist ein Vergleich der CT-Werte (y-Achse) von Proben, die nur mit der RT-PCR positiv getestet wurden (KK^- ; Median:), mit Proben, die sowohl mit KK als auch mit der RT-PCR positiv getestet wurden (KK^+ ; Median:). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

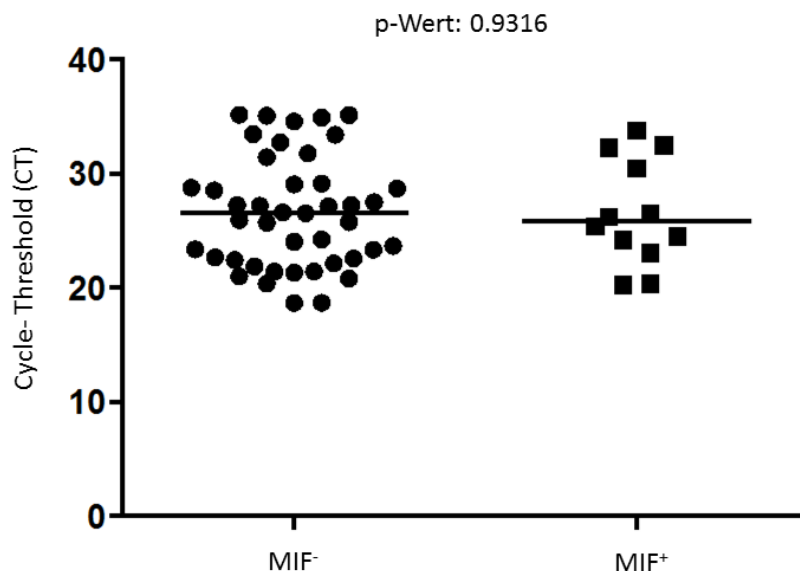


Abbildung 34: Die Detektion von Schistosomeneiern mit der MIF-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher

Gezeigt ist ein Vergleich der CT-Werte (y-Achse) von Proben, die nur mit der RT-PCR positiv getestet wurden (MIF^- ; Median: 26,54) mit Proben, die sowohl mit MIF als auch mit der RT-PCR positiv getestet wurden (MIF^+ ; Median: 25,83). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

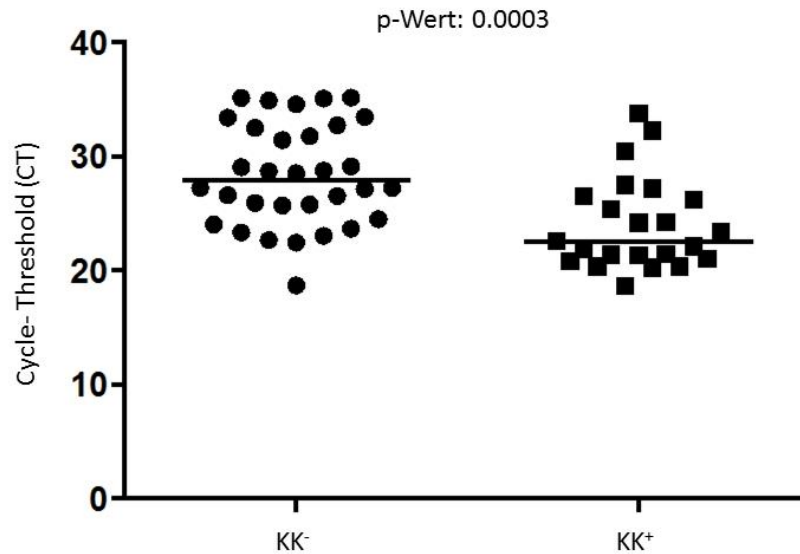


Abbildung 35: Die Detektion von Schistosomeneiern mit der KK-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher

Gezeigt ist ein Vergleich der CT-Werte (y-Achse) von Proben, die nur mit der RT-PCR positiv getestet wurden (KK^- ; Median: 27,89) mit Proben, die sowohl mit KK als auch mit der RT-PCR positiv getestet wurden (KK^+ ; Median: 22,57). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.3 Mehrfachinfektionen

Die Real-Time-PCR war in 56,4% der 179 untersuchten Stuhlproben positiv für einen der gesuchten Helminthen. In 30 Fällen wurden Mehrfachinfektionen mit mindestens zwei Erregern detektiert.

Die Mikroskopie nach dem MIF-Verfahren aus denselben Stuhlproben war nur in 34,1% von 179 untersuchten Stuhlproben positiv. Es wurden keine Mehrfachinfektionen detektiert.

Die Mikroskopie nach dem Kato-Katz-Verfahren aus im Durchschnitt bis zu 74 Tage älteren Stuhlproben derselben Probanden war in 51,4% von 179 untersuchten Stuhlproben positiv. In zwei Fällen wurden Mehrfachinfektionen mit zwei Erregern detektiert. In Abbildung 36 ist dies grafisch dargestellt.

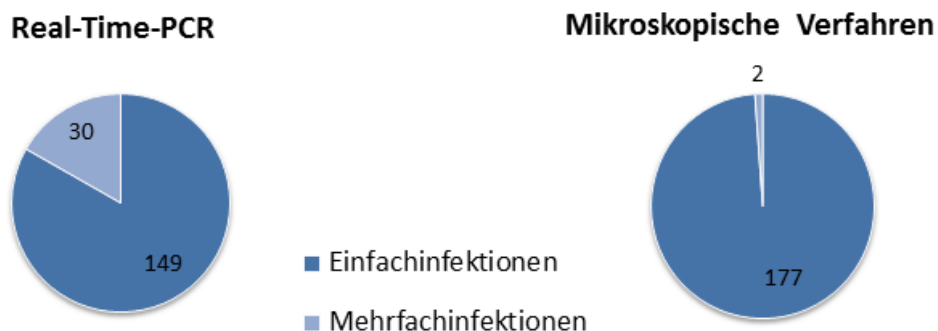


Abbildung 36: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus in RT-PCR und Mikroskopie ohne Berücksichtigung von *Trichuris trichuria* (drei weitere Koinfektionen in Mikroskopie).

Tabelle 20: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus bei den Probanden nach RT-PCR-Ergebnis (n=179)

| Anzahl der Wurm��pezies nach RT-PCR-Ergebnis | Absolute Anzahl an Probanden (n) | Anteil der Probanden in Prozent (%) |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| 0 Wurm��pezies | 76 | 42,5 |
| 1 Wurm��pezies | 73 | 40,8 |
| 2 Wurm��pezies | 26 | 14,5 |
| 3 Wurm��pezies | 4 | 2,2 |

Bei etwa 17% der untersuchten Probanden lag ein Polyparasitismus vor. Dabei waren Infektionen mit zwei Wurm��pezies zur selben Zeit am häufigsten. Bei 20 von 30 Mehrfachinfektionen lag die Kombination *Necator americanus* + Schistosomen vor. Bezog man auch die Kato-Katz- sowie MIF-Mikroskopie-Ergebnisse ein, die zusätzlich Infektionen mit *Trichuris trichuria* anzeigten, so ergaben sich folgende Mehrfachinfektionen bei unseren Probanden:

Tabelle 21: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus bei den Probanden (n=179) nach Pseudogoldstandardergebnis (inklusive *Trichuris trichuria*)

| Anzahl der Wurm��pezies nach Pseudogoldstandard-ergebnis | Absolute Anzahl an Probanden (n) | Anteil der Probanden in Prozent (%) |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| 0 Wurm��pezies | 41 | 22,9 |
| 1 Wurm��pezies | 82 | 45,8 |
| 2 Wurm��pezies | 42 | 23,5 |
| 3 Wurm��pezies | 14 | 7,8 |

Aufgliederung der Mehrfachinfektionen

Bei 21% der Mehrfachinfizierten wurde zusätzlich eine HIV-Infektion detektiert.

4.4 Behandlungserfolge

Zur Bestimmung der Medikamentenwirksamkeit wurden 118 der 179 Probandenstühle, von denen jeweils das MIF-Mikroskopieergebnis vor und nach Behandlung bekannt war, mit der RT-PCR-Methode nachuntersucht. Eine Probe galt als wurmpositiv, wenn eines der beiden Verfahren einen Erreger nachweisen konnte.

15 Probanden waren nach der Behandlung mit einer Einmaldosis Albendazol und einer Einmaldosis Praziquantel noch immer wurmpositiv (Tabelle 22).

Die Heilungsraten (Cure Rates) betrugen 75,61% für Hakenwurminfektionen, 100% für Askarideninfektionen, 75% für Strongyloideninfektionen und 90,5% für Schistosomeninfektionen. Die Behandlungserfolge samt Cure Rate und vergleichenden Werten aus der Literatur werden in Tabelle 23 dargestellt. Wie erwartet waren die EPG im Vergleich zum Vorbesuch gesunken.

Tabelle 22: *Persistierende Infektionsfälle nach Behandlung*

| | |
|---------------------------|---|
| Hakenwürmer | 10 persistierende Infektionen (davon ein Proband HIV-pos.) |
| Schistosomen | 4 persistierende Infektionen (davon ein Proband HIV-pos.) |
| Strongyloides stercoralis | eine persistierende Infektion |
| Ascaris lumbricoides | eine neu aufgetretene Infektion (Pat. HIV-pos.) |

Bei 103 Probanden war die medizinische Therapie demnach erfolgreich.

Mit dem MIF-Verfahren wurden nur vier der fünfzehn persistierenden Infektionen detektiert. Acht Hakenwurminfektionen blieben mikroskopisch unerkannt, davon vier, die auch schon vor der Behandlung nicht detektiert wurden und vier, die vor der Behandlung eine sehr niedrige Eizahl aufwiesen (2-15 EPG). Außerdem konnte die Mikroskopie zwei Schistosomeninfektionen nicht nachweisen, die auch vor der Behandlung nicht entdeckt wurden.

Tabelle 23: *Behandlungserfolge nach einer Einzaldosis Albendazol + Praziquantel*

| Wurmspezies | Prävalenz vor Behandlung (V0) | Prävalenz nach Behandlung (V1) | Heilungsraten | Heilungsraten in der Literatur |
|-----------------|--|---|---------------|-----------------------------------|
| Hakenwürmer | 41 | 10 | 75,61% | 72% (95% CI, 59%-81%)[108] |
| A. lumbricoides | 16 | 0 | 100% | 88% (95% CI, 79%-93%)[108] |
| S. stercoralis | 4 | 1 | 75% | 78.7% [109] |
| Schistosomen | 42 | 4 | 90,50% | 92,90% [110] |

Abkürzungen: VO: 1. Besuch im Rahmen der WHIS-Studie (Stuhluntersuchung und Gabe von Albendazol + Praziquantel); V1: 2. Besuch im Rahmen der WHIS-Studie (erneute Stuhluntersuchung ca. 6 Wochen nach Behandlung)

4.5 Helminthen-HIV-Koinfektion

Unter den 179 untersuchten Probanden befanden sich 47 HIV-positive Personen zwischen 19 und 61 Jahren, darunter 18 Männer und 29 Frauen. 33 dieser Probanden waren gleichzeitig mit einer oder mehreren Wurm��pezies koinfiziert (Tabelle 10 u. Abbildung 37). Bei allen Koinfizierten lagen laut WHO-Richtwerten leichte Infektionen vor. Polyparasitismus trat bei HIV-Positiven (37% Mischinfektionen) nicht häufiger als bei HIV-Negativen (43% Mischinfektionen) auf.

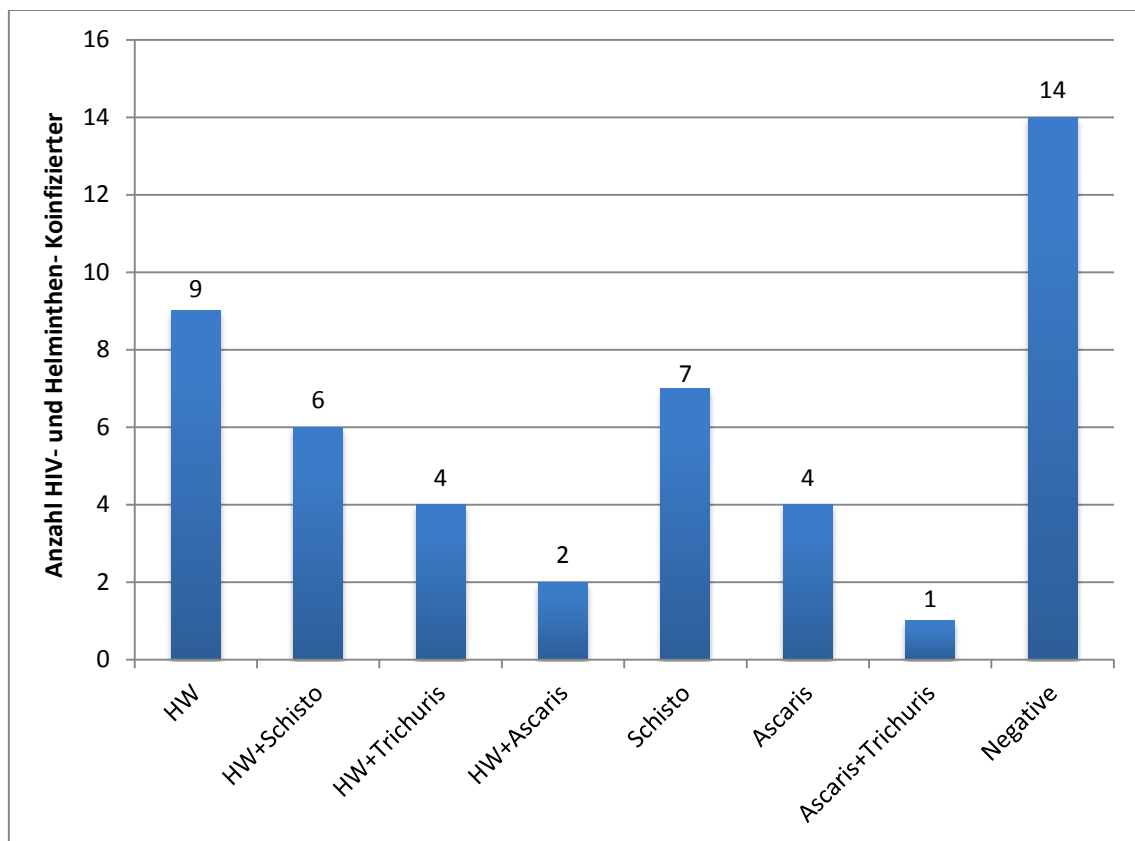


Abbildung 37: Erregerspektrum der 47 HIV-positiven Probanden

Die y-Achse gibt die Zahl der Probanden wieder, die neben einer HIV-Infektion mit einem oder mehreren Erregern (x-Achse) koinfiziert sind. HW=Hakenwürmer, Schisto=Schistosomen, Trichuris=Trichuris trichuria, Ascaris=Ascaris lumbricoides, Negative: mit keinem der vorher genannten Erreger infiziert; Infektionsstatus nach Pseudogoldstandard (Kombination der RT-PCR, KK- und MIF- Ergebnisse)

Der mittlere CT-Wert der HIV-Schistosomen-Koinfizierten lag mit 25,8 etwas niedriger als bei den Schistosomen-Positiven, aber HIV-Negativen (CT: 26,4) (Abbildung 38). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p-Wert: 0,682). Die durchschnittliche Eizahl pro Gramm Stuhl bei den 13 HIV-Schistosomen-koinfizierten betrug 107,5, während sie bei den 39 HIV-negativen, aber Schistosomen-positiven Probanden bei 102,3 lag.

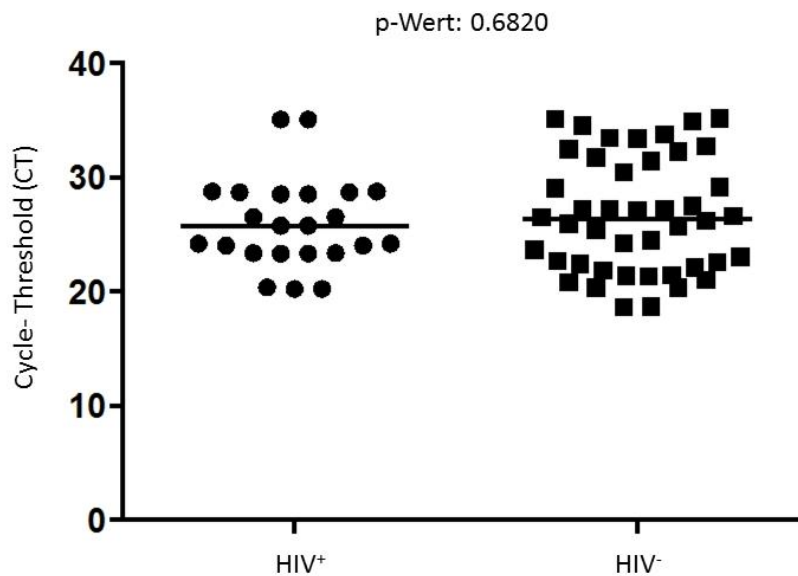


Abbildung 38: Bei Schistosomeninfektionen korreliert der CT-Wert nicht mit dem HIV-Infektionsstatus

Gezeigt ist ein Vergleich der CT-Werte HIV-positiver (HIV^+ ; Median: 25,78) und HIV-negativer (HIV^- ; Median: 26,39) Probanden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

- Die RT-PCR sowie die DNA-Extraktion aus Stuhlproben konnten erfolgreich am MMRC-Labor in Mbeya etabliert werden und erbrachten laut interner und externer Qualitätskontrollen valide Ergebnisse.
- Im direkten Vergleich zeigte die RT-PCR eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber den mikroskopischen Verfahren bei der Detektion von Hakenwürmern und Schistosomen. Die Sensitivität bei der Detektion von Askariden fiel für die RT-PCR im Vergleich etwas geringer aus (Abb. 28 u. 29).
- Die Übereinstimmung zwischen den einzelnen Untersuchungsverfahren fiel je nach Spezies nur gering bis mittelmäßig aus (Tbl. 12).
- Mit der RT-PCR wurden zahlreiche Mischinfektionen nachgewiesen, die in der Mikroskopie unentdeckt blieben (Abb. 36). Häufig lag ein Polyparasitismus mit Hakenwürmern und Schistosomen vor.
- Bei Hakenwurminfektionen war in der Region Mbeya ausschließlich *Necator americanus* als Erreger nachweisbar.
- Ein niedriger CT ging tendenziell mit einer höheren Eizahl (=größerer parasitärer DNA-Menge) einher und vice versa (Abb. 32-35).
- Bei falsch-negativen RT-PCR-Proben waren die EPG geringer und bei falsch-negativen Mikroskopieproben der CT höher (siehe 4.2.2.2).
- Bei 87% der Probanden war laut RT-PCR die Therapie mit einer Einmaldosis Albendazol + Praziquantel erfolgreich (Tbl. 22 u. 23). Die MIF-Mikroskopie konnte nur etwa ein Viertel der Therapieversager identifizieren.
- Polyparasitismus trat bei HIV-Positiven (37% Mischinfektionen) nicht häufiger als bei HIV-Negativen (43% Mischinfektionen) auf und es konnte kein stärkerer Wurmbefall bei HIV-Positiven nachgewiesen werden (siehe 4.5).
- HIV-Positive schieden im Durchschnitt minimal mehr Schistosomeneier pro Gramm Stuhl aus, als Nichtinfizierte (siehe 4.5).

5 Diskussion

Die bisherigen Diagnostikverfahren zur Detektion von Helmintheninfektionen sind für die Bestimmung des tatsächlichen Infektionsstatus und der Wurmlast nicht adäquat geeignet [19]. Sensitive und quantitative Methoden werden jedoch auf Grund zahlreicher, großangelegter Interventionsprogramme zur Kontrolle und Eindämmung von Helminthosen und damit sinkenden Prävalenzen und Infektionsintensitäten dringend benötigt [11]. Auch zur Überprüfung der Wirksamkeit verfügbarer Medikamente und zum Aufdecken aufkommender Medikamentenresistenzen sind sie unerlässlich [3].

Ein Ansatz hierzu ist eine an der Universität Leiden entwickelte Multiplex-Real-Time-PCR zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Soil-Transmitted-Helminths und Schistosomen in Stuhlproben [13, 14]. Bisher ist unklar, ob diese RT-PCR in der Praxis wirklich das sensitivere Verfahren gegenüber der klassischen Mikroskopie darstellt; insbesondere bei den immer häufiger werdenden, leichten Infektionen.

Es erscheint daher notwendig, diese neuen PCR-Protokolle in verschiedenen endemischen Gegenden unter unterschiedlichen epidemiologischen Fragestellungen zu validieren, bevor sie großflächig und eventuell als neuer Goldstandard zur Anwendung kommen könnten.

Daher war das Ziel dieser Untersuchung, die publizierten PCR-Protokolle im eigenen Labor zu etablieren und anhand eigener Versuchsreihen zu evaluieren. Neben den anderen Laborbedingungen in Mbeya, waren auch das Endemiegebiet und das Probandenkollektiv ein anderes als das niederländisch-malaysische und somit auch die Prävalenz und Verteilung der Wurmspezies.

Zur Bestimmung der Sensitivität testeten wir die RT-PCR im direkten Vergleich mit der Mikroskopie. Zudem ermittelten wir erstmals mit Hilfe der RT-PCR die Wirksamkeit einer Einmaldosis der, von der WHO empfohlenen und breit angewandten Wurmtherapeutika Albendazol gegen STHs und Praziquantel gegen Schistosomen und untersuchten zuletzt auch Besonderheiten bei HIV-Helminthen-koinfizierten Probanden.

5.1 Diskussion der Untersuchungsmethoden und -materialien

Die Probensammlung und Datenerhebung für unsere Untersuchung erfolgte im Rahmen der Studie WHIS, die von Juni 2009 bis April 2013 in Mbeya, Tansania durchgeführt wurde. 2011 untersuchten wir von den zu diesem Zeitpunkt 289 registrierten WHIS-Teilnehmern 179 kryopreservierte Baseline-Stuhlproben mit der RT-PCR und verglichen die Ergebnisse anschließend mit denen der MIF-Mikroskopie. Da die Ergebnisse der MIF-Mikroskopie allein nicht aussagekräftig waren, verglichen wir die Real-Time-Ergebnisse außerdem mit den im Rahmen von EMINI mit der Kato-Katz-Methode erhobenen Ergebnissen aus ein bis vier Monate älteren Stuhlproben derselben 179 Probanden.

5.1.1 Studienpopulation

Die Probanden für die WHIS-Studie wurden nach ihren Kato-Katz-Mikroskopieergebnissen und ihrem HIV-Status aus der vorangegangenen EMINI-Studie ausgewählt. Diese Vorgehensweise verlieh der Kato-Katz-Methode eine vermeintliche Stärke im Sensitivitätsvergleich mit der Real-Time-PCR. Über die Prävalenz der einzelnen Wurmspezies, deren Verteilung in den neun Untersuchungsgebieten sowie deren Geschlechterspezifität und Altersabhängigkeit lassen sich auf Grund der Vorselektion keine Aussagen treffen.

Unser Probandenkollektiv war größer (179 vs. 77 Probanden) als das malaysische Kollektiv von Verweij et al., an dem die Multiplex-RT-PCR zur gleichzeitigen Detektion von *N. americanus*, *A. duodenale*, *S. stercoralis* und *A. lumbricoides* im Jahr 2011 erstmals getestet wurde [14]. Allerdings hatte Verweij bereits im Jahr 2007 in Ghana 339 Probanden mit einer ähnlichen Multiplex-RT-PCR für die zwei Hakenwurmspezies und *Oesophagostomum bifurcum* untersucht und die Ergebnisse mit denen der Stuhlmikroskopie verglichen [8].

Es wurde versucht, die WHIS-Teilnehmer gleichmäßig aus allen neun Gebieten zu rekrutieren, was aber aufgrund der ungleichen Verteilung von HIV- und Helmintheninfektionen im Studiengebiet nur bedingt möglich war. Obwohl die Zahl an HIV-Helminthen-Koinfektionen geringer ausfiel als erwartet, unterschied

sich unser Kollektiv von anderen Helminthenstudien durch den großen Anteil HIV-positiver Probanden von 26,3%.

Körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen

Zusätzlich zum HIV-Status und den gesammelten Stuhlproben, wurde von allen Probanden auch ein körperlicher Untersuchungsbefund erhoben und im Blut nach einem IgE-Anstieg sowie einer Eosinophilie, einer häufigen klinischen Begleiterscheinung, gefahndet. Es wäre interessant, diese Parameter in weiteren Arbeiten zu den Mikroskopie und RT-PCR-Ergebnissen in Bezug zu setzen.

5.1.2 Probenqualität

Die Qualität und Beschaffenheit der untersuchten Proben fiel sehr divers aus, hatte aber nur in wenigen Fällen Einfluss auf die Beurteilbarkeit und das Ergebnis. Teilweise wurde weniger als 1 g Stuhl eingefroren, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass Wurmeier oder -larven in der Probe enthalten waren, sank, da diese inhomogen im Stuhl verteilt sind.

Stuhlproben von Probanden mit Diarrhö waren teilweise zu wässrig, um mit dem Mikroskop untersucht zu werden. Auch sehr dunkler Stuhl, der durch Blut oder Nahrungsbestandteile verfärbt war, konnte mikroskopisch nicht beurteilt werden. Dies traf jedoch nur in insgesamt vier Fällen zu, die im Ergebnisteil nicht bewertet wurden, da auf Grund der fehlenden Ergebnisse kein Vergleichsvergleich möglich war.

5.1.3 Mikroskopie

Tagesabhängige Eiausscheidung

Problematisch ist die stark variierende Anzahl an ausgeschiedenen Eiern am Tag [72-74]. So können trotz vorliegender Infektion an manchen Tagen keine bzw. nur sehr wenige Wurmeier im Stuhl nachzuweisen sein. Möglicherweise ist so die ausgeprägte Diskordanz zwischen EMINI- und WHIS-Stuhlproben zu erklären, da die Proben an zwei verschiedenen Tagen mit einem Abstand von 1-4 Monaten gesammelt wurden. Verweij et al. postulieren, dass die Wurm-DNA wesentlich konstanter im Stuhl nachweisbar sei [8].

Es ist möglich, dass wir einen Teil der Stuhlprobe untersucht haben, der nicht mit Eiern inkubiert war, obwohl beim Probanden eine Wurminfektion vorlag, da Wurmeier nicht homogen in der Stuhlprobe verteilt sein müssen.

Eine Schwäche unserer Studie war, dass wir nur eine Stuhlprobe pro Proband untersuchten. Um validere Aussagen treffen zu können, wäre die Untersuchung mehrerer Stuhlproben eines Probanden, die an verschiedenen Tagen gesammelt wurden, sinnvoll gewesen.

Knopp et al. zeigten deutlich, dass die Untersuchung mehrerer Stuhlproben pro Proband sinnvoll ist: Bei drei untersuchten Stuhlproben desselben Probanden stieg die Sensitivität für die Detektion von Hakenwürmern, *T. trichuris* und *S. stercoralis* schon auf über 90%. Berechnungen zufolge, müssten in Gegenden mit vorrangig leichten Infektionen für *A. lumbricoides* mindestens drei Stuhlproben, für Hakenwürmer, *S. stercoralis* und *T. trichuris* sogar bis zu 20 Stuhlproben untersucht werden, um weniger als 1% falsch-negative Diagnosen zu erhalten [111]. Diese hohe Zahl ist aufgrund des hohen Kosten- und Zeitaufwandes vor allem im Rahmen klinischer Studien nicht praktikabel. Laut Kongs et al. sei die Variation zwischen den einzelnen Objektträgern einer Stuhlprobe, verglichen zur Tagesvariabilität und wurmspezifischen Unterschieden, eher gering [74].

Einfluss der Labormitarbeiter auf die Ergebnisse

Da unsere Labormitarbeiter meist bis spät am Abend mikroskopierten, um die Proben, die tagsüber in den Untersuchungsgebieten gesammelt wurden, möglichst frisch zu untersuchen, könnte Übermüdung eine Fehlerquelle darstellen. Teilweise wurden an einem Abend für die Studien WHIS und EMINI bis zu 100 Stuhlproben von zwei Labormitarbeitern mit der Kato-Katz- oder MIF-Methode vorbereitet, mikroskopiert und ausgewertet. Durch Müdigkeit der Untersucher könnte es zum Übersehen von Wurmeiern oder -larven, Fehlinterpretationen des Gesehenen oder zur Verwechslung von Proben gekommen sein. Teilweise waren mehrere Beschriftungsschritte auf unterschiedlichen Aufbewahrungs- und Untersuchungsmaterialien notwendig

und können Verwechslungen provoziert haben. Dennoch gingen wir statistisch von einer angenommenen Spezifität von 100% aus.

Faktor Zeit bei der Mikroskopie von Hakenwürmern

Dacombe et al. zeigten, dass die Sensitivität der KK-Methode bei der Detektion von Hakenwurmeiern um 50% abnahm, sobald Präservierung und Kühlung der Proben mit einer Verzögerung von mehr als drei Stunden durchgeführt wurden. Da viele der Proben, zwar gekühlt aber nicht weiter konserviert, erst nach vier bis 24 Stunden vom Feld ins Labor gebracht wurden, darf angenommen werden, dass die Sensitivität bei der mikroskopischen Detektion von Hakenwurminfektionen hierdurch geringer ausfiel. Zudem lysieren die fragilen Hakenwurmeier, wenn Proben nicht innerhalb von 30 Minuten nach der Erstellung eines Kato-Katz-Objekträgers untersucht werden [60].

5.1.4 Real-Time-PCR

DNA-Isolation mittels des Qiagen Mini Kits

Die DNA-Isolation aus eingefrorenem Stuhl mittels des Qiagen Mini Kits erwies sich für unsere eingefrorenen Proben als sehr gut geeignet. Deswegen wurde bei allen weiteren Untersuchungen dieses Verfahren angewandt.

Im Rahmen einer externen Qualitätskontrolle an der Universität Leiden wurden sogar 100% der mit dem Qiagen Mini Kit extrahierten DNA detektiert.

Primer- und Sondenauswahl

Die verwendeten Primer wurden Publikationen Jaco J. Verweij et al. entnommen, da sie eine sehr hohe Spezifität für die einzelnen Erreger aufweisen [13, 14].

Eine Ausnahme stellen hierbei die Primer und Sonden des Hakenwurmes *Ancylostoma duodenale* für die IT2 Sequenz dar, da diese nicht nur *Ancylostoma duodenale* amplifizieren und detektieren, sondern auch *Ancylostoma ceylanicum*, der normalerweise Hamster, Hunde oder Katzen befällt, jedoch potenziell humanpathogen ist. Bei Vorliegen einer Infektion mit *Ancylostoma ceylanicum* kann es so zu Amplifikationen und falsch-positiven Ergebnissen kommen [14].

In der Region Mbeya scheint *A. duodenale* jedoch nicht endemisch zu sein. Bei allen mit Hilfe der RT-PCR detektierten Hakenwurminfektionen war ausschließlich *Necator americanus* als Erreger nachweisbar. Auch in der normalen PCR mit anschließender Gelelektrophorese konnte *A. duodenale* nie nachgewiesen werden. Die von Dr. Jaco Verweij in Leiden nachuntersuchten Proben enthielten ebenfalls nur DNA des Hakenwurms *N. americanus*.

Die *A. duodenale* Positivkontrolle zeigte keine deutliche Amplifikationskurve. Eventuell war die Sonde defekt. Seit meiner Abreise aus Mbeya sucht die Multiplex-RT-PCR nun anstelle von *A. duodenale* nach Schistosomen, die zuvor mit einer Singleplex-RT-PCR detektiert wurden.

In Ostafrika konnten mit den herkömmlichen Verfahren bisher beide Hakenwurmspezies nachgewiesen werden. *N. americanus* trat dabei zahlenmäßig vorherrschend auf [112].

Alle Real-Time-PCR-Durchläufe wurden mit der Rotorgene 6000 durchgeführt. Die Ergebnisse sind daher zunächst nur auf diesen Thermocycler anzuwenden, obwohl es wahrscheinlich erscheint, dass sie sich auch auf andere Systeme übertragen lassen. Die Reliabilität des Real-Time-PCR-Algorithmus wurde auf Grund finanzieller und zeitlicher Limitationen in dieser Arbeit nicht überprüft. Jede isolierte DNA-Probe wurde nur einmal mit Hilfe der Rotorgene 6000 analysiert und im Anschluss mit der Mikroskopie verglichen.

Kontamination und Inhibition

Aufgrund der hohen Sensitivität der RT-PCR besteht eine ausgeprägte Anfälligkeit für DNA-Kontaminationen, die falsch-positive Ergebnisse bedingen können.

Um Kontaminationsfreiheit zu garantieren, fügten wir zu jedem Reaktionsansatz als Negativkontrolle Wasser hinzu. Bei allen untersuchten Proben fand keine Amplifikation in der H₂O-Kontrolle statt. Dass unsere Ergebnisse nicht auf Kontaminationen zurückzuführen waren, bestätigte zudem die Tatsache, dass wir die gleiche Wurmspezies nach etwa sechs Wochen in einer zweiten Stuhlprobe des Probanden bei Therapieversagen erneut detektierten.

Hemmende Substanzen können den DNA-Extraktionsprozess oder den Amplifizierungsprozess behindern und so zu falsch negativen Ergebnissen führen. Da PhHV-1 als Kontrolle für den DNA-Extraktionsprozess aus Stuhlproben eingesetzt wurde, können wir mit relativer Sicherheit ausschließen, dass hemmende Substanzen vorhanden waren und falsch-negative Ergebnisse bedingten.

Um auch eine Inhibition des PCR-Laufs an sich zu kontrollieren, ließen wir in jedem Durchgang Positivkontrollen der einzelnen Organismen mitlaufen. Mit Ausnahme von *A. duodenale* waren die Positivkontrollen in allen Läufen positiv, sodass wir eine Inhibition während der Amplifikation ausschließen können.

Die Kontrolle für *Ancylostoma duodenale* zeigte ein Rauschen anstelle einer deutlichen Amplifikationskurve. Es ist nicht auszuschließen, dass die Sonde defekt war.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Externe Validierung

19 am MMRC aus Stuhl extrahierte DNA-Proben wurden bei Raumtemperatur zur Universität Leiden transportiert und dort nachuntersucht. Die Ergebnisse entsprachen zu 98% den unseren. Die Universität Leiden konnte lediglich zwei zusätzliche Schistosomeninfektionen mit einem hohen CT > 36 nachweisen. Es könnte sich dabei um sehr leichte Infektionen gehandelt haben, da ein hoher CT mit einer niedrigen Menge parasitärer DNA einhergeht und umgekehrt [14].

Die externe Qualitätskontrolle zeigt, dass das neu etablierte Verfahren vergleichbare, reproduzierbare Ergebnisse hervorbringt.

5.2.2 Interne Validierung anhand eines Methodenvergleiches

Zunächst verglichen wir die drei Verfahren MIF, KK und RT-PCR mit einem Pseudogoldstandard aus der Kombination aller drei Verfahren. Detektierte eines der Verfahren Askariden, Schistosomen oder Hakenwürmer, galt die Stuhlprobe als echt-positiv.

Danach verglichen wir die einzelnen Verfahren direkt miteinander und berechneten die jeweilige Sensitivität in %.

Auch Verweij et al., Khieu et al. und Knopp et al. untersuchten die Sensitivität der RT-PCR anhand eines direkten Vergleiches mit der Mikroskopie und anhand eines Pseudogoldstandards, der aus einer Kombination der einzelnen Verfahren, der PCR eingeschlossen, hervorging. Khieu et al. suchten in einer 2013 in Kambodia durchgeführten Studie mit der RT-PCR jedoch nur nach Hakenwürmern und *Strongyloides stercoralis* und nicht nach Askarideninfektionen [89]. Auch Knopp et al. suchten 2012 bei einer nur geringen Zahl Infizierter lediglich nach Hakenwürmern und *Strongyloides stercoralis* [113].

Eine große Schwäche unserer Studie ist, dass wir die RT-PCR mit dem mikroskopischen MIF-Verfahren verglichen, welches erst kurz vor Studienbeginn am Labor eingeführt worden war. Vermutlich waren die Mitarbeiter noch nicht ausreichend vertraut mit der Methode, sodass ihre

Sensitivität sehr gering ausfiel und die RT-PCR zugleich stärker erschienen ließ.

5.2.2.1 Verfahrensvergleich mit und ohne Goldstandard

Die Sensitivität der RT-PCR betrug bei den 179 auf Hakenwürmer, Askariden und Schistosomen untersuchten Probanden gemessen am Pseudogoldstandard 83,6%, 51,4% und 82,6% (Abbildung 29).

Die Sensitivität für Hakenwürmer lag damit etwas höher als bei einer später von Knopp et al. am MMRC durchgeführten Studie mit 219 analysierten Stuhlproben und einer RT-PCR-Sensitivität für Hakenwürmer von 73,6% [113]. Schär et al. ermittelten in einer 2013 publizierten Studie mit 218 Schulkindern eine Sensitivität von 79% [114].

Insgesamt wies die RT-PCR in unserer Untersuchung 2,2 mal mehr Infektionen als MIF und 1,4 mal mehr Infektionen als die KK-Mikroskopie nach.

Verweij et al. beziffern die Sensitivität ihrer RT-PCR im direkten Vergleich mit der Mikroskopie auf bemerkenswerte 100% für Hakenwürmer, Askariden, Schistosomen und Strongyloiden und postulieren eine achtmal so hohe Detektionsrate gegenüber der KK-Mikroskopie. Diese Ergebnisse erbrachte eine 2007 in Ghana durchgeführte Studie mit 339 Probanden. Die ghanaischen Studienteilnehmer wiesen mit einem Median von 720 EPG höhere Hakenwurmeizahlen und damit stärkere Infektionen auf als unsere Probanden, mit einem Median von nur 144 EPG [8].

Eine prinzipielle Stärke unserer Studie gegenüber der von Verweij et. al ist die hohe Anzahl an leichten Infektionen und an asymptomatischen, Mikroskopie-negativen Probanden. In seine Studie wurden nur symptomatische Probanden eingeschlossen, bei denen schwerere Infektionen vorlagen. Dies könnte die von ihm ermittelte sehr hohe Sensitivität erklären.

Die Kato-Katz-Mikroskopie wies in unserem Verfahrensvergleich eine Sensitivität für Hakenwurminfektionen von 57,1% auf. Verweij et al. ermittelten 2007 eine Sensitivität von 81% für das KK-Verfahren [8] und Glinz et al. 2008

eine sehr geringe von nur 22,6% [56] bei 112 untersuchten Stuhlproben von Schulkindern aus Azaguié-IRFA an der Elfenbeinküste. Eine 2009 von Becker et al. durchgeführte Untersuchung mit 292 Probanden aus Lélébé an der Elfenbeinküste ergab eine Sensitivität der KK-Mikroskopie von 69,1% [18].

Die Sensitivität des KK-Verfahrens für die Detektion von Askarideninfektionen lag in unserer Untersuchung bei 71,4% und die von Schistosomen bei nur 47,8%. Glinz et al. ermittelten an der Elfenbeinküste für die KK- Methode eine ähnliche Sensitivität für Askariden von 68,8%, aber eine höhere für Schistosomeninfektionen von etwa 77,4% [56].

Da wir keine spezifische mikroskopische Methode zur Detektion von *S. stercoralis* anwandten und somit auch kein Verfahrensvergleich möglich war, kann die Eignung der RT-PCR für diesen Erreger in dieser Studie nicht ermittelt werden.

5.2.2.2 Übereinstimmung der Verfahren und einflussnehmende Faktoren

Die Übereinstimmung der Verfahren untereinander wurde zum einen in Prozent und zum anderen mit Hilfe des Cohen Kappa Quotienten nach Landis angegeben (siehe 3.2.4). Die Übereinstimmung fiel dabei nur gering bis mittelmäßig aus.

Während die Konkordanz zwischen RT-PCR und KK-Methode in der 2007 von Basuni und Verweij et al. in Ghana durchgeführten Studie für Hakenwürmer noch bei 99,5% lag [8], ergab eine zwei Jahre später durchgeführte Studie in Malaysia eine Konkordanz von nur noch 3%. Basuni et. al erwähnen, dass diese Diskrepanz durch eine zwischenzeitliche Behandlung zustande gekommen sein könnte, die sie nicht sicher ausschließen könnten oder durch falsch-positive Proben in der RT-PCR, die ohne einen wirklichen Goldstandard nicht auszumachen seien [14].

Im Folgenden sind einige Erklärungsansätze für die ausgeprägte Diskordanz zwischen unseren angewandten Verfahren aufgeführt.

Mögliche Ursachen für falsch negative Ergebnisse auf Seiten der Mikroskopie, sowie der RT-PCR könnten gewesen sein: geringe Eiausscheidung und damit erschwerte Detektierbarkeit bei Immunschwäche, Autoinfektion, tagesvariable

Eiausscheidung oder vorliegende leichte Infektion oder eine schlechte Sensitivität der angewandten diagnostischen Verfahren.

Da die Kato-Katz-Ergebnisse teilweise aus mehrere Monaten älteren Stuhlproben erhoben wurden, könnte es sich bei den wurmpositiven RT-PCR-, aber wurmnegativen KK-Ergebnissen selbstverständlich um Neuinfektionen gehandelt haben. Bei *Ascaris lumbricoides* erscheinen 60-70 Tage nach Neuinfektion die ersten Eier im Stuhl. Bei den Hakenwürmern geschieht dies 5-7 Wochen nach der Infektion und ist stark abhängig von der Zahl an Parasiten, mit der der Mensch infiziert ist. Bei *Strongyloides stercoralis* zeigen sich nach einem Monat die ersten Larven im Stuhl. Bei den Schistosomen beträgt die Inkubationszeit im Durchschnitt einen Monat, variiert aber stark zwischen 23 bis zu 73 Tagen [35]. Außerdem könnten Probanden in der Zwischenzeit eigenständig Wurmtherapeutika eingenommen haben und dies im Fragebogen nicht angegeben haben. Die RT-PCR konnte dann folglich in der im Rahmen von WHIS kollektierten Stuhlprobe keine Erreger mehr nachweisen.

Da die EMINI- und WHIS-Stuhlproben an verschiedenen Tagen gesammelt wurden, könnte auch die tagesvariable Eiausscheidung die ausgeprägte Diskordanz zwischen KK und RT-PCR im Vergleich erklären.

Die geringe Sensitivität der RT-PCR für Askarisinfektionen von nur 54,3% deckt sich mit Resultaten einer 2012 von Basuni et al. publizierten Studie, in der drei Askarisinfektionen nur von der Mikroskopie, nicht aber von der RT-PCR detektiert werden konnten. In zwei Fällen war die RT-PCR hier negativ, in einem detektierte sie anstelle der Askarisinfektion einen Befall mit *N. americanus* [115]. In unserer Untersuchung wurden sogar in fast der Hälfte der 16 nur von der KK-Mikroskopie detektierten Askaridenfälle von der RT-PCR andere Erreger nachgewiesen. Teilweise lagen sogar Mehrfachinfektionen mit *N. americanus* und Schistosomen vor. Die übrigen RT-PCR-Negativproben könnten auf eine beschädigte DNA (Transport, Lagerung) oder die tagesabhängig variierende Eiausscheidung zurückzuführen sein. Die Detektion anderer Erreger auf Verwechslungen durch Übermüdung der Mikroskopisten oder die höhere Sensitivität der RT-PCR für Schistosomen und *N. americanus*.

5.2.2.3 Zusammenhang zwischen Eizahl/CT und Detektierbarkeit

Obwohl in Fällen von Diskordanz häufiger die RT-PCR mit ihrer Diagnose richtig lag, kam es auch vor, dass nur die Mikroskopie einen Erreger detektierte, der in der RT-PCR nicht nachweisbar war.

In Stuhlproben, in denen nur die KK-Mikroskopie, nicht aber die RT-PCR Schistosomen nachweisen konnte, waren die gezählten EPG signifikant ($p=0,0072$) niedriger als in Proben, in denen beide Verfahren den Erreger detektieren konnten (Abbildung 31). Auch für Askariden- und Hakenwurminfektionen zeigte sich diese Tendenz deutlich, war jedoch nicht signifikant.

Bei Basuni und Verweij et al. wurde 2011 keine Infektion ausschließlich in der Mikroskopie nachgewiesen [14].

Verweij et al. beschrieben, dass mit der Real-Time-PCR die Stärke einer Infektion bestimmt werden könne, da die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunehme. Dass also größere Mengen an parasitärer DNA (i.e. stärkere Infektionen) zu niedrigeren CT-Werten führen als kleinere Mengen Nukleinsäuren bei leichteren Infektionen [8]. Diese Tendenz bestätigte sich bei uns, allerdings nicht immer signifikant. Dies kann auf die geringe Probandenzahl zurückzuführen sein. Teesdale et al. schrieb 1985, dass die mikroskopische Detektionsgrenze bei 50-100 EPG läge [67].

Bei falsch negativen RT-PCR-Proben waren die EPG geringer und bei falsch negativen Mikroskopieproben der PCR-Cycle Threshold höher.

Die nur in der RT-PCR positiven Hakenwurminfektionen wiesen einen signifikant höheren CT-Wert (i.e. niedrige DNA-Menge) auf (p -Wert: 0,0082), was die hohe Sensitivität der RT-PCR bei leichten Infektionen unterstreicht, die mit der MIF- und KK-Methode übersehen wurden (siehe Abbildungen 32 und 33).

Mit der RT-PCR wurden aber auch einige leichte Infektionen übersehen. In diesen falsch-negativen Proben waren die mittleren EPG deutlich; aber nicht signifikant niedriger als mit der PCR als echt-positiv deklarierten Stuhlproben.

Falsch-negative PCR-Ergebnisse könnten durch die geringe untersuchte Stuhlmenge und die inhomogene Verteilung von Eiern im Stuhl erklärt werden. Die Tatsache, dass bei fast allen Probanden leichte Infektionen mit geringen EPG im Stuhl vorlagen unterstreicht diese Überlegung. Bei der KK-Methode wurden 41,7 mg, bei MIF 1 g und bei der RT-PCR nur 2,5 mg Stuhl untersucht. Aufgrund der größeren Stuhlmenge, hätte das MIF-Verfahren sensitiver sein müssen. Eine weiterführende Untersuchung zur Bestimmung der optimalen Stuhlmenge für die DNA-Extraktion wäre sehr sinnvoll. Während KK und MIF an den relativ frischen Stuhlproben durchgeführt wurden, wurden die Stuhlproben für die PCR 2-3 Jahre lang eingefroren, wodurch es zum DNA-Verfall gekommen sein könnte.

Die PCR detektierte viele Fälle, die die Mikroskopie nicht identifizierte. In denen war auffällig, dass sie einen hohen CT und viele Mehrfachinfektionen aufwiesen.

Die falsch-negativen Fälle in der PCR scheinen nicht auf eine Inhibition während der Extraktion oder des PCR-Laufes zurückzugehen, da alle Kontrollen normgerecht amplifiziert und detektiert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass in der Mikroskopie Stuhlbestandteile mit Eiern verwechselt wurden oder es zu Probenverwechslungen gekommen ist.

In Anbetracht der Ergebnisse ist anzunehmen, dass KK, MIF und RT-PCR bei leichten Infektionen (geringe Eizahl und DNA-Menge im Stuhl) an Sensitivität verlieren. Für die KK-Methode wurde das bei Knopp et al. schon 2009 beschrieben [75].

5.2.3 Mehrfachinfektionen

Oftmals liegt bei Wurminfizierten ein Polyparasitismus vor, bei dem der Betroffene zu einem bestimmten Zeitpunkt mit mehr als nur einer Wurmspezies infiziert ist [29]. In Studien stellte sich heraus, dass Personen mit multiplen Infektionen häufig schwerere Infektionen mit höheren EPG aufwiesen [31]. In unserer Untersuchung ergaben sich hierauf keine Hinweise. Es lagen nur leichte Infektionen vor und Probanden mit Polyparasitismus wiesen keine höheren Eizahlen auf als Probanden mit Einzelinfektionen. Vermutlich zeichnen sich solche Tendenzen eher bei größeren Probandenzahlen und in Gebieten mit schweren Infektionen ab, in denen nicht regelmäßig mit Anthelmintika behandelt wird, wie es in der Region Mbeya der Fall ist.

Mit der RT-PCR wurden zahlreiche Mischinfektionen nachgewiesen, die in der Mikroskopie unentdeckt blieben. Bei etwa 17% der untersuchten Probanden lag ein Polyparasitismus vor. Die RT-PCR detektierte 30 Fälle, die KK-Mikroskopie nur 2, MIF keine. Dabei waren Infektionen mit zwei Wurmspezies zur selben Zeit am häufigsten. Bei 20 von 30 Mehrfachinfektionen lag die Kombination *Necator americanus* + Schistosomen vor.

Khieu et al. fanden in einer 2013 durchgeführten Studie in Kambodia zum Vergleich bei 12,8% von 218 untersuchten Schulkindern Mehrfachinfektionen mit Hakenwürmern und *Strongyloides stercoralis* [89].

Ein Problem der RT-PCR ist das eingeschränkte Erregerspektrum, sodass Koinfektionen mit weiteren Helminthen oder anderen Erregern bei unseren Probanden nicht auszuschließen sind. So konnten mit der Mikroskopie in 26 Fällen zusätzliche Infektionen mit *Trichuris trichuria* nachgewiesen werden.

Borkow et al. zu Folge sollen multiple Infektionen durch ihren immunmodulierenden Effekt den Menschen anfälliger für andere Infektionen wie Malaria und HIV machen [4]. Bei 21% unserer Mehrfachinfizierten wurde zusätzlich eine HIV-Infektion detektiert. Zur wahren Prävalenz von HIV bei Mehrfachinfizierten kann diese Studie jedoch aufgrund der Vorselektion der Probanden nach ihrem HIV-Status und ihrem KK-Mikroskopieergebnis keinen Aufschluss geben.

5.2.4 Behandlungserfolge

Ein Ziel unserer Studie war es, die Wirksamkeit einer Einmaldosis Albendazol bzw. Praziquantel zu testen, da diese von der WHO breit gegen STH und Schistosomen angewendet werden und bisher Studien fehlen, bei denen die Wirksamkeit mit Hilfe der RT-PCR ermittelt wurde.

Bei 87% der 118 nachuntersuchten Probanden war die Therapie mit einer Einmaldosis Albendazol + Praziquantel laut RT-PCR erfolgreich. Die MIF-Mikroskopie konnte nur etwa ein Viertel der Therapieversager identifizieren.

Die Heilungsraten (Cure Rate) betrugen 75,6% für Hakenwurminfektionen, 100% für Askarideninfektionen, 75% für Strongyloideninfektionen und 90,5% für Schistosomeninfektionen. Bis auf die Heilungsrate für Askariden decken sich diese Werte mit Heilungsraten aus der Literatur, die mit Hilfe des Kato-Katz-Verfahrens ermittelt wurden:

Nach einer Einmaldosis Albendazol ermittelten Keiser et al. eine CR bei Hakenwürmern von ca. 72% und eine CR bei Askarideninfektionen von 88% [108]. Knopp et al. hingegen von 61,2% und 91,3% [116]. Laut einer Studie von Nontasut et al. liegt die CR bei Strongyloideninfektionen bei etwa 78% [109]. Stete et al. berichtete nach einer Einmaldosis Praziquantel bei vorliegender Schistosomeninfektion von einer CR von 92,9% [110].

In den genannten Studien wurde die CR mit mikroskopischen Verfahren, meist der KK-Methode, ermittelt. Dabei wurden teilweise mehrere Stuhlproben von verschiedenen Tagen oder zumindest eine größere Menge Stuhl eines Tages untersucht.

In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass die Real-Time-PCR ein zuverlässiges Mittel ist, um leichte Infektionen, die nach einer Einmaldosis Albendazol und Praziquantel bestehen bleiben können, zu detektieren. Auch die Tatsache, dass wir bei Therapieversagen den gleichen Wurm in einer zweiten Stuhlprobe des Probanden erneut detektierten, veranschaulicht die hohe Sensitivität der RT-PCR.

Es sollte erwähnt werden, dass das Probandenkollektiv zu klein war, um verallgemeinernde Schlüsse zu ziehen. Es könnte sein, dass jemand die

Tablette nicht schlucken konnte oder aus anderen Gründen nicht eingenommen hat. Auch aufkommende Resistenzen bei Helminthen gegen die wenig verfügbaren Medikamente sind eine Möglichkeit [86]. Bei negativer RT-PCR trotz hohen EPG in der Mikroskopie sollte an andere Wurmsubspezies und Variationen in der Sequenz gedacht werden (genetischer Polymorphismus). Die nach Behandlung noch positiven Proben sollten unbedingt aufbewahrt und auf resistente Gene gegen Anthelmintika untersucht werden.

Vielleicht hätten einige Probanden auch eine dreitägige Wurmkur benötigt. Bei Dreitage-Kuren (400 mg Albendazol für drei Tage) anstelle einer Einmaldosis von 400 mg Albendazol wurde von besseren Heilungsraten und einer stärkeren Eireduktion berichtet [117]. Derartige Behandlungsschemata sind allerdings im großen Stil logistisch und finanziell schlechter umsetzbar und könnten eine sinkende Compliance auf Seiten der Behandelten mit sich bringen.

Auch Koinfektionen mit anderen Erkrankungen könnten Einfluss auf die Medikamentenwirksamkeit gehabt haben. Mit Hilfe von Fragebögen wurde bei jedem WHIS-Besuch erhoben, ob die Studienteilnehmer mit Anthelmintika behandelt wurden. Dennoch ist nicht sicher auszuschließen, dass die Probanden in Eigenregie oder im Rahmen eines internationalen Interventionsprogrammes zwischen den Besuchen therapiert wurden. Dies könnte Differenzen zwischen den Ergebnissen der Kato-Katz-Mikroskopie und der Real-Time-PCR, die an ca. 75 Tage später gesammelten Proben erfolgte, erklären. Auch eine Reinfektion mit dem gleichen Wurm könnte eine Erklärung für wurmpositive Proben nach Behandlung darstellen.

5.2.5 HIV-Helminthen-Koinfektion

47 Probanden unseres Kollektivs waren HIV-positiv und 69% davon zeitgleich mit Würmern infiziert. Diese relativ kleine Probandenzahl erschwert die Verallgemeinerbarkeit unserer Schlussfolgerungen. Studien zeigten, dass bei HIV-positiven Patienten häufig ausgeprägte Infektionen, sowie ein Polyparasitismus vorliegen [96-98]. In unserer Studie lagen jedoch bei allen 33 HIV-Helminthen-Koinfizierten nach WHO-Grenzen nur leichte Infektionen vor. Die Infektionsstärke bei HIV-Wurm-koinfizierten Probanden unterschied sich demnach nicht von HIV-negativen Probanden. Auch ein Polyparasitismus trat nicht signifikant häufiger auf als bei HIV-negativen Probanden. Mehrfachinfektionen waren mit 43% bei HIV-Negativen sogar tendenziell etwas häufiger als bei HIV-Positiven mit vorliegendem Polyparasitismus in 37% der Fälle.

Karanja, D.M., et al. beschrieben, dass HIV-Schistosomen-koinfizierte Probanden auf Grund ihres geschwächten Immunsystems weniger Schistosomeneier am Tag ausscheiden würden als HIV-negative Probanden [99]. Diesen Untersuchungsbefund konnten wir nicht bestätigen. Die koinfizierten Probanden schieden im Gegensatz zu den HIV-negativen mit 102 EPG im Durchschnitt 108 EPG aus. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie von 2005, die befand, dass sich die Zahl sezernierter Schistosomeneier pro Gramm Stuhl bei HIV-Positiven und -Negativen nicht unterscheidet [118].

5.3 Konsequenzen der Arbeit und Ausblick

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die alleinige Anwendung nur eines Nachweisverfahrens nicht in Gänze überzeugen kann. Vor allem bei leichten Infektionen, die in Gebieten mit laufenden Kontrollprogrammen immer häufiger werden, ist ihre Eignung diskussionsbedürftig.

Die Entwicklung und Weiterentwicklung diagnostischer Verfahren zur sicheren Detektion von Helminthen wird somit weiterhin eine Herausforderung bleiben. Bestenfalls sollten mehrere Stuhlproben verschiedener Tage mit verschiedenen Diagnostikmethoden untersucht werden, um die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen.

Da das KK-Verfahren nach den Ergebnissen unserer Untersuchung validere Ergebnisse als die MIF-Mikroskopie erzielte, wurden nach meiner Abreise aus Mbeya alle prozessierten Stuhlproben wieder mit dieser Methode untersucht.

Durch die Kombination der zwei nun etablierten Verfahren Kato-Katz und RT-PCR kann am MMRC in zukünftigen Studien eine höhere Sensitivität erreicht werden, womit der tatsächliche Infektionsstatus recht sicher bestimmt werden kann. In weiterführenden immunoepidemiologischen Studien am NIMR-MMRC sollen so zukünftig Interaktionen bei HIV-Helminthen-koinfizierten Probanden untersucht werden.

Die PCR-Technik und die benötigten Reagenzien sind derzeit noch kostenintensiver. Andererseits steigen auch die Kosten und der logistische Aufwand für Feldforschungsprojekte, wenn man für jeden Erreger die optimale Mikroskopietechnik anwenden und mehrere Proben eines jeden Probanden untersuchen möchte, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Die Verfügbarkeit der RT-PCR scheint rasant zu wachsen.

Verweij et al. errechneten Kosten von US\$ 2.61 für die Untersuchung einer Stuhlprobe per RT-PCR bei einem Zeitaufwand von etwa 120 Minuten. Eine Mikroskopie mit sechs untersuchten Objektträgern und vorrangegangener Konzentrierungsmethode schlage mit etwa US\$ 2.60 und 170 min Zeitaufwand zu Buche und unterscheide sich demnach kaum [13].

Geeignete räumliche Gegebenheiten, Personalschulungen und die Validierung des Verfahrens vor Ort sind bei der Etablierung und Anwendung der RT-PCR essenziell.

Ein großer Nachteil der RT-PCR ist das eingeschränkte Erregerspektrum. Erreger-DNA kann nur nachgewiesen werden, wenn die erregerzugehörigen Primer und Sonden in den Mastermix gegeben wurden. Die Mikroskopie kann hingegen bei der Betrachtung der Objektträger auch andere Helminthen, Protozoen oder Bakterien ausfindig machen, die ebenso für die unspezifischen klinischen Symptome verantwortlich sein können. Da Koinfektionen bei Wurmerkrankten häufig sind, ist dieses Kriterium von hohem Stellenwert.

Ein großer Vorteil der RT-PCR ist die Möglichkeit, zahlreiche Stuhlproben aus entlegenen Gegenden zu sammeln und an einem gut ausgestatteten Zentrallabor zu verarbeiten. So wird ein hoher Durchsatz an Stuhlproben von großen Bevölkerungsgruppen in kurzer Zeit möglich. Dies könnte Kosten sparen und umginge die direkte Untersuchung des frischen Stuhls, die zum Beispiel bei der Detektion von Hakenwürmern von Nöten ist, um deren Lyse zuvorzukommen. Eine Kühlkette wäre hierbei nicht erforderlich, da die DNA der lysierten Hakenwurmeier noch immer im Stuhl nachweisbar wäre, wenn die Stuhlprobe in einem Ethanolgemisch bei Raumtemperatur aufbewahrt würde.

Insbesondere für den Nachweis von Schistosomen- und Hakenwurminfektionen besitzt die RT-PCR eine hohe Sensitivität und scheint im Rahmen klinischer Studien besonders geeignet bei guter Praktikabilität.

Bei der Eradikation und Eindämmung der Helminthosen spielen neben einer sensitiveren Diagnostik viele weitere Faktoren eine große Rolle. So wird eine Verbesserung der Abwassersysteme, des Hygieneverständnisses, der Bildungssysteme und der Umweltbedingungen notwendig sein, um nachhaltig und langfristig Veränderungen herbeizuführen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund:

Von den weltweit mehr als zwei Milliarden mit Würmern (griech. Helminthen) infizierten Menschen sind schätzungsweise etwa 22 Millionen zusätzlich mit HIV koinfiziert und verbleiben durch die krankheitsbedingte Produktivitäts- und Leistungsminderung in einer Abwärtsspirale. Trotz großangelegter globaler Versuche, Helminthosen mit präventiven Massenbehandlungen einzudämmen, gibt es weiterhin großen Forschungs- und Handlungsbedarf.

Eine sensitivere und zuverlässigere Diagnostikmethode als die klassische Stuhlmikroskopie ist dringend erforderlich.

Problemstellung und Zielsetzung:

Etablierung eines molekularen Wurmdiagnostikverfahrens (Multiplex-Real-Time-Polymerase Chain Reaction) am Mbeya Medical Research Center (MMRC)-Labor im einkommensschwachen Tansania zur Detektion verschiedener Helminthen im Stuhl und direkter Vergleich mit der Merthiolat-Jod-Formalin (MIF)-Mikroskopie sowie dem derzeitigen Diagnostikgoldstandard der Kato-Katz (KK)-Mikroskopie. Klärung der Frage, ob das neue Verfahren wirklich sensitiver und für weitere Untersuchungen einsetzbar ist. Prüfung der Wirksamkeit von zur Massenbehandlung eingesetzten Medikamenten und Untersuchung von Besonderheiten bei HIV-Helminthen-koinfizierten Probanden mit Hilfe des neuen Verfahrens.

Material und Methoden:

Zwischen 2008 und 2011 Probensammlung, Erhebung der HI-Viruslast und CD4-Zellzahl, Stuhlmikroskopie nach der MIF- und KK-Methode, sowie Etablierung, Validierung, Durchführung und Evaluierung der Real-Time-PCR (RT-PCR) für 179 Probanden in Mbeya, Tansania. 118 Studienteilnehmer wurden nach einer Einmalgabe von 400 mg Albendazol gegen intestinale Nematoden und 40 mg/kg Praziquantel gegen Schistosomeninfektionen mit der Mikroskopie sowie der RT-PCR nachuntersucht.

Ergebnisse:

Bei fast allen Probanden lagen laut WHO-Klassifikation leichte Infektionen vor. Eine externe sowie interne Qualitätskontrolle bestätigte die Validität unserer RT-PCR. Der Methodenvergleich ergab eine hohe Diskordanz zwischen den einzelnen Verfahren. Die RT-PCR wies 2,2 mal mehr Infektionen als MIF und 1,4 mal mehr Infektionen als KK nach. Bei etwa 17% der untersuchten Probanden lag ein Polyparasitismus vor. Mit der RT-PCR wurden mehr Mischinfektionen nachgewiesen. Ein niedriger Cycle Threshold (CT) korrelierte mit einer hohen Eizahl und umgekehrt. Die Infektionsstärke bei HIV-Wurmkoinfizierten Probanden unterschied sich nicht von der HIV-negativer Probanden. HIV-Positive schieden trotz ihrer Immunschwäche nicht weniger Schistosomeneier am Tag aus als Nichtinfizierte. Ein Polyparasitismus lag bei HIV-Positiven (37% Mischinfektionen) nicht häufiger als bei HIV-Negativen (43% Mischinfektionen) vor.

Schlussfolgerung und Ausblick:

Die RT-PCR erwies sich als wesentlich sensitiver als die Mikroskopie bei der Detektion von Hakenwürmern und Schistosomeninfektionen; nicht aber bei Askarideninfektionen. Als alleinig eingesetztes Diagnostikverfahren am MMRC hat sie daher keinen Bestand. Sie wird für zukünftige Studien als sensitives Zweitverfahren, das Hakenwurm-, Schistosomen- und Mischinfektionen besser nachweisen kann, neben der klassischen Kato-Katz-Mikroskopie Anwendung finden.

Durch diese Arbeit konnte der Grundstein für die Diagnostik zukünftiger Studien am MMRC gelegt werden, die im Rahmen des IDEA-Projektes, einer großen afrikanisch-europäischen Forschungsinitiative, die unter anderem wurminduzierte Immunantworten in Bezug auf Koinfektionen mit HIV, Malaria und Tuberkulose und den Einfluss von Würmern auf Impfstoff-induzierte Immunantworten untersucht, durchgeführt werden.

Es sollten weitere Studien zur Sensitivität der verwendeten RT-PCR-Protokolle an anderen Standorten durchgeführt werden.

In Mbeya wurde das Verfahren nach meiner Abreise erfolgreich weitergeführt, sodass inzwischen fast 1000 Stühle mit der RT-PCR untersucht worden sind.

7 Annex

7.1 Literaturverzeichnis

1. Hotez, P.J., et al., *Helminth infections: the great neglected tropical diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1311-21.
2. Hotez, P.J., *Forgotten people and forgotten diseases, the neglected tropical diseases and their impact on global health and development*. ASM Press, 2008.
3. Hotez, P.J., et al., *Control of neglected tropical diseases*. N Engl J Med, 2007. **357**(10): p. 1018-27.
4. Borkow, G. and Z. Bentwich, *HIV and helminth co-infection: is deworming necessary?* Parasite Immunol, 2006. **28**(11): p. 605-12.
5. Walson, J.L., et al., *Albendazole treatment of HIV-1 and helminth co-infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. AIDS, 2008. **22**(13): p. 1601-9.
6. Smits, H.H. and M. Yazdanbakhsh, *Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: Protection against development of allergic disorders?* Ann Med, 2007. **39**(6): p. 428-39.
7. Amarasekera, M., et al., *Impact of helminth infection on childhood allergic diseases in an area in transition from high to low infection burden*. Asia Pac Allergy, 2012. **2**(2): p. 122-8.
8. Verweij, J.J., et al., *Simultaneous detection and quantification of Ancylostoma duodenale, Necator americanus, and Oesophagostomum bifurcum in fecal samples using multiplex real-time PCR*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(4): p. 685-90.
9. WHO (2006) *Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers*. Geneva: World Health Organization. pp 1-62.
10. WHO. *Soil-transmitted helminthiasis. Eliminating soil-transmitted helminthiasis as a public health problem in children: Progress report 2001–2010 and strategic plan 2011–2020*. Geneva: World Health Organisation; 2012. .
11. Bergquist, R., M.V. Johansen, and J. Utzinger, *Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when?* Trends Parasitol, 2009. **25**(4): p. 151-6.
12. Verweij, J.J., et al., *Molecular diagnosis of Strongyloides stercoralis in faecal samples using real-time PCR*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. **103**(4): p. 342-6.
13. ten Hove, R.J., et al., *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of Schistosoma mansoni and S. haematobium infection in stool samples collected in northern Senegal*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008. **102**(2): p. 179-85.
14. Basuni, M., et al., *A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **84**(2): p. 338-43.
15. *tanzania-administrative-map*;
<http://www.nationsonline.org/maps/tanzania-administrative-map.jpg>,
zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.

16. The World Bank. Tanzania; <http://data.worldbank.org/country/tanzania>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
17. Ziegelbauer, K., et al., *Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis*. PLoS Med, 2012. **9**(1): p. e1001162.
18. Becker, S.L., et al., *Diagnosis, clinical features, and self-reported morbidity of Strongyloides stercoralis and hookworm infection in a Co-endemic setting*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(8): p. e1292.
19. Lustigman, S., et al., *A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1582.
20. Utzinger, J. and J. Keiser, *Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control*. Expert Opin Pharmacother, 2004. **5**(2): p. 263-85.
21. Bethony, J., et al., *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm*. Lancet, 2006. **367**(9521): p. 1521-32.
22. Little, M.P., et al., *Association between microfilarial load and excess mortality in onchocerciasis: an epidemiological study*. Lancet, 2004. **363**(9420): p. 1514-21.
23. Montresor A, Crompton DWT, Hall A, Bundy DAP, Savioli L (1998) *Guidelines for the evaluation of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis at community level. A guide for managers of control programmes*. Geneva: World Health Organization. pp 1–45.
24. Yamey, G. and E. Torreele, *The world's most neglected diseases*. BMJ, 2002. **325**(7357): p. 176-7.
25. Woolhouse, M.E., *Patterns in parasite epidemiology: the peak shift*. Parasitol Today, 1998. **14**(10): p. 428-34.
26. Christian, P., S.K. Khatry, and K.P. West, Jr., *Antenatal anthelmintic treatment, birthweight, and infant survival in rural Nepal*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 981-3.
27. Hotez, P.J. and M.T. Ferris, *The antipoverty vaccines*. Vaccine, 2006. **24**(31-32): p. 5787-99.
28. Hotez, P.J., et al., *Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria*. PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e102.
29. Salcedo-Cifuentes, M., et al., *Intestinal parasitism prevalence amongst children from six indigenous communities residing in Cali, Colombia*. Rev Salud Publica (Bogota), 2012. **14**(1): p. 156-68.
30. Ugbomoiko, U.S., et al., *Concurrent urinary and intestinal schistosomiasis and intestinal helminthic infections in schoolchildren in Ilobu, South-western Nigeria*. Acta Trop, 2012. **123**(1): p. 16-21.
31. Tchuem Tchuente, L.A., et al., *Polyparasitism with Schistosoma haematobium and soil-transmitted helminth infections among school children in Loum, Cameroon*. Trop Med Int Health, 2003. **8**(11): p. 975-86.
32. Demissie, F., et al., *Assessment of public health implication of malaria-geohelminth co-infection with an emphasis on hookworm-malaria anemia among suspected malaria patients in asendabo, southwest Ethiopia*. Ethiop Med J, 2009. **47**(2): p. 153-8.
33. Kirby, T., *David Molyneux: raising the profile of neglected tropical diseases*. Lancet, 2010. **375**(9708): p. 21.

34. *Water related diseases Ascariasis*. [WHO]; http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/ascariasis/en/, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
35. Simon Brooker and Donald A.P. Bundy. *Soil-transmitted Helminths (Geohelminths)*. In Gordon C. Cook, MD, DSc and Alimuddin I. Zumla, BSc, MBChB, MSc, PhD(Lond). *Manson's Tropical Diseases*, 22nd Edition. Elsevier, 2009: 1515-1540.
36. Wikipedia, *Die freie Enzyklopädie*. *Ascaris lumbricoides*; http://en.wikipedia.org/wiki/Ascaris_lumbricoides, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
37. *Textbook of Diagnostic Microbiology 2nd Edition* by Mahon, Connie, Manuselis Jr. MA MT(ASCP), George, Mahon, Co published by Saunders (2000).
38. *Hookworms*; <http://www.parasitesinhumans.org/hookworms.html>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
39. Lwambo, N.J., D.A. Bundy, and G.F. Medley, *A new approach to morbidity risk assessment in hookworm endemic communities*. *Epidemiol Infect*, 1992. **108**(3): p. 469-81.
40. Olsen, A., et al., *Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases?* *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009. **103**(10): p. 967-72.
41. *Neglected tropical diseases. Strongyloidiasis*; http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/strongyloidiasis/en/, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
42. Gill, G.V., et al., *Chronic Strongyloides stercoralis infection in former British Far East prisoners of war*. *QJM*, 2004. **97**(12): p. 789-95.
43. Krolewiecki, A.J., et al., *A public health response against Strongyloides stercoralis: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. **7**(5): p. e2165.
44. *Schistosomiasis- Fact sheet N°115*, January 2012; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
45. Andrew Davis. *Schistosomiasis*. In Gordon C. Cook, MD, DSc and Alimuddin I. Zumla, BSc, MBChB, MSc, PhD(Lond). *Manson's Tropical Diseases*, 22nd Edition. Elsevier, 2009: Chapter 82.
46. Ralph Muller, D.W., *Worms and Human Disease*, 2nd Edition. 2002, New York: Cabi Publishing.
47. Allemann, A., P. Bauerfeind, and N. Gyr, *Prevalence of hookworm infection, anaemia and faecal blood loss among the Yupno people of Papua New Guinea*. *P N G Med J*, 1994. **37**(1): p. 15-22.
48. Kawai, K., et al., *Geophagy (Soil-eating) in relation to Anemia and Helminth infection among HIV-infected pregnant women in Tanzania*. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. **80**(1): p. 36-43.
49. Vadlamudi, R.S., D.S. Chi, and G. Krishnaswamy, *Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome*. *Clin Mol Allergy*, 2006. **4**: p. 8.
50. Ross, A.G., et al., *Katayama syndrome*. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(3): p. 218-24.
51. Cao, J., et al., *Endoscopic findings and clinicopathologic characteristics of colonic schistosomiasis: a report of 46 cases*. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(6): p. 723-7.
52. Zaghloul, M.S., *Bladder cancer and schistosomiasis*. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2012. **24**(4): p. 151-9.

53. Moran, M., et al., *Neglected disease research and development: how much are we really spending?* PLoS Med, 2009. **6**(2): p. e30.
54. McCarthy, J.S., et al., *A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1601.
55. Cringoli, G., *FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique.* Parassitologia, 2006. **48**(3): p. 381-4.
56. Glinz, D., et al., *Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for Schistosoma mansoni and soil-transmitted helminths.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(7): p. e754.
57. *WHO (2008) Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation. 18-19 August 2008; Salvador, Bahia, Brazil.*
58. Requena-Mendez, A., et al., *The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review.* PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(1): p. e2002.
59. Katz, N., A. Chaves, and J. Pellegrino, *A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1972. **14**(6): p. 397-400.
60. Dacombe, R.J., et al., *Time delays between patient and laboratory selectively affect accuracy of helminth diagnosis.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2007. **101**(2): p. 140-5.
61. Koga, K., et al., *A modified agar plate method for detection of Strongyloides stercoralis.* Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(4): p. 518-21.
62. *Strongyloidiasis/Image Gallery/Filariform (L3) larva of S. stercoralis in an unstained wet mount;*
<http://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/gallery.html#adults>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
63. Pawlowski Z.S., Schad G.A., Stott G.J. (1991). *Hookworm infection and anaemia : approaches to prevention and control.* Geneva: World Health Organization. .
64. Adenusi, A.A., *The distribution of Necator americanus and Ancylostoma duodenale among schoolchildren in Lagos, Nigeria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997. **91**(3): p. 270.
65. *Hookworm/Image Gallery/Hookworm eggs/Figure A;*
<http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/gallery.html#eggs>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
66. *Ascariasis/Image Gallery/A. lumbricoides fertilized eggs/Figure C;*
<http://www.cdc.gov/dpdx/ascariasis/gallery.html#ferteggs>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
67. Teesdale, C.H., K. Fahringer, and L. Chitsulo, *Egg count variability and sensitivity of a thin smear technique for the diagnosis of Schistosoma mansoni.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1985. **79**(3): p. 369-73.
68. Feldmeier, H. and G. Poggensee, *Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review.* Acta Trop, 1993. **52**(4): p. 205-20.
69. Talla, I., A. Kongs, and P. Verle, *Preliminary study of the prevalence of human schistosomiasis in Richard-Toll (the Senegal river basin).* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(2): p. 182.
70. *Schistosomiasis infection/Image Gallery/Schistosoma mansoni eggs./Figure F;*
<http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/gallery.html#mansoni>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.

71. *Schistosomias infection/Image Gallery/Schistosoma haematobium eggs./Figure C*;
<http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/gallery.html#haemaeggs>,
zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
72. Booth, M., et al., *The influence of sampling effort and the performance of the Kato-Katz technique in diagnosing Schistosoma mansoni and hookworm co-infections in rural Cote d'Ivoire*. Parasitology, 2003. **127**(Pt 6): p. 525-31.
73. Berhe, N., et al., *Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with Schistosoma mansoni*. Acta Trop, 2004. **92**(3): p. 205-12.
74. Kongs, A., et al., *The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating S. mansoni infections*. Trop Med Int Health, 2001. **6**(3): p. 163-9.
75. Knopp, S., et al., *Changing patterns of soil-transmitted helminthiasis in Zanzibar in the context of national helminth control programs*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **81**(6): p. 1071-8.
76. Ebrahim, A., et al., *Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of Schistosoma mansoni infection*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **57**(6): p. 706-8.
77. Siddiqui, A.A. and S.L. Berk, *Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(7): p. 1040-7.
78. Doenhoff, M.J., P.L. Chiodini, and J.V. Hamilton, *Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?* Trends Parasitol, 2004. **20**(1): p. 35-9.
79. van Dam, G.J., et al., *Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5458-61.
80. Stothard, J.R., et al., *An evaluation of urine-CCA strip test and fingerprick blood SEA-ELISA for detection of urinary schistosomiasis in schoolchildren in Zanzibar*. Acta Trop, 2009. **111**(1): p. 64-70.
81. *"The Nobel Prize in Chemistry 1993"*;
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
82. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
83. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
84. *United States Patent Mullis et al. System for automated performance of the polymerase chain reaction*; <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?patentnumber=5656493>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
85. *File: Polymerasekettenreaktion.svg*;
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerasekettenreaktion.svg>,
zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
86. Geerts, S. and B. Gryseels, *Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 207-22.
87. Hotez, P.J., et al., *Hookworm: "the great infection of mankind"*. PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e67.

88. Datry, A., et al., *Treatment of Strongyloides stercoralis infection with ivermectin compared with albendazole: results of an open study of 60 cases*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(3): p. 344-5.
89. Khieu, V., et al., *Diagnosis, treatment and risk factors of Strongyloides stercoralis in schoolchildren in Cambodia*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(2): p. e2035.
90. Soukhathammavong, P.A., et al., *Low efficacy of single-dose albendazole and mebendazole against hookworm and effect on concomitant helminth infection in Lao PDR*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(1): p. e1417.
91. Schneider, B., et al., *A history of hookworm vaccine development*. Hum Vaccin, 2011. **7**(11): p. 1234-44.
92. Utzinger, J., et al., *Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution*. Parasitology, 2009. **136**(13): p. 1859-74.
93. *Mit Genehmigung des Herausgebers. Proportion of children (1-14 years of age) in the country requiring preventive chemotherapy (PC) for soil-transmitted helminthiases, worldwide, 2011; http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/STH_2011_global.png, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.*
94. de Silva, N.R., et al., *Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture*. Trends Parasitol, 2003. **19**(12): p. 547-51.
95. Sangare, L.R., et al., *Species-specific treatment effects of helminth/HIV-1 co-infection: a systematic review and meta-analysis*. Parasitology, 2011. **138**(12): p. 1546-58.
96. Assefa, S., et al., *Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 155.
97. Babatunde, S.K., et al., *Prevalence of intestinal parasitic infestation in HIV seropositive and seronegative patients in Ilorin, Nigeria*. Ann Afr Med, 2010. **9**(3): p. 123-8.
98. Sammet, S., et al., *Triple worm infestation in an HIV-infected patient*. Infection, 2013.
99. Karanja, D.M., et al., *Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with Schistosoma mansoni and human immunodeficiency virus coinfections*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **56**(5): p. 515-21.
100. Fontanet, A.L., et al., *Epidemiology of HIV and Schistosoma mansoni infections among sugar-estate residents in Ethiopia*. Ann Trop Med Parasitol, 2000. **94**(2): p. 145-55.
101. Mwanakasale, V., et al., *Interactions between Schistosoma haematobium and human immunodeficiency virus type 1: the effects of coinfection on treatment outcomes in rural Zambia*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(4): p. 420-8.
102. Walson, J.L. and G. John-Stewart, *Treatment of helminth co-infection in individuals with HIV-1: A systematic review of the literature*. PLoS Negl Trop Dis, 2007. **1**(3): p. e102.
103. *MBEYA DISTRICT SOCIO-ECONOMIC PROFILE; <http://www.tzonline.org/pdf/Mbeyadis.pdf>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.*
104. *2002 Regional Census Results, Tanzania, Mbeya; <http://web.archive.org/web/20070610162106/http://www.tanzania.go.tz/census/census/mbeya.htm>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.*

105. Mbeya Region/Climate and Zones;
<http://www.mbeya.go.tz/mbeya/about/category/climate>, zuletzt aufgerufen am: 04.11.2014.
106. Landis, J.R. and G.G. Koch, *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics, 1977. **33**(1): p. 159-74.
107. World Health Organization (1993) *The Control of Schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. World Health Organization Technical Report Series, no. 830. WHO, Geneva.*
108. Keiser, J. and J. Utzinger, *Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2008. **299**(16): p. 1937-48.
109. Nontasut, P., et al., *Prevalence of strongyloides in Northern Thailand and treatment with ivermectin vs albendazole*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2005. **36**(2): p. 442-4.
110. Stete, K., et al., *Dynamics of Schistosoma haematobium egg output and associated infection parameters following treatment with praziquantel in school-aged children*. Parasit Vectors, 2012. **5**(1): p. 298.
111. Knopp, S., et al., *Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(11): p. e331.
112. Chungu, R.N., P.N. Karumba, and E.O. Andala, *Hookworm species in patients from Kenyatta National Hospital Nairobi*. Ann Trop Med Parasitol, 1986. **80**(1): p. 147-8.
113. Knopp, S., et al., *Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and Strongyloides stercoralis infections in Tanzania*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **90**(3): p. 535-45.
114. Schar, F., et al., *Evaluation of real-time PCR for Strongyloides stercoralis and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia*. Acta Trop, 2013. **126**(2): p. 89-92.
115. Basuni, M., et al., *Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR*. Trop Biomed, 2012. **29**(3): p. 434-42.
116. Knopp, S., et al., *Diagnostic accuracy of Kato-Katz and FLOTAC for assessing anthelmintic drug efficacy*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(4): p. e1036.
117. Steinmann, P., et al., *Efficacy of single-dose and triple-dose albendazole and mebendazole against soil-transmitted helminths and Taenia spp.: a randomized controlled trial*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25003.
118. Kallestrup, P., et al., *Schistosomiasis and HIV-1 infection in rural Zimbabwe: implications of coinfection for excretion of eggs*. J Infect Dis, 2005. **191**(8): p. 1311-20.

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Weltweite Krankheitslast durch Helminthosen und deren Verbreitung | 12 |
| Tabelle 2: Allgemeine Informationen zu den von uns gesuchten Helminthen | 14 |
| Tabelle 3: Symptome und klinische Manifestation verschiedener Helmintheninfektionen | 21 |
| Tabelle 4: Zur Verfügung stehende Diagnostikverfahren | 24 |
| Tabelle 5: Bisherige Diagnostikverfahren für die verschiedenen Stadien einer Wurmerkrankung | 25 |
| Tabelle 6: Verwendete Primer und Sonden für die Real-Time-PCR | 41 |
| Tabelle 7: WHIS-Probandenregistrierung nach HIV- und Wurmstatus | 47 |
| Tabelle 8: Einzelne Organismen mit dazugehöriger, als optimal ermittelter, Primerpaar- und Sondenkonzentration | 62 |
| Tabelle 9: Externe Qualitätssicherung am mikrobiologischen Labor der Universität Leiden | 64 |
| Tabelle 10: Anzahl der für die RT-PCR eingefrorenen Stuhlproben von allen 298 WHIS-Teilnehmern und Infektionsstatus dieser | 65 |
| Tabelle 11: Vorliegende Infektionsstärke bei unseren Probanden nach WHO-Kriterien | 66 |
| Tabelle 12: Übereinstimmung der einzelnen Testverfahren mit Hilfe der Cohen-Kappa-Statistik (%) | 69 |
| Tabelle 13: Chi-Quadrattest: Statistische Analyse der unterschiedlichen Detektionsraten von Real-Time-PCR und dem parasitologischen Mikroskopieverfahren KK für <i>N. americanus</i> , <i>A. lumbricoides</i> und Schistosomen | 70 |
| Tabelle 14: Chi-Quadrattest: Statistische Analyse der unterschiedlichen Detektionsraten von Real-Time-PCR und dem parasitologischen Mikroskopieverfahren MIF für <i>N. americanus</i> , <i>A. lumbricoides</i> und Schistosomen | 70 |
| Tabelle 15: Übereinstimmung zwischen KK und RT-PCR | 71 |
| Tabelle 16: Übereinstimmung zwischen MIF und RT-PCR | 72 |
| Tabelle 17: Übereinstimmung von MIF und KK | 73 |
| Tabelle 18: Infektionen die ohne bestimmte Verfahren übersehen worden wären | 74 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 19: Zusätzlich detektierte Infektionen..... | 76 |
| Tabelle 20: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus bei den Probanden nach RT-PCR-Ergebnis (n=179) | 82 |
| Tabelle 21: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus bei den Probanden (n=179) nach Pseudogoldstandartergebnis (inklusive <i>Trichuris trichuria</i>) | 82 |
| Tabelle 22: Persistierende Infektionsfälle nach Behandlung | 83 |
| Tabelle 23: Behandlungserfolge nach einer Einmaldosis Albendazol + Praziquantel | 84 |

7.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Tansania in Ostafrika..... | 10 |
| Abbildung 2: Lebenszyklus des Spulwurms <i>Ascaris lumbricoides</i> | 16 |
| Abbildung 3: Lebenszyklus der Hakenwürmer <i>Necator americanus</i> und <i>Ancylostoma duodenale</i> | 17 |
| Abbildung 4: Lebenszyklus der Pärchenegel <i>Schistosoma mansoni</i> und <i>Schistosoma haematobium</i> | 20 |
| Abbildung 5: Filariforme (L3) Larve von <i>Strongyloides stercoralis</i> | 26 |
| Abbildung 6: Hakenwurmei bei 400-facher Vergrößerung..... | 27 |
| Abbildung 7: Befruchtetes Ei von <i>A. lumbricoides</i> in einem ungefärbten Stuhlpräparat bei 200-facher Vergrößerung..... | 27 |
| Abbildung 8: <i>S. mansoni</i> Ei in einer ungefärbten Stuhlmikroskopie | 28 |
| Abbildung 9: <i>S. haematobium</i> Ei in einer mikroskopierten Urinprobe mit einem charakteristischen terminalen Stachel..... | 29 |
| Abbildung 10: Bildliche Darstellung des PCR- Reaktionsverlaufs im Thermocycler..... | 31 |
| Abbildung 11: Anteil an Kindern (1-14 Jahre), die eine präventive Chemotherapie gegen Soil-transmitted Helminths (<i>Ascaris lumbricoides</i> , Hakenwürmer, <i>Trichuris trichuria</i>) benötigen..... | 36 |
| Abbildung 12: Die Region Mbeya ist in acht Distrikte unterteilt | 42 |
| Abbildung 13: Prävalenz von Helminthosen und HIV-Infektionen nach Region in Mbeya (in absteigender Reihenfolge nach mittlerer Höhenlage, Santyilia=2020 m, Kyela=480 m) | 43 |
| Abbildung 14: Studiendesign..... | 45 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 15: Die Verarbeitung der Stuhlproben und die Durchführung der RT-PCR wurden am MMRC-Labor durchgeführt..... | 46 |
| Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der WHIS-Studie und Vorgehen bei den einzelnen Besuchen | 48 |
| Abbildungen 17 und 18: Einzelne Teilschritte der Kato-Katz-Methode. Die parasitologischen Verfahren und die Mikroskopie wurden von geschulten, erfahrenen Mitarbeitern des NIMR-MMRC durchgeführt..... | 50 |
| Abbildungen 19 und 20: Beim KK-Verfahren wird der Stuhl zunächst auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem quadratischen Zellglas, welches mit Glycerin durchtränkt ist, abgedeckt. Im Anschluss an diese Aufbereitung werden die Wurmeier und Larven unter dem Mikroskop gezählt. Die durchschnittlich gezählte Eizahl beider Teilproben wird mit 24 multipliziert, um die Eizahl pro Gramm Stuhl zu erhalten..... | 51 |
| Abbildung 21: Raumschema mit Wegrichtung, um Kontaminationen zu vermeiden..... | 53 |
| Abbildung 22: Räumlichkeit zur Präparation des Mastermix (Raum 1). Zur Gewährleistung von Kontaminationsfreiheit kommen UV-Lampen zur Zerstörung von Nukleinsäuren zum Einsatz..... | 54 |
| Abbildung 23: Raum 3 - Rotorgene 6000 Thermocycler der Firma Corbett Life Science. Durchführung des Real-Time-PCR-Laufs und anschließende Auswertung am Computer..... | 54 |
| Abbildung 24: Extraktionsraum. Isolierung der DNA aus Stuhlproben unter der Abzugshaube | 55 |
| Abbildung 25: Mehrere Spinsäulen bei der DNA-Extraktion | 57 |
| Abbildung 26: Die extrahierte DNA wurde bis zur Durchführung der RT-PCR bei -20°Celsius gelagert..... | 57 |
| Abbildung 27: Optimierung der Primerkonzentration am Beispiel der Schistosomenprimerpaare..... | 63 |
| Abbildung 28: Mit den drei angewandten Verfahren detektierte Wurm��pezies im Vergleich..... | 67 |
| Abbildung 29: Übereinstimmung der verschiedenen Verfahren mit dem Pseudogoldstandard..... | 68 |
| Abbildung 30: Von 50 WHIS-Baseline-Stuhlproben ausgehender Vergleich der RT-PCR und KK-Ergebnisse. Auf der x-Achse ist die Wurm��pezies, auf der y-Achse die Anzahl infizierter Proben dargestellt..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 31: Die Detektion von Schistosomen-DNA in der RT-PCR geht mit höheren Schistosomeneizahlen in der KK-Mikroskopie einher..... | 77 |
| Abbildung 32: Die Detektion von Hakenwurmeiern mit der MIF-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher..... | 78 |
| Abbildung 33: Die Detektion von Hakenwurmeiern mit der KK-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher..... | 79 |
| Abbildung 34: Die Detektion von Schistosomeneiern mit der MIF-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher..... | 79 |
| Abbildung 35: Die Detektion von Schistosomeneiern mit der KK-Mikroskopie geht mit einem niedrigeren CT-Wert in der RT-PCR einher..... | 80 |
| Abbildung 36: Häufigkeit von Mono- und Polyparasitismus in RT-PCR und Mikroskopie ohne Berücksichtigung von <i>Trichuris trichuria</i> (drei weitere Koinfektionen in Mikroskopie)..... | 81 |
| Abbildung 37: Erregerspektrum der 47 HIV-positiven Probanden..... | 85 |
| Abbildung 38: Die Schwere einer Schistosomeninfektion korreliert nicht mit dem HIV-Infektionsstatus..... | 86 |

7.4 Abkürzungen

| | |
|------------------------|---|
| A. duodenale | Ancylostoma duodenale |
| Ak | Antikörper |
| A. lumbricoides | Ascaris lumbricoides |
| AIDS | Acquired immunodeficiency syndrome (Erworbenes Immundefektsyndrom) |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CD4 | Cluster of Differentiation 4 (Glykoprotein an der Oberfläche von Zellen des Immunsystems) |
| CR | Cure Rate (Heilungsrate) |
| CT | Cycle Threshold |
| DFG | Deutsche Forschungsgesellschaft |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay (antikörperbasiertes Nachweisverfahren) |
| EMINI | Establishment of the infrastructure for the Evaluation and Monitoring of the Impact of New Interventions |
| EPG | Eggs per gram (Eier pro Gramm Stuhl) |
| ERR | Egg Reduction Rate (Reduktion der mittleren Eizahl) |
| FLOTAC® | Patentiertes Gerät, das eine Flotation durch Zentrifugation mit anschließender Zählung der Parasiten in zwei Kammern ermöglicht |
| GI | Gastrointestinal |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| IDEA | Dissecting the Immunological Interplay between Poverty Related Diseases and Helminth Infections: An African-European Initiative |
| IgE | Immunglobulin E |
| KK | Kato-Katz (spezifisches Laborverfahren zur Vorbereitung von Stuhlproben auf die parasitologische Mikroskopie) |
| MDA | Mass Drug Administration (Massenbehandlung bestimmter Bevölkerungsgruppen mit Chemotherapeutika) |
| MIF | Merthiolat-Jod-Formalin (spezifisches Laborverfahren zur Vorbereitung von Stuhlproben auf die parasitologische Mikroskopie) |
| MMRC | Mbeya Medical Research Center |
| MRC/UVRI | Medical Research Council/ Uganda Virus Research Institute |
| N. americanus | Necator americanus |
| NIMR | National Institute for Medical Research |

| | |
|------------------------------------|---|
| NTD | Neglected Tropical Disease (Vernachlässigte Krankheiten) |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PhHV-1 | Phocines Herpesvirus, nicht-humane Virus-DNA zur Inhibitionskontrolle des DNA-Extraktionsvorgangs |
| PVPP | Polyvinylpolypyrrolidone |
| p-Wert | Signifikanzwert (engl. probability=Wahrscheinlichkeit) |
| Ref. | Referenzen |
| RNA | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| r.p.m. | Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT-PCR | Real-Time-Polymerase Chain Reaction (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) |
| S. mansoni/ haematobium | Schistosoma mansoni/haematobium |
| STH | Soil-transmitted Helminth |
| WHIS | Worm-HIV-Intervention-Study |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7.5 Eidesstattliche Versicherung

Benninghoff, Myrna

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Etablierung und Evaluierung eines molekularen
Wurmdiagnostikverfahrens (Real-Time-PCR) in Tansania**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,