

Aus der
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Michael Hölscher von Lovenberg

Detektion gastrointestinaler Erreger auf Haemocult[®]-Karten mittels Multiplex- PCR

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Abraham Nicklas Schlenker
aus St. Johann Gächingen

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Dieter Nothdurft

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bärbel Stechner-Letsch
PD Dr. Dimitrios Frangoulidis

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Alberer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Detection of Gastrointestinal Pathogens from Stool Samples on
Haemocult Cards by Multiplex PCR**

Martin Alberer, Nicklas Schlenker, Malkin Bauer, Kerstin Helfrich, Carolin Mengele, Thomas Löscher, Hans Dieter Nothdurft, Gisela Bretzel, Marcus Beissner

Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology
Volume 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Reisemedizin in einer globalisierten Welt	6
1.2	Traveller's Diarrhea.....	7
1.3	Schwierigkeiten in der Traveller's Diarrhea-Diagnostik.....	8
1.4	Zielsetzung	11
2	Material und Methode.....	13
2.1	Überblick: Verdünnungs- und Lagerungsreihen	13
2.2	Technische Grundlagen.....	14
2.3	Verdünnungsreihen	15
2.3.1	Präparation der Stuhlmatrizen	15
2.3.2	Anzucht von <i>Campylobacter jejuni</i>	15
2.3.3	Anzucht von <i>Entamoeba histolytica</i>	16
2.3.4	Quantifizierung der Mikroorganismen	16
2.3.5	Erstellen der <i>Campylobacter jejuni</i> -Verdünnungsreihe.....	18
2.3.6	Erstellen der <i>Entamoeba histolytica</i> -Verdünnungsreihe	20
2.3.7	Erstellen der <i>Norovirus</i> -Verdünnungsreihen	20
2.3.8	Erstellen der Stuhlkarten und Nativproben.....	22
2.3.9	Präparation der Extraktion.....	22
2.3.10	Extraktion der Verdünnungsreihen.....	24
2.4	Lagerungsreihen.....	26
2.4.1	Präparation der Stuhlmatrizen und Anzucht der Erreger	26
2.4.2	Beimpfung der Stuhlproben.....	27
2.4.3	Präparation der <i>Norovirus</i> -Stuhlproben	28
2.4.4	Erstellen der Stuhlkarten und Nativproben	28
2.4.5	Extraktion der Lagerungsreihen.....	29
2.5	Analyse mit dem Luminex® MAGPIX®	31
2.6	Nachtestung von Proben mit diskordanten Ergebnissen	34

2.7	Datenerfassung und -verarbeitung.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Verdünnungsreihen.....	35
3.1.1	Vorgehen bei der Auswertung.....	35
3.1.2	Ergebnisse der <i>Campylobacter jejuni</i> -Verdünnungsreihe.....	35
3.1.3	Ergebnisse der <i>Entamoeba histolytica</i> -Verdünnungsreihe.....	36
3.1.4	Ergebnisse der <i>Norovirus</i> -Verdünnungsreihen.....	36
3.2	Lagerungsreihen.....	38
3.2.1	Stabilität während der Lagerungsreihen.....	38
4	Diskussion.....	39
4.1	Zielsetzung.....	39
4.2	Verdünnungsreihen.....	39
4.3	Lagerungsreihen.....	41
4.4	Zu beachtende Punkte.....	42
4.5	Resümee.....	44
5	Zusammenfassung.....	45
6	Verzeichnisse.....	46
6.1	Literaturverzeichnis.....	46
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	48
6.3	Tabellenverzeichnis.....	48
6.4	Abkürzungen.....	49
7	Anhang.....	50
7.1	Ethikvotum.....	50
7.2	Danksagungen.....	50
7.3	Eidesstattliche Versicherung.....	51

1 Einleitung

1.1 Reisemedizin in einer globalisierten Welt

Die Zahl der Reisenden stieg in den letzten Jahrzehnten stark an. Im Jahr 2016 reisten über 1,2 Milliarden Menschen in ein anderes Land. Bis 2030 sollen es Berechnungen zufolge 1,8 Milliarden international Reisende werden [1]. Für die Medizin birgt dies neue Herausforderungen. Immer seltener ist das Ausbrechen von Krankheiten und Erregern ein lediglich ortsgebundenes Problem. Mit der wachsenden Mobilität der Menschen und Lebensmittel kann ein Pathogen innerhalb weniger Tage von einem Ende der Welt ans andere gelangen. So können zum einen exotische Krankheiten an unerwarteten Orten ausbrechen [2], zum anderen ermöglicht es aber auch das Aufeinandertreffen von Erregern unterschiedlicher Herkunft. Zwischen Pathogenen aus verschiedenen Ländern mit verschiedenen ökonomischen, hygienischen und therapeutischen Standards und Schwierigkeiten ist dann ein Austausch genetischer Informationen möglich. Dies hat weitreichende Folgen. Immer wieder tauchten in den vergangenen Jahren Erreger auf, die mit gängigen Antibiotika nicht mehr therapierbar waren [3]. Während die Pathogene immer neue Resistenzmechanismen gegen die verfügbaren Antibiotika entwickeln und untereinander teilen, geht die Entwicklung neuer Antibiotika nur langsam voran. In einem kürzlich veröffentlichten Report resümierte die WHO die momentan in Entwicklung befindlichen Antibiotika als unzureichend, um mit der Resistenzentwicklung der Erreger mithalten zu können [4]. Wollen wir den Erregern längerfristig nicht mittellos gegenüberstehen, müssen wir erfolgreicher im Umgang mit ihnen werden. Die Entstehung und Ausbreitung von Resistenzen müssen vermieden und die Entwicklung potenter Antibiotika ermöglicht werden. Und all dies in einer Welt, in der sich immer mehr Menschen inklusive ihrer Krankheitserreger um den Erdball bewegen. Wollen wir der Lage wieder Herr werden, gilt es möglichst viele Informationen über die Entstehung, das Vorkommen sowie die Ausbreitungsrouten der Erreger und ihrer Resistenzen zu besitzen. Viele Forschungsgruppen arbeiten seit Jahren daran, unser Wissen auf diesem Gebiet zu erweitern. Das GeoSentinel-Network, ein Netzwerk weltweit verteilter Reisekliniken, suchte so in einer großen Studie nach den häufigsten reiseassoziierten Erkrankungen. Hierbei wurden die Durchfallerkrankungen neben Hauterkrankungen und fieberhaften Systemerkrankungen als häufigste reiseassoziierte Krankheitsgruppe erkannt [5]. Speziell Reisende aus Ländern mit hohen hygienischen Standards scheinen hierbei sehr anfällig für die gastrointestinale Pathogene weniger entwickelter Länder zu sein. Unterschiede im Keimspektrum der jeweiligen Länder werden ursächlich vermutet [6, 7]. Bei mehr als 100 Millionen Personen, die aus Industrienationen jährlich in die Tropen reisen, werden so nicht wenige unerwünschte Reisemitbringsel in die Heimat importiert [8].

1.2 Traveller's Diarrhea

Definiert ist Traveller's Diarrhea (TD) - auch Reisedurchfall genannt - als das Auftreten von drei oder mehr ungeformten Stuhlgängen innerhalb von 24 Stunden in Kombination mit einem weiteren Symptom wie vermehrter Stuhldrang, Bauchkrämpfen, Fieber oder blutigen Durchfällen [9]. Verantwortlich für TD ist eine Vielfalt unterschiedlicher Erreger. In 75% der erfolgreich diagnostizierten Fälle wird TD durch bakterielle Erreger ausgelöst, allen voran *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., und *Campylobacter* spp. [10]. Virale Krankheitserreger, wie Noroviren und Rotaviren, verursachen bis zu 15% der TD Fälle [10-12]. Bei über 14 Tagen persistierenden Durchfällen sind oftmals Einzeller wie Giardien, *Entamoeba histolytica* oder andere intestinale Parasiten die Auslöser [12, 13].

Ein besonders hohes Erkrankungsrisiko weisen Rucksackreisende auf. Ursächlich werden vermehrt begangene Hygienefehler vermutet [14-16]. Während jedoch eine Studie zeigte, dass sich die Durchfallrate anhand der begangenen Hygienefehler bei der Auswahl von Essen und Getränken voraussagen ließ [16], konnten andere Studien keine Reduktion der Rate durch bestimmte Vorsichtsmaßnahmen feststellen [17]. Vielmehr zeigt sich, dass der allgemeine Hygienegrad im bereisten Land eine größere Rolle spielt, als bestimmte Präventionsmaßnahmen des Reisenden [17]. Empfehlungen wie „Boil it, cook it, peel it or forget it“ sind daher ungewiss in ihrer Effizienz, werden aber in Ermangelung von Alternativen dennoch empfohlen [15]. Weitere Einfluss-Faktoren scheinen die Jahreszeiten sowie das Wetter zu sein. Während sich in der Regenzeit ein höheres Risiko bakterieller Infektionen zeigt, steigt in der Trockenzeit die Zahl der viralen Infektionen [18]. Zudem hat, wie oben schon erwähnt, die Herkunft der Reisenden selbst einen großen Einfluss auf die Inzidenzraten. In Studien fanden sich bei Reisenden aus Entwicklungsländern deutlich geringere TD-Raten als bei den Reisenden aus Industrienationen. Ähnliche Keimspektren in den Heimatländern sowie ähnliche Nahrungsmittel werden als Ursache vermutet [7].

Die klinische Ausprägung von TD reicht von harmlosen, sich selbst limitierenden Episoden gastrointestinaler Beschwerden bis hin zu langjährigen gastrointestinalen und extraintestinalen Symptomen. In den meisten Fällen ist TD eine akute, sich selbst-limitierende Erkrankung [19]. Während 50% der Fälle innerhalb von 48 Stunden ohne ärztliches Eingreifen sistieren, erleiden allerdings zwischen 3 und 17% der Betroffenen ein postinfektiöses Reizdarmsyndrom [13, 19-24]. Zudem fanden Studien neben einem erhöhten Risiko an reaktiver Arthritis zu erkranken [25], auch deutlich erhöhte Trägerraten von Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Bildnern (ESBL) [26]. Speziell die antibiotische Therapie einer TD erwies sich in einer Studie als eigener Risikofaktor von ESBL-Bildnern besiedelt zu werden [27]. Bis zu 8% der Reisenden fühlen sich so krank, dass sie medizinische Hilfe im bereisten Land aufsuchen [28, 29]. Die Erkrankten können im Schnitt 24

Stunden ihre Reise nicht wie geplant fortsetzen [18, 30]. Insgesamt müssen 12 bis 46% der Betroffenen ihre Reisepläne ändern [31]. Dies ist besonders ärgerlich, da es sich bei Urlaub und Geschäftsreisen um eine Phase hoher Erwartungen handelt und die wirtschaftlichen sowie ideellen Schäden entsprechend schmerzhaft sind.

Während neue Studien zwar einen leichten Rückgang der TD Inzidenz zeigen und nicht mehr bis zu 60% aller Reisenden mancher Regionen erkranken, verliert das Thema durch die steigende Zahl international Reisender nicht an Aktualität [30-32]. Das Sinken der Inzidenz lässt sich vermutlich durch eine Verbesserung der Hygienestandards in einigen Ländern sowie die erfolgreiche Aufklärung der Reisenden erklären. Das Ansteckungsrisiko bleibt jedoch weiterhin bestehen und liegt je nach Reiseziel und -stil immer noch bei bis zu 30% in den ersten zwei Wochen [32]. Führt man sich nochmals die 100 Millionen Reisenden vor Augen, die sich jährlich aus den Industrienationen in Hochrisikogebiete begeben, lassen sich die enorme Zahl der Erkrankten sowie die damit verbundenen Ausbreitungsmöglichkeiten der Erreger begreifen [18].

1.3 Schwierigkeiten in der Traveller's Diarrhea-Diagnostik

Trotz der offensichtlichen Relevanz ist die Datenlage zur Ätiologie von TD unzureichend. Die erste Hürde bei der Erhebung präziser Daten ist das breite Spektrum der möglichen Erreger. Für die Detektion sämtlicher potenziell relevanter Bakterien, Viren und Parasiten ist eine Vielzahl verschiedener Tests notwendig. Üblicherweise wird zur Diagnostik von TD eine Kombination aus kultureller Anzucht, Mikroskopie, Antigennachweisen und molekularbiologischen Methoden eingesetzt. Testet man umfassend alle potenziell relevanten Erreger, führt dies zu einem enormen Arbeitsaufwand und hohen Kosten [33, 34]. Die praktikable Lösung, die Testung auf die häufigsten Erreger zu begrenzen, liegt nahe, birgt aber gewisse Gefahren in sich. Eine solche Eingrenzung der Tests ist aufgrund der oft unzureichend vorhandenen Informationen über die Erregersituation in den Reiseländern sowie die unspezifischen Symptome erschwert. Sie ist immer mit dem Risiko verbunden, den verantwortlichen Erreger zu übersehen [34]. Zudem ist TD oftmals die Folge von Co-Infektionen und entsprechend sind mehrere Erreger die Ursache der Symptome [35]. Therapieversager können die Folge sein.

Die zweite große Hürde stellt die häufig unzureichende medizinische Infrastruktur in Ländern mit hohen TD-Inzidenzraten dar. In jenen für die TD-Forschung besonders interessanten Ländern sind Labore mit der notwendigen Kapazität und Ausstattung zur umfassenden Diagnostik oftmals nicht ausreichend vorhanden. Zeitnah zum Symptombeginn entnommene Stuhlproben können so vor Ort nur selten präzise untersucht werden. Die Alternative, der Transport der Stuhlproben in ein Labor

mit ausreichenden Kapazitäten in der Heimat, birgt weitere Hürden. Damit die Diagnostik einer frischen Stuhlprobe zu einem späteren Zeitpunkt überhaupt möglich ist, sollte sie baldmöglichst eingefroren werden. Während eine eintägige Lagerung bei Raumtemperatur noch zu verhältnismäßig korrekten Ergebnissen bei der Analyse der Stuhlprobe führt, kommt es spätestens nach vier Tagen zu deutlichen Abweichungen [36]. Für den Transport in ein modernes Labor ist deshalb eine geschlossene Kühlkette notwendig. Entsprechende Kühlketten sind teuer und in den Ländern mit hohen TD-Raten oftmals logistisch nicht konsequent durchsetzbar. Kommt es zu Transportverzögerungen mit längerer Unterbrechung der Kühlung, ist die Probe nicht mehr verwertbar [37]. Der Transport einer korrekt gekühlten Stuhlprobe ist für den Reisenden zudem aufwendig und die Compliance verständlicherweise gering.

Entsprechend stehen für die TD-Forschung hauptsächlich Daten von nachträglich entnommenen Stuhlproben von Reiserückkehrern zur Verfügung. Da 50% der TD-Fälle nach 48 Stunden schon wieder von selbst abklingen, bleibt eine Vielzahl der Erkrankten durch die große zeitliche Verzögerung ohne Diagnose. Zwischen 10-40% der untersuchten Erkrankungsfälle bleiben somit ohne identifizierbaren Erreger [31, 38]. Besonders bei den viralen Erregern zeigt sich diese Problematik. Mehrere kürzlich veröffentlichte Studien kamen zu dem Ergebnis, dass Noroviren als TD-Auslöser vermutlich bislang deutlich unterschätzt wurden [11, 38, 39]. Je näher die TD-Symptomatik bezogen auf den Rückreisetermin auftrat und je geringer entsprechend die diagnostische Verzögerung war, desto höher war die Inzidenz einer Infektion mit Noroviren. Bei einem Symptombeginn innerhalb der letzten vier Tage vor dem Rückreisetermin konnte so eine Inzidenz von bis zu 21% gefunden werden [11]. Diese Unterschätzung des Risikos einer Norovirus-Erkrankung während der Reise stellt durchaus auch ein Gefahrenpotential bezüglich einer weiteren Verbreitung im Heimatland nach Reiserückkehr dar. Neuere Studien zeigen, dass Noroviren im Durchschnitt noch 28 Tage nach dem Abklingen der Symptome kontinuierlich ausgeschieden werden [40]. Hierbei gilt zu bedenken, dass gerade bei Noroviren 10-100 Virenpartikel ausreichen, um eine symptomatische Infektion auszulösen [41]. Während Noroviren bei gesunden Erwachsenen nur zu einer äußerst unangenehmen, aber sich selbstlimitierenden Erkrankung führen, sind sie bei Kleinkindern und älteren Menschen mit Vorerkrankungen oft lebensbedrohlich.

In mehreren Studien der letzten Jahre wurden, anstatt der traditionellen Diagnostik-Tools, moderne Polymerase-Kettenreaktions-Detektionsmethoden (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) verwendet und als nützlich erkannt [11, 39]. Diese neuen Detektionsmethoden können ein Ansatz sein, die Problematik des breiten Erregerspektrums zu lösen. Mit entsprechenden Kits kann oftmals in einem einzelnen Multiplex-Ansatz auf eine große Anzahl verschiedener TD-Pathogenen getestet werden. Die Tests sind signifikant sensibler als traditionelle Diagnostik-Tools und finden oftmals auch die

geringeren Erregerkonzentrationen bei schon abklingenden Infektionen [33, 39, 42]. Auch das Problem der häufigen Co-Infektionen kann durch den Einsatz der breit ausgelegten PCR-Kits gelöst werden [35]. Sowohl Co-Infektionen als auch unerwartete Erreger lassen sich somit erfolgreich nachweisen [34]. Die größere Sensibilität der PCR-Kits verbessert zudem die Detektion der oftmals unterschätzten Noroviren. In Studien zeigte sich eine große Diskrepanz bezüglich der Noroviren-Inzidenz, je nachdem ob konventionelle Radioimmunoassays oder PCRs genutzt wurden [11, 43].

Leider löst die Nutzung von PCRs nur die erstgenannte Problematik der TD-Forschung. Das in der vorliegenden Studie genutzte Gastrointestinal Pathogene Panel (GPP) der Firma Luminex® ist noch recht neu auf dem Markt und mit etwa 80€ Materialkosten pro untersuchte Probe verbunden. Die Nutzung solcher PCR-Kits ist in den für TD interessanten Ländern aufgrund der Kosten wenig verbreitet. Entsprechend rar sind so auch Labore, die jene Tests anbieten. Die frischen Stuhlproben müssen somit immer noch in einer geschlossenen Kühlkette in das Heimatland gebracht werden. Dies ist wie bereits erwähnt teuer, umständlich und oftmals schlicht unmöglich. Hilfreich wäre folglich eine Methode, die es ermöglicht Stuhlproben kosteneffektiv, bei Raumtemperatur ohne Kühlketten stabil und für Reisende zumutbar über mehrere Wochen zu lagern und zu transportieren, so dass diese später im Heimatland analysiert werden können. Diese Methode sollte zudem in Kombination mit einer PCR funktionieren, welche die vielfältigen Auslöser von TD sensitiv, vollständig und möglichst unkompliziert detektieren kann.

1.4 Zielsetzung

In einem interessanten Ansatz zeigten Grimes et al. 2008, dass für TD relevante *E. coli*-Arten in auf Haemoccult®-Stuhlkarten gestrichenen Stuhlproben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, auch nach 14 Monaten noch korrekt mittels PCR detektiert werden konnten [37]. Primär sind Haemoccult®-Stuhlkarten dazu gedacht, Stuhlproben auf okkultes Blut zu untersuchen (guajakbasierter Stuhlbluttest). Sie besitzen in der Regel zwei Filterpapierfelder, auf welche die zu testende Stuhlprobe aufgetragen wird, sowie zum Verschluss einen Deckel aus Karton. Sie sind klein, billig, einfach zu handhaben und könnten während einer Reise hygienisch in einem Druckverschlussbeutel transportiert werden.

Interessant ist nun, ob sich nicht nur *E. coli* auf Stuhlkarten lagern lassen, sondern dies auch für weitere virale, bakterielle und parasitäre TD Erreger möglich ist. Zudem müsste das Verfahren in Kombination mit einem zum simultanen Nachweis der vielfältigen TD Erreger fähigen PCR-Kit funktionieren. Ein entsprechendes Kit stellt das kommerziell verfügbare xTAG® Gastrointestinal-Pathogen-Panel (GPP) der Firma Luminex® (Austin, Texas, USA) dar. Jenes ermöglicht den zeitgleichen Nachweis von 15 häufigen gastrointestinalen Krankheitserregern und reduziert somit wesentlich die Zeit für die Probestellung [34, 44, 45]. Sollte die Probennahme und Lagerung von Stuhlproben mit Bakterien, Viren und Parasiten auf Stuhlkarten funktionieren, könnte dies in Kombination mit dem GPP die Lösung der zweiten Hürde sein. In zukünftigen Studien wäre erstmals die Erhebung präziser Daten über TD möglich. Im Falle einer Durchfallerkrankung könnten die Reisenden während des Höhepunkts der Symptomatik eine Stuhlprobe auf eine Stuhlkarte auftragen und jene in einem Druckverschlussbeutel lagern. Die Karte würde dann entweder bis zur Reiserückkehr im Gepäck verstaut oder sogar an ein ausreichend modernes Labor gesandt werden können. Im Falle einer Symptompersistenz wäre dann eine für die Therapie verwendbare Stuhlprobe zur Zeit des Höhepunkts der Symptomatik vorhanden. Im Rahmen von Studien könnten zudem zeitnahe Stuhlproben der TD Episode analysiert werden und man müsste sich nicht mehr auf die Ergebnisse der Untersuchung abklingender oder sogar schon abgeklungener Infektionen verlassen. Eine bessere Aufklärung der Reisenden sowie die Entwicklung effizienter Verhaltensregeln, Chemoprophylaktika und Impfstoffen könnte möglich werden. Eine deutliche Abnahme der TD Inzidenz und der durch sie ausgelösten wirtschaftlichen sowie ideellen Schäden wären die Folgen. Die Ausbreitung sowie Entwicklung resistenter Erreger könnten analysiert und gezielt eingedämmt werden. Die frühzeitige Entdeckung neuer Resistenzen könnte Forschern die notwendige Zeit verschaffen, neue Antibiotika zu entwickeln.

Bei dieser Studie handelt es sich nun um einen Machbarkeitsnachweis. Sie überprüft die prinzipielle Tauglichkeit von Haemoccult®-Stuhlkarten als unkompliziertes Instrument für die Lagerung und den

Transport von Stuhlproben bei fehlender Kühlkette in Kombination mit dem xTAG® Gastrointestinal-Pathogen-Panel (GPP) der Firma Luminex®. Um die Kosten zu beschränken, wurden stellvertretend für die zahlreichen TD auslösenden Bakterien, Viren und Einzellern Stuhlproben genutzt, die *Campylobacter jejuni*, *Norovirus* GI / GII beziehungsweise *Entamoeba histolytica* enthielten.

2 Material und Methode

2.1 Überblick: Verdünnungs- und Lagerungsreihen

Um die Tauglichkeit der Haemocult®-Stuhlkarten als leicht zu handhabendes Transportbehältnis zu untersuchen, wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde in Verdünnungsreihen überprüft, ob es durch das Auftragen beziehungsweise die Extraktion der Stuhlproben vom Filterpapier der Stuhlkarten zu einer Abschwächung des Signals im Vergleich zu herkömmlich bei -20°C in Tubes gelagerten Stuhlproben kommt. Anschließend wurde in Lagerungsreihen untersucht, ob sich die auf Stuhlkarten bei Raumtemperatur gelagerten Erreger auch noch nach definierten zeitlichen Intervallen erfolgreich detektieren lassen. Stellvertretend für die potenziell vorkommenden bakteriellen, viralen und parasitären Durchfallerreger wurden Stuhlproben mit *Campylobacter jejuni*, Noroviren GI / GII und *Entamoeba histolytica* genutzt.

Für die Verdünnungsreihen wurden Stuhlmatrizen mit *Campylobacter* beziehungsweise *Entamoeba histolytica* beimpft sowie auf Noroviren positiv getestete Stuhlproben verwendet. Von diesen Stuhlproben wurden Verdünnungen mit abnehmender Erregerkonzentration erstellt und auf Stuhlkarten aufgetragen. Dieselben Proben wurden gleichzeitig in Tubes bei -20°C (*Campylobacter* & *Entamoeba histolytica*) beziehungsweise -80°C (Noroviren) wie in einer konventionellen Kühlkette gelagert. Nachdem die Stuhlproben auf den Filterpapierfeldern getrocknet waren, wurden sowohl die eingefrorenen Stuhlproben als auch jene auf den Stuhlkarten extrahiert, analysiert und die Ergebnisse der einzelnen Verdünnungsschritte in den Tubes und auf dem Filterpapier miteinander verglichen.

Im folgenden Lagerungsversuch wurden erneut Stuhlkarten mit Stuhlproben versehen, die wieder stellvertretend für die potenziell auftretenden bakteriellen, viralen und parasitäre Durchfallerreger *Campylobacter jejuni*, Noroviren GI / GII oder *Entamoeba histolytica* enthielten. Die Stuhlkarten wurden getrocknet, in Druckverschlussbeutel verpackt und bei Raumtemperatur (20°C) bis zu sechs Wochen gelagert. In wöchentlichen Abständen wurde jeweils ein technisches Duplikat extrahiert und analysiert. Es wurde so zum Zeitpunkt Null sowie nach 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tagen auf dem Filterpapier der Stuhlkarten nach den Erregern gesucht und ermittelt, ob es im Laufe der Zeit zu einer Abnahme der Nachweisbarkeit kommt. Zum Zeitpunkt Null wurden zudem sämtliche Stuhlmatrizen im beimpften sowie nicht beimpften Zustand, die *Norovirus*-Stuhlproben und die Erregersuspensionen, welche herkömmlich in Tubes im Gefrierschrank bei -20°C beziehungsweise im Falle der Noroviren bei -80°C gelagert worden waren, analysiert.

Für die Extraktionen wurde ein MiniMag (BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) genutzt, für die spätere Analyse das MAGPIX® (Luminex®, Austin, Texas, USA) in Kombination mit dem xTAG® Gastrointestinal-Pathogen-Panel (GPP, Luminex®, Austin, Texas, USA).

2.2 Technische Grundlagen

Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank Klasse II durchgeführt.

Eine Stuhlprobe, die bis zur Extraktion konventionell in Tubes tiefgefroren gelagert und folglich nicht auf Haemoccult®-Stuhlkarten aufgetragen wird, wird im Rahmen dieser Studie als „Nativprobe“ bezeichnet.

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Haemoccult®-Stuhlkarten der Firma Beckman Coulter® werden der Übersichtlichkeit halber fortan schlicht „Stuhlkarten“ genannt. Sämtliche im Folgenden vorgestellte Versuche wurden ausschließlich mit Haemoccult®-Stuhlkarten der Firma Beckman Coulter® durchgeführt. Entsprechend können keine Aussagen über die Tauglichkeit ähnlicher Produkte anderer Hersteller getroffen werden.

2.3 Verdünnungsreihen

2.3.1 Präparation der Stuhlmatrizen

2.3.1.1 Material

- 3 Stuhlproben

2.3.1.2 Durchführung

Drei irreversibel anonymisierte Stuhlproben aus dem Labor der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität München (AITM, akkreditiert nach DIN EN ISO 15189) wurden als Matrizen für die Verdünnungsversuche genutzt. Die drei Stuhlproben waren im Labor der AITM mit Routine-Kulturen auf bakterielle Durchfallerreger und mikroskopisch auf intestinale Parasiten negativ getestet worden. Diese Proben wurden später halbiert und zur Hälfte jeweils mit *Campylobacter spp.* beziehungsweise mit *Entamoeba histolytica* beimpft. Nach der Testung lagerten die Proben bis zu ihrer weiteren Nutzung im Rahmen der Studie bei -20°C im Gefrierschrank.

2.3.2 Anzucht von *Campylobacter jejuni*

2.3.2.1 Material

- *Campylobacter jejuni sp. jejuni* (DSM Nummer 4688 März 2009)
- Columbia-Blutagar (Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- Öse (Hard Loop 10 µl, Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- Inkubator (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

2.3.2.2 Durchführung

Zur Beimpfung der negativ getesteten Stuhlproben wurden auf Cryobeads gelagerte *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DSM Nummer 4688 März 2009) aufgetaut und bei 42°C für zwei Tage auf Blutagar kultiviert. Nach erfolgreicher Anzucht erfolgte die Entnahme einer Öse des Bakterienrasens und die Suspension dieser Probe in 1 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS).

2.3.3 Anzucht von *Entamoeba histolytica*

2.3.3.1 Material

- *Entamoeba histolytica* Probe (HK9 strain)
- Zellkulturflasche (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Inkubator (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

2.3.3.2 Durchführung

Zur Gewinnung der Amöben wurde eine in Flüssigstickstoff gelagerte *Entamoeba histolytica* Probe (HK9 strain) verwendet. Nach dem Auftauen der Probe wurde diese in vier Zellkulturflaschen bei 37°C für 4 Tage kultiviert. Bei der Ernte musste zunächst der aus toten Amöben bestehende Bodensatz der Kulturflaschen mit einer Pipette entfernt werden. Um die lebenden, am Rand der Flaschen sitzenden Amöben in Lösung zu bringen, wurden die Flaschen in kaltes Wasser gestellt. Nach leichtem Schütteln wurde der gesamte Inhalt der Flaschen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die nun am Gefäßboden gesammelten Amöben in 1 ml PBS resuspendiert. Sowohl bei der Kultivierung von *Campylobacter* als auch bei den Amöben wurde gemäß standardisierter Verfahren des AIMT vorgegangen.

2.3.4 Quantifizierung der Mikroorganismen

2.3.4.1 Material

- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Neubauer® „verbesserte“ Einweg-Zählkammer (DHC-N01, Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- Karbofuchsin/Tergitol-Lösung (BD BBL™ TB Carbofuchsin KF, BD, Sàrl, Schweiz)
- HCl-Alkohol Mischung (BD BBL™ TB Decolorizer, BD, Sàrl, Schweiz)
- Methylenblau
- Mikroskop (ZEISS®, Oberkochen, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)

2.3.4.2 Durchführung

Um die Erregerkonzentration in den gewonnenen PBS-Lösungen zu ermitteln, erfolgte nach sorgfältigem Durchmischen per Pipette die Entnahme von 10 µl des Ansatzes und die Überführung in eine Neubauer® „verbesserte“ Einweg-Zählkammer. Unter dem Mikroskop wurde dann die Zelldichte durch das Auszählen von jeweils 4 Großquadraten (4 mal 16 Kleinquadrate) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Während die Amöben-Lösung aufgrund der Erregergröße ohne Färbung zählbar war, wurde bei der *Campylobacter*-Lösung eine modifizierte kalte Ziehl-Neelsen-Färbung angewandt, um das Zählen zu erleichtern. Hierzu wurden 100 µl der zuvor gut gemischten *Campylobacter*-Lösung entnommen, in verdünnter Carbofuchsin/Tergitollösung resuspendiert und für 5 Minuten gefärbt. Nach Zentrifugation (8000 rpm für 10 min) erfolgte das Rücklösen in Säure-Alkohol Lösung zum Entfärben. Die Bakterien wurden erneut pelletiert und der Überstand sorgfältig mit der Pipettenspitze abgesaugt, ohne das Pellet zu stören. Final wurde die Probe mit 30 µl Methylenblau-Lösung rückgelöst, kurz gevortext und für 5 Minuten inkubiert. Vor der Entnahme zur Zählung wurde die Probe erneut per Pipette gründlich gemischt, um eine homogene Verteilung sicher zu stellen. Zehn Mikroliter dieser Lösung wurden dann in das C-Chip Einmal-Hämozytometer pipettiert und ausgezählt. Die Erregerkonzentration errechnet sich mit der Formel:

$$\text{Erreger pro Milliliter} = (\text{Erregerzahl in vier Großquadraten}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Als gewünschte Erregerkonzentration in den beimpften Stuhlproben wurden 100 000 *Campylobacter* spp. beziehungsweise 5500 Entamöben pro Milliliter Stuhllösung definiert. Dies gilt sowohl für die Startkonzentration der Verdünnungsreihen als auch für die Erregerkonzentration während des Lagerungsversuchs. Dadurch liegt die Erregerkonzentrationen deutlich über der Nachweisgrenze des zur Analyse genutzten Luminex® xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP). Die Nachweisgrenzen (Limit of Detection, LoD) des GPP liegen für *Campylobacter* bei 6×10^4 Kolonien bildende Einheiten pro Milliliter und für *Entamoeba histolytica* bei $2,15 \times 10^3$ Zysten pro Milliliter. Gleichzeitig sind die Erregerkonzentrationen im realistischen Rahmen einer pathologisch auffälligen Stuhlprobe.

Eine typische Erregerkonzentration in für *Campylobacter jejuni* positiven Stuhlproben liegt bei etwa 10^6 bis 10^9 Kolonien bildende Einheiten pro Milliliter [46]. Bezüglich der Konzentration von *Entamoeba histolytica* in Stuhlproben von Patienten können keine entsprechenden Angaben gemacht werden, da die Mikroskopie von Stuhlproben unzuverlässig ist und mikroskopisch nicht zwischen pathogenen beziehungsweise nicht-pathogenen *Entamoeba* spp. unterschieden werden kann [47]. In älteren Studien wird angegeben, dass eine Infektion mit Entamöben bei einer täglichen Ausscheidungsrate von 100 000 bis 1 000 000 Zysten mikroskopisch detektiert werden kann [48].

2.3.5 Erstellen der *Campylobacter jejuni*-Verdünnungsreihe

2.3.5.1 Material

- 3 Stuhlproben
- *Campylobacter*-Erregersuspension
- Haemocult® Stuhlkarten (Beckman Coulter®, Brea, USA)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

2.3.5.2 Durchführung

Für *Campylobacter* wurde, wie oben erwähnt, 100 000 Erreger pro Milliliter Stuhl als über dem LoD liegende Ausgangskonzentration gewählt. Die Verdünnungsschritte wurden auf 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 festgelegt. Damit befand sich der letzte Verdünnungsschritt mit 6 250 Erregern pro Milliliter Stuhl deutlich unter dem LoD (60 000 KBE pro Milliliter) des GPP. Zur Herstellung der Verdünnungsschritte wurde die Erregersuspension so angepasst, dass sie 1 000 000 Erreger pro Milliliter enthielt. Um bei allen Stuhlproben eine ähnlich homogene, leichter zu verarbeitende durchfallartige Konsistenz zu erreichen, wurden die drei zur Beimpfung bestimmten, zuvor negativ getesteten Stuhlmatrizen in 50 ml Tubes mit PBS auf ein finales Volumen von 30 ml verdünnt. Die PBS und die Stuhlproben wurden durch Vortexen gründlich homogenisiert. Zur Herstellung der Verdünnungsschritte wurde nun eine abnehmende Menge der Erregersuspension mit den flüssigen Stuhlmatrizen auf ein finales Volumen von 2 ml aufgefüllt. Für die 1:1 Verdünnung wurden somit 200 µl der Erregersuspension mit 1,8 ml der negativen Stuhlmatrix vermischt. Auf diese Weise wurde mit allen Stufen fortgefahren, bis letztlich bei der 1:16 Verdünnung 1,9875 ml Stuhlmatrix mit 12,5 µl Erregersuspension vermischt wurden (siehe Abbildung 1). Alle Verdünnungsstufen wurden gründlich gevortext.

Von den beimpften Stuhlmatrizen wurden im Folgenden pro Verdünnungsstufe jeweils eine Stuhlkarte mit 2 x 200 µl Stuhl auf den beiden Detektionsfeldern, sowie 2 Tubes mit derselben Menge als Nativproben hergestellt.

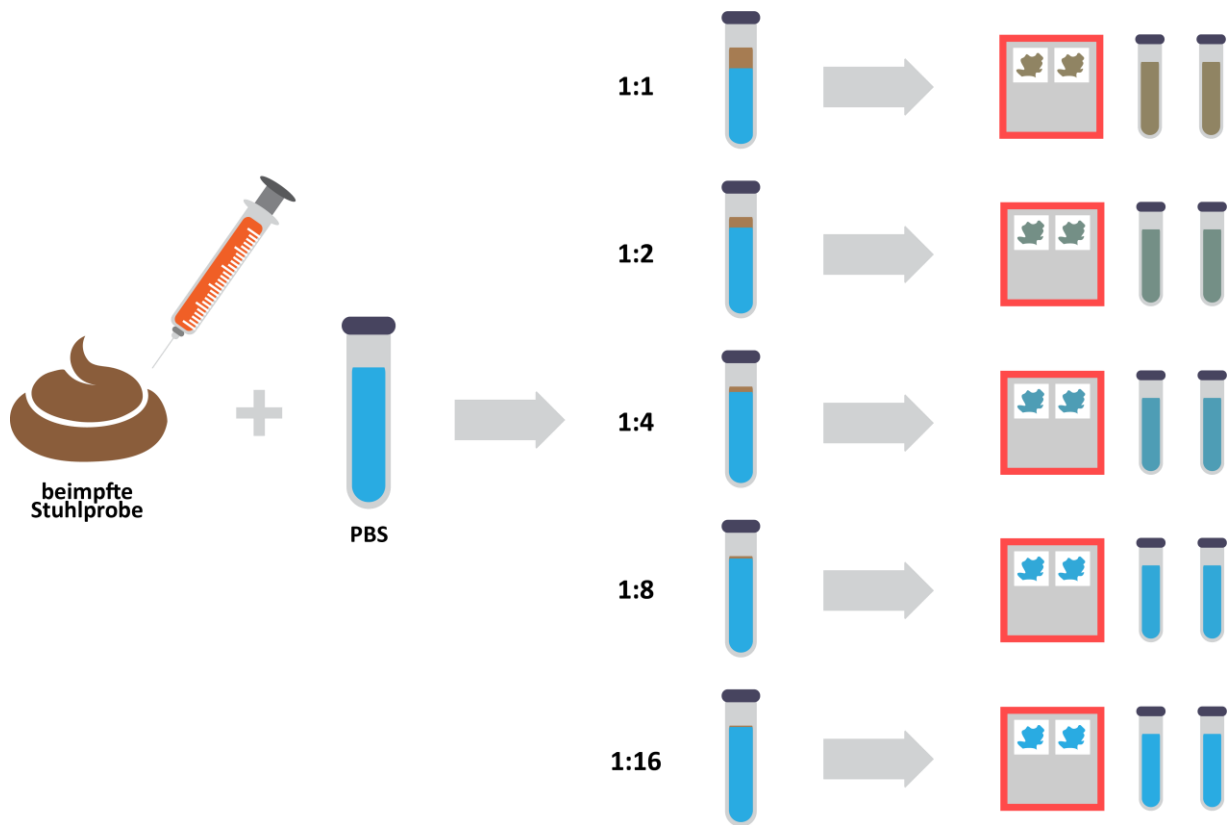


Abbildung 1 - Vorgehen bei der Erstellung der *Campylobacter jejuni*-Verdünnungsreihe

2.3.6 Erstellen der *Entamoeba histolytica*-Verdünnungsreihe

2.3.6.1 Material

- 3 Stuhlproben
- *Entamoeba histolytica*-Erregersuspension
- Haemocult® Stuhlkarten (Beckman Coulter®, Brea, USA)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

2.3.6.2 Durchführung

Die Ausgangskonzentration der *Entamoeba histolytica*-Verdünnungsreihe sollte bei 5500 Erregern pro Milliliter Stuhl liegen. Wie bei der *Campylobacter*-Verdünnungsreihe wurden wieder 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 als Verdünnungsschritte festgelegt. So wurde zur Herstellung der Verdünnungsschritte eine abnehmende Menge der Erregersuspension mit den flüssigen Stuhlmatrizen auf ein finales Volumen von 2 ml aufgefüllt (siehe Kapitel 2.3.5). Von den beimpften Stuhlmatrizen wurden erneut von jeder Verdünnungsstufe jeweils eine Stuhlkarte mit 2 x 200 µl Stuhl auf den beiden Detektionsfeldern, sowie 2 x 200 µl Stuhl als Nativproben hergestellt.

2.3.7 Erstellen der *Norovirus*-Verdünnungsreihen

2.3.7.1 Material

- 3 x *Norovirus* GI Stuhlprobe
- 3 x *Norovirus* GII Stuhlprobe
- Haemocult® Stuhlkarten (Beckman Coulter®, Brea, USA)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)

2.3.7.2 Durchführung

Da sich Noroviren anders als *Campylobacter* und *Entamoeba histolytica* nicht im Labor kultivieren lassen, wurden drei irreversibel anonymisierte, *Norovirus* GI- und drei irreversibel anonymisierte, *Norovirus* GII-positive Stuhlproben genutzt. Diese hatte das bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) inklusive der zugehörigen CT-Werte, eine theoretische Größe zur

Beschreibung des Wachstums einer exponentiellen Kurve, zur Verfügung gestellt. Dort waren sie mit einer hauseigenen, quantitativen PCR positiv getestet und analysiert worden. Die CT-Werte der Proben befanden sich im Rahmen des LoD des GPPs für Noroviren. Die Proben hatten Ausgangs-CT-Werte zwischen 17 und 20 (siehe Tabelle 1). Drei Gramm jeder *Norovirus*-Stuhlprobe wurden aufgetaut, mit PBS bis zu einem finalen Volumen von 5 ml verdünnt und gevortext. Auch hier wurden somit Proben mit ähnlich homogener, leichter zu verarbeitender durchfallartiger Konsistenz vorbereitet.

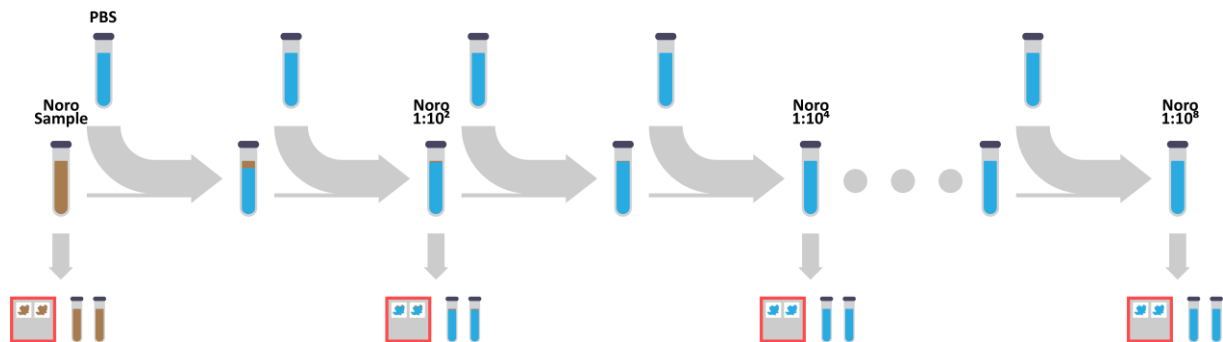


Abbildung 2 - Vorgehen bei der Erstellung der Norovirus-Verdünnungsreihen

Mit diesen wurden die Verdünnungsschritte $1:10^2$, $1:10^4$, $1:10^6$ und $1:10^8$ erstellt. Um die gewünschten Erregerkonzentrationen zu erreichen, wurde 1 ml der flüssigen *Norovirus*-Stuhlprobe mit 9 ml PBS gemischt und sorgfältig gevortext. Um die gewünschten Verdünnungsstufen zu erreichen wurde dieses Vorgehen mit jeweils 1 ml des letzten Verdünnungsschrittes nach jeweils sorgfältigem Vortexen wiederholt (siehe Abbildung 2). Anders als bei den *Campylobacter*- und *Entamoeba*-Verdünnungsreihen wurde dieses Vorgehen gewählt, da aufgrund der exponentiellen Verdünnungsschritte ansonsten extrem große beziehungsweise kleine Volumina zu pipettieren gewesen wären. Von jeder Verdünnungsstufe der Proben wurden 2 x 200 µl Stuhl auf die zwei Detektionsfelder der Karten, sowie 2 x 200 µl in Tubes als Nativprobe pipettiert.

Matrix	CT-Wert	Typ
1	19.95	GI
2	19.93	GI
3	18.30	GI
4	17.16	GII
5	18.04	GII
6	18.18	GII

Tabelle 1 Norovirus-Proben der Verdünnungsreihen

2.3.8 Erstellen der Stuhlkarten und Nativproben

2.3.8.1 Material

- Haemocult® Stuhlkarten (Beckman Coulter®, Brea, USA)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)

2.3.8.2 Durchführung

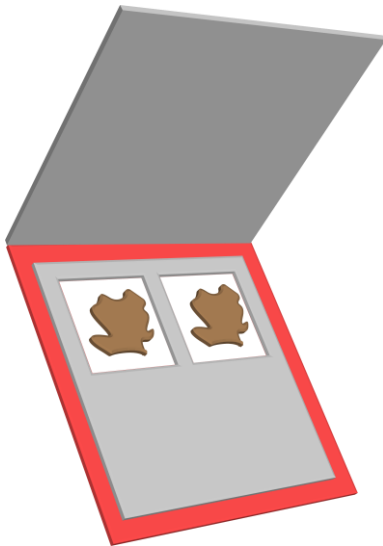


Abbildung 3 – Aufbau einer Stuhlkarte

Es folgte die Präparation der Stuhlkarten für den Verdünnungsversuch. Jede Beckman Coulter® Haemocult®-Karte besitzt zwei Filterpapier-Detektionsfelder, sowie einen Kartondeckel (siehe Abbildung 3). Unter der Sicherheitswerkbank wurden die beiden Detektionsfelder der Stuhlkarten mit jeweils 200 µl der entsprechenden Proben per Pipette beladen. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde für jedes Feld eine neue Pipettenspitze verwendet. Auf den zwei Feldern wurden immer eine Stuhlprobe und ihr zugehöriges technisches Duplikat aufgetragen. Auf keiner Karte befanden sich Stuhlproben unterschiedlicher Erreger oder Stuhlmatrizen. Von den beimpften Stuhlmatrizen wurden im Folgenden pro Verdünnungsstufe und

pro Erreger jeweils eine Stuhlkarte mit 2 x 200 µl Stuhl auf den beiden Detektionsfeldern sowie 2 Tubes mit derselben Menge als Nativproben hergestellt. Während die Tubes mit den Nativproben sofort im Gefrierschrank bei -20°C gelagert wurden, trockneten die Stuhlkarten bis zu ihrer Extraktion für vier Stunden bei Raumtemperatur unter der Sicherheitswerkbank.

2.3.9 Präparation der Extraktion

2.3.9.1 Material

- Einmal-Skalpelle (B.Braun®, Melsungen, Deutschland)
- Einmal-Pinzetten (B.Braun®, Melsungen, Deutschland)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- NucliSENS Lysepuffer (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France)
- Thermoshaker (Ditabis®, Pforzheim, Germany)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)

2.3.9.2 Durchführung

Zur Extraktion der Proben wurde das NucliSENS® miniMag® Nukleinsäuren-Extraktionssystem (BioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France) genutzt. Unter dem Sicherheitsabzug wurden mit Einmal-Skalpellen und Einmal-Pinzetten die beiden Detektionsfelder der mit 2 x 200 µl beladenen Stuhlkarten ausgeschnitten. Es wurde jeweils das gesamte Filterpapier-Feld herausgetrennt. Schließlich folgte die Überführung jedes Filterpapier-Quadrats in ein 2 ml Tube. Die Filterpapier-Quadrate wurden hierbei in der Mitte so gefaltet, dass die mit Stuhl beimpfte Seite im Tube zur Mitte hinzeigte (siehe Abbildung 4). Dies verbessert das Lösen des Stuhls vom Filterpapier im Lysepuffer, da die beimpfte Seite nicht am Rand des Tubes kleben kann.

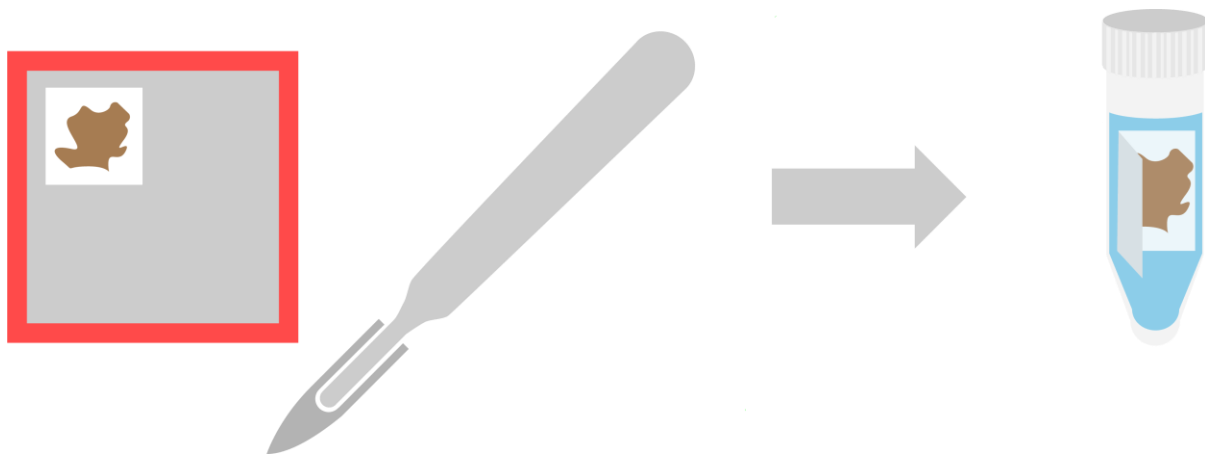


Abbildung 4 - Faltung eines ausgeschnittenen Filterpapierfelds in einem Tube

Nach jeder Karte wurde Skalpell und Pinzette gewechselt, bei einem Wechsel zwischen Karten verschiedener Erreger auch die Handschuhe. Zudem wurden bei einem Erregerwechsel sämtliche Arbeitswerkzeuge sowie die Arbeitsfläche unter der Werkbank desinfiziert. Die mit Filterpapier versehenen Tubes wurden mit 2 ml Lysepuffer befüllt, gründlich oberflächendesinfiziert und danach für 30 Minuten mit 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei Raumtemperatur in den Thermoshaker gestellt. Anschließend wurden sie in einem zweiten Thermoshaker bei 95°C für 5 Minuten bei 2000 rpm geschüttelt. Nach diesem Schritt wurden die Tubes als nicht mehr infektiös gehandhabt und die folgende Extraktion außerhalb der Sicherheitsbank durchgeführt.

2.3.10 Extraktion der Verdünnungsreihen

2.3.10.1 Material

- NucliSENS miniMag (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- Extraktionskit (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- MagneSphere Magnetic Separation Stand (Promega, Madison, USA)
- Zentrifuge (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Thermoshaker (Ditabis®, Pforzheim, Germany)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)

2.3.10.2 Durchführung

Der miniMag® von bioMérieux® ist ein System, welches mittels magnetischer Silica sowie eines hinschaltbaren Magneten die Extraktion von DNA / RNA erlaubt. Die zu extrahierende DNA / RNA wird an magnetische Silica gebunden und über einen Magneten während des Entfernens von Überständen und Spülflüssigkeiten zwischen den Waschschrritten entsprechend asserviert. Insgesamt besitzt der miniMag Platz für zwölf Tubes (siehe Abbildung 5). Es wurden so immer 10 Proben sowie zwei Extraktionskontrollen (technisches Duplikat) in einem Lauf extrahiert. Die Extraktionskontrollen bestanden dabei aus in Lysepuffer gegebenen Filterpapierfeldern leerer Stuhlkarten. Aufgrund der großen Probenzahlen und der beschränkten Plätze des MiniMags wurden sowohl in den Verdünnungsreihen, als auch später am Tag 0 des Lagerungsversuchs jeweils die Karten nach vierstündiger Trockenzeit am selben Tag extrahiert, während die Nativproben vor ihrer Extraktion für einen Tag bei -20°C (*Campylobacter*, *Entamoeba histolytica*) beziehungsweise -80°C (*Norovirus*) gelagert wurden.



Abbildung 5 - Schematische Darstellung des miniMags von bioMérieux®

Zunächst wurden die Proben in den Tubes für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Hierdurch wurden der Lysepuffer und die darin gelöste DNA / RNA von groben Partikeln der Stuhlproben befreit und der gewonnene klare Überstand in neue Tubes pipettiert. In diese neuen Tubes wurden

dann 50 µl zuvor gevortexter Silica gegeben und die Extraktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach den erfolgten Waschsritten wurden die Tubes letztlich in einen MagneSphere® Magnetic Separation Stand gestellt und vorsichtig das Extrakt von den Silica per Pipette getrennt. Die Extrakte wurden in Tubes pipettiert und bei -80°C gelagert.

2.4 Lagerungsreihen

2.4.1 Präparation der Stuhlmatrizen und Anzucht der Erreger

2.4.1.1 Material

- 3 Stuhlproben
- *Campylobacter jejuni sp. jejuni* (DSM Nr. 4688 Mar 09)
- Columbia-Blutagar (Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- Öse (Hard Loop 10 µl, Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- *Entamoeba histolytica Probe* (HK 9 strain)
- Zellkulturflasche (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Inkubator (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
- Neubauer® „verbesserte“ Einweg-Zählkammer (DHC-N01, Merck®, Darmstadt, Deutschland)
- Mikroskop (ZEISS®, Oberkochen, Deutschland)

2.4.1.2 Durchführung

Für die Lagerungsreihen wurden drei neue, irreversibel anonymisierte Stuhlproben verwendet. Auch diese Stuhlproben waren im Labor der AITM negativ auf Durchfallerreger getestet worden. Wieder erfolgte die Kultivierung der auf Cryobeads gelagerten *Campylobacter jejuni sp. jejuni* auf Blutagar (siehe Kapitel 2.3.2), sowie der in Flüssigstickstoff gelagerten *Entamoeba histolytica* (HK9 strain) in Zellkulturflaschen (siehe Kapitel 2.3.3). Die gewonnenen Erreger wurden jeweils in einem Milliliter PBS gelöst. Zur Bestimmung der Erregerkonzentration in den gewonnenen PBS-Lösungen wurden 10 µl des Ansatzes genutzt und diese in ein C-Chip Einmal-Hämozytometer überführt. Die Zelldichte wurde durch das Auszählen von jeweils 4 Großquadraten (4 mal 16 Kleinquadrate) entsprechend den Herstellerangaben und wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben bestimmt.

2.4.2 Beimpfung der Stuhlproben

2.4.2.1 *Material*

- 3 Stuhlproben
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)
- Omnifix-F Tuberkulinspritze 1 ml (B.Braun®, Melsung, Deutschland)

2.4.2.2 *Durchführung*

Um bei allen Stuhlproben eine homogene, leichter zu verarbeitende, durchfallartige Konsistenz zu erreichen, wurden erneut die drei zur Beimpfung bestimmten, zuvor negativ getesteten Stuhlmatrizen in 50 ml Tubes mit PBS auf ein finales Volumen von 30 ml verdünnt. Die PBS und die Stuhlproben wurden durch Vortexen homogenisiert. Es folgte die Beimpfung der homogenisierten Stuhlmatrizen mit der berechneten Menge an Erregerlösung mittels einer Tuberkulinspritze. Für die folgenden Lagerungsversuche entstanden drei 6 ml Stuhlmatrizen mit 5500 Entamoeben pro Milliliter Stuhl und drei 6 ml Stuhlmatrizen mit 100 000 *Campylobacter* pro Milliliter Stuhl. Von den verdünnten Stuhlmatrizen wurden jeweils vier Tubes mit 200 µl abgefüllt und zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Ebenso wurden sowohl von der *Campylobacter*-Lösung, als auch von der Amöben-Lösung, jeweils zusätzlich ein Milliliter der Erregersuspension aufgehoben und bei -20°C gelagert. Dies sollte die spätere Analyse der einzelnen Bestandteile auf mögliche Verunreinigungen ermöglichen.

2.4.3 Präparation der *Norovirus*-Stuhlproben

2.4.3.1 *Material*

- 3 x *Norovirus* GI Stuhlprobe
- 3 x *Norovirus* GII Stuhlprobe
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)

2.4.3.2 *Durchführung*

Matrix	CT-Wert	Typ
1	20	GI
2	22	GI
3	23	GI
4	11	GII
5	16	GII
6	19	GII

Tabelle 2 *Norovirus*-Proben des Lagerungsversuchs

Für den Lagerungsversuch wurden erneut jeweils drei auf *Norovirus* GI und GII positiv getestete und irreversibel anonymisierte Proben des LGLs verwendet. Die Proben hatten Ausgangs-CT-Werte zwischen 11 und 23 (siehe Tabelle 2). Wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben wurden drei Gramm jeder *Norovirus*-Stuhlprobe aufgetaut, mit PBS bis zu einem finalen

Volumen von 5 ml verdünnt, gevortext und somit Proben mit homogener, leichter zu verarbeitenden durchfallartigen Konsistenz erreicht. Von den *Norovirus*-Stuhlproben wurden jeweils 2 x 200 µl in Tubes gefüllt und bei -80°C gelagert.

2.4.4 Erstellen der Stuhlkarten und Nativproben

2.4.4.1 *Material*

- Haemocult® Stuhlkarten (Beckman Coulter®, Brea, USA)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Druckverschlussplastikbeutel

2.4.4.2 *Durchführung*

Es folgte die Präparation der Stuhlkarten für den Lagerungsversuch. Wieder wurden unter der Sicherheitswerkbank die beiden Detektionsfelder der Beckman Coulter® Haemocult®-Stuhlkarten mit jeweils 200 µl der entsprechenden Proben per Pipette beladen. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben vorgegangen. Anschließend trockneten die noch geöffneten Karten erneut vier Stunden unter der Sicherheitswerkbank, bevor sie mit herunter geklapptem Kartondeckel einzeln in aerosoldichte Druckverschlussplastikbeutel gesteckt und bei

Raumtemperatur (20°C) gelagerte wurden. Es wurden weder Fixiermittel noch Feuchtigkeits- oder Sauerstoffabsorber verwendet.

Von jeder Stuhlmatrix beziehungsweise Stuhlprobe entstanden jeweils sieben Stuhlkarten mit 2 x 200 µl Stuhl auf den Detektionsfeldern (technisches Duplikat) der einzelnen Karten. Letztlich entstanden auf diese Weise jeweils sieben doppelt beladene Stuhlkarten für alle drei *Campylobacter*- und alle drei *Entamoeba histolytica*-Stuhlmatrizen, sowie für die drei *Norovirus* GI Proben und drei *Norovirus* GII Proben (siehe Abbildung 6). Des Weiteren wurde auch von den Stuhlmatrizen im nicht beimpften Zustand Stuhlkarten für sämtliche Tage erstellt. Mit jenen sollten die Stühle selbst noch einmal auf mögliche Verunreinigungen oder auf mit den Routinemethoden des Labors des AITM nicht diagnostizierte Pathogene untersucht und potenziell auftretende Ungereimtheiten analysierbar werden.

2.4.5 Extraktion der Lagerungsreihen

2.4.5.1 Material

- Einmal-Skalpelle (B.Braun®, Melsungen, Deutschland)
- Einmal-Pinzetten (B.Braun®, Melsungen, Deutschland)
- Tubes verschiedener Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- NucliSENSE® miniMag® (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, France)
- Extraktionskit (bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- MagneSphere Magnetic Separation Stand (Promega, Madison, USA)
- Thermoshaker (Ditabis®, Pforzheim, Germany)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich®, Tuttlingen, Deutschland)

2.4.5.2 Durchführung

Eine Karte jeder Erregersorte und Stuhlmatrix wurde in den folgenden Wochen im technischen Duplikat jeweils zum Zeitpunkt Null sowie nach entsprechender Lagerung bei Raumtemperatur zum Tag 7, 14, 21, 28, 35 und 42 extrahiert und analysiert. Zudem wurden zum Zeitpunkt Null die zuvor erstellten und bei -20°C beziehungsweise -80°C gelagerten Nativstuhlproben sämtlicher Erreger und Matrizen sowie die Erregersuspensionen extrahiert und analysiert. Bei der Extraktion wurde wie in den Kapiteln 2.3.9 und 2.3.10 beschrieben vorgegangen und der NucliSENSE® miniMag® von bioMérieux® genutzt. Sämtliche Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

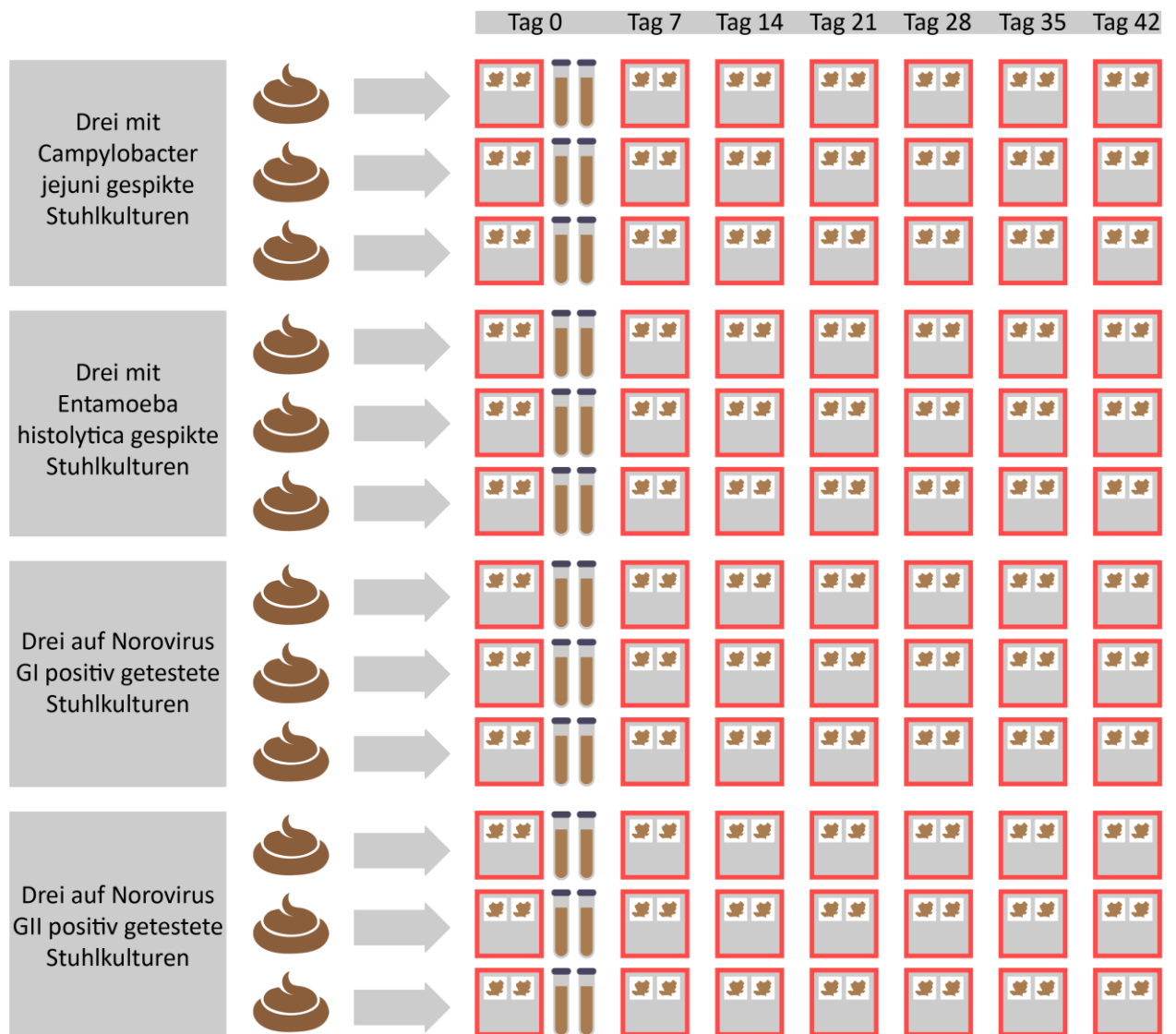


Abbildung 6 - Übersicht der gewonnenen Proben der Lagerungsversuche

2.5 Analyse mit dem Luminex® MAGPIX®

2.5.1.1 Material

- MAGPIX® (Luminex®, Austin, Texas, USA)
- xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP, Luminex®, Austin, Texas, USA)
- Thermocycler (Analytik Jena AG®, Jena, Deutschland)
- Vortexer (Stuart®, Staffordshire, UK)
- Research Plus Pipetten (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)
- Tubes verschiedene Größen (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, USA)
- Kühlblock (Eppendorf®, Hamburg, Deutschland)

2.5.1.2 Durchführung

Die Analyse der Extrakte erfolgte mit dem xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel von Luminex® in Kombination mit dem MAGPIX®-System. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse ist grundsätzlich ein flüssiger Ablauf sowie eine konsequente Kühlung der Ansätze ausschlaggebend. Um die Analyse möglichst kompakt zu halten, wurde daher die maximale Probenzahl pro Lauf auf 20 beschränkt. Verzögerungen durch das Pipettieren sollten hierdurch vermieden werden. Unter der Sicherheitswerkbank folgte die Herstellung des Mastermixes entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

Zur Herstellung des Mastermixes wurden zunächst für jede zu analysierende Probe 1 µl RNase freies Wasser, 7,5 µl OneStep Buffer (5X), 2,5 µl Primer-Mix, 0,5 µl Bovine Serum Albumin (BSA) sowie 2 µl OneStep Enzyme-Mix in ein 1,5 ml Tube pipettiert und gründlich gevortext. Für die Negativkontrolle wurden dann 15 µl des Mastermixes gemeinsam mit 11,5 µl RNase freiem Wasser in das entsprechend vorher beschriftete 200 µl Tube im Kühlblock gefüllt und das Tube verschlossen. Für die Positivkontrolle wurden 1,5 µl der Phage MS2 pro zu analysierende Probe in den Mastermix gegeben und gründlich gevortext. Jedes 200 µl Tube wurde mit 15 µl des fertigen Mastermixes befüllt und 10 µl der zu untersuchenden, zuvor aufgetauten Extrakte hinzugegeben. Die Tubes wurden gevortext, in den auf 53°C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das vom Hersteller empfohlene Programm gestartet. Der auf 53°C vorgeheizte Thermocycler hielt diese Temperatur zunächst für zwanzig Minuten, um dann für fünfzehn Minuten auf 95°C aufzuheizen. Anschließend wechselte der Thermocycler für jeweils dreißig Sekunden auf 95°C, dann 56°C gefolgt von 72°C. Diese Temperaturabfolge wurde 37 mal wiederholt, bevor der Thermocycler nach weiteren zwei Minuten bei 72°C die Proben auf 4°C herabkühlte und dort die Temperatur bis zu deren weiteren Verarbeitung hielt (siehe Abbildung 7). Über diese Schritte wurden die zu analysierenden DNA / RNA-Abschnitte im Rahmen einer Polymerase-Ketten-Reaktion vervielfältigt.

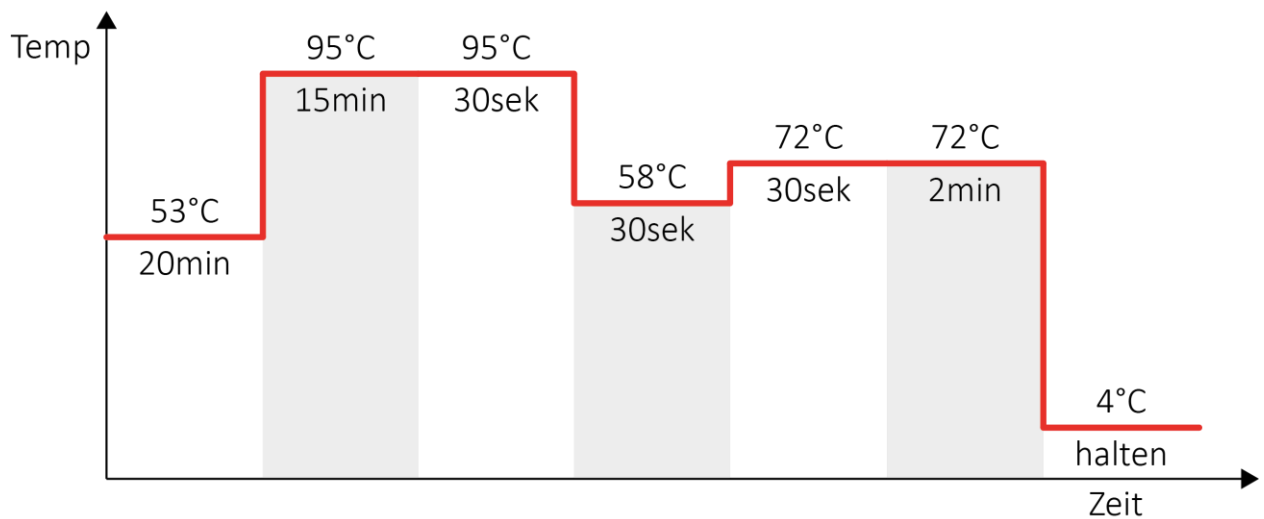


Abbildung 7 - Zeitlicher Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion

Im Anschluss wurden pro Probe jeweils 1,25 µl xTAG® 0,22 SAPE mit 92,5 µl xTAG® Reporterpuffer zu einer Reporterlösung verdünnt. Fünf Mikroliter jeder Probe selbst wurden dann in jeweils einer Vertiefung der Mikrotiterplatte gemeinsam mit 20 µl des zuvor im Ultraschallbad behandelten Mikrosphäre-Mixes sowie 75 µl der Reporterlösung gegeben. Die Lösungen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden dann mit einer Achtkanalpipette jeweils fünfmal ein und ausgezogen, um eine gründliche Durchmischung der Bestandteile zu erreichen. Die mit einem Microseal-Film verschlossene Platte wurde danach wieder in den Thermocycler eingelegt, wo sie sich dann drei Minuten bei 60°C sowie 45 Minuten bei 45°C befand (siehe Abbildung 8). Während diesen Schritten wurden die zuvor vervielfältigten und nun zu detektierenden DNA / RNA-Abschnitte mit den im Mikrosphäre-SAPE-Mix enthaltenen fluoreszierenden, magnetischen Stoffen verbunden. Anschließend wurde der Microseal-Film wieder entfernt, die Platte in das Luminex® MAGPIX® gegeben und die Analyse gestartet. Das MAGPIX® der Firma Luminex® nutzt Licht-emittierende Dioden, eine Kamera sowie einen Magneten, um mehrere Analyten in einem Multiplex-Ansatz nachzuweisen. Hierbei werden die in den vergangenen Schritten vervielfältigten, an magnetische, fluoreszierende Stoffe gebundenen Analyten durch einen Magneten in einer Ebene angeordnet und dann mithilfe Licht-emittierender Dioden, sowie einer Kamera detektiert.

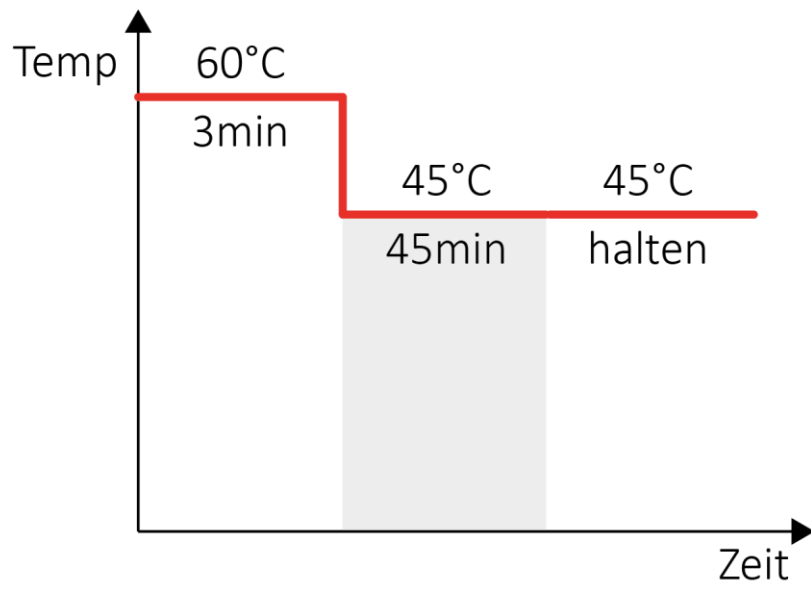


Abbildung 8 - Zeitlicher Ablauf der Hybridisierung

2.6 Nachtestung von Proben mit diskordanten Ergebnissen

Im Falle von unerwarteten Ergebnissen bezüglich der erwarteten Pathogene beziehungsweise Unterschieden zwischen den nativen Proben und jenen auf Karte wurden die Proben zunächst erneut mit dem xTAG® GPP im MAGPIX® getestet. Bei Fortbestehen der Ungereimtheiten folgte eine Testung mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (MicroGen DX®, Lubbock, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in einem CFX96 Echtzeit-Detektionssystem (Bio-Rad Laboratories®, Munich, Germany).

2.7 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Ergebnisse des MAGPIX® wurden mit der TDAS Software für xTAG® GPP (Luminex®, Texas, USA) analysiert. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in Mean Fluorescent Intensity (MFI) Einheiten. Zur Verarbeitung der Daten, sowie Erstellung der Tabellen wurde Microsoft Excel genutzt. Sämtliche Grafiken dieser Arbeit wurden in Adobe Illustrator erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Verdünnungsreihen

3.1.1 Vorgehen bei der Auswertung

Die Detektion wurde als erfolgreich gewertet, wenn in einer Verdünnungsstufe beide technischen Duplikate positiv erkannt wurden. Fiel eines der technischen Duplikate in einer Verdünnungsstufe aus, wurde das Ergebnis als negativ gewertet. Es wurde jeweils nach der letzten positiven Verdünnungsstufe (Last Positive Dilutionstep, LPD) gesucht. Die LPD wurde entsprechend als jene Verdünnungsstufe festgelegt, bei welcher beide technischen Duplikate einer Stuhlkarte beziehungsweise einer nativen Stuhlprobe positiv auf den entsprechenden Erreger getestet wurden. Anhand der LPD und der definierten Erregerkonzentrationen in den Proben wurde dann die letzte positive Erregerkonzentration (Last Positive Sample Concentration, LPC) berechnet.

3.1.2 Ergebnisse der *Campylobacter jejuni*-Verdünnungsreihe

Verdünnung	Matrix 1				Matrix 2				Matrix 3			
	Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
1:1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1:2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1:4	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	×	pos	pos	pos
1:8	pos	pos	pos	pos	pos	×	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1:16	pos	×	×	×	×	×	pos	×	×	×	×	×

Tabelle 3 Ergebnisse der *Campylobacter*-Verdünnungsreihe

Die Detektion von *Campylobacter* auf den Stuhlkarten war bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:8 erfolgreich möglich und stimmte insgesamt mit den nativen Stuhlproben überein. Bei einer der nativen *Campylobacter*-Proben war der letzte erfolgreiche Nachweis um eine Verdünnungsstufe tiefer (1:4) als dieselbe Stuhlmatrix auf der Stuhlkarte (siehe Tabelle 3 Matrix 2). Die 1:8 Verdünnung entsprach in etwa 12 500 Erregern pro Milliliter Stuhl. Die Firma Luminex® gibt an, dass das GPP etwa 60 000 Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter Stuhl zuverlässig nachweisen kann.

3.1.3 Ergebnisse der *Entamoeba histolytica*-Verdünnungsreihe

Verdünnung	Matrix 1				Matrix 2				Matrix 3			
	Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
1:1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1:2	pos	×	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1:4	×	×	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	×
1:8	×	×	pos	pos	pos	pos	pos	pos	×	pos	pos	pos
1:16	pos	pos	pos	pos	×	×	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Tabelle 4 Ergebnisse der *Entamoeba-Histolytica*-Verdünnungsreihe

Die *Entamoeba histolytica*-Stuhlkarten-Proben konnten konsistent bis zu ihrer Verdünnung von 1:16 erfolgreich nachgewiesen werden. Eine native Probe testete eine Verdünnungsstufe tiefer (1:8) als die entsprechende Stuhlprobe auf der Stuhlkarte (siehe Tabelle 4 Matrix 2). Eine 1:16 Verdünnung entsprach in diesem Fall etwa 344 Erreger pro Milliliter Stuhl. Für *Entamoeba histolytica* liegt das LoD des GPP bei 2150 Zysten pro Milliliter Stuhl.

3.1.4 Ergebnisse der *Norovirus*-Verdünnungsreihen

Bei den Verdünnungsreihen der Norovirus-Proben schwankten die Nachweisgrenzen deutlich zwischen den einzelnen sechs Proben aus dem LGL. Während einige Proben nur bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} nachgewiesen werden konnten, waren andere auch bei 10^{-8} noch aufzufinden. Insgesamt zeigten die Ergebnisse eine leichte Tendenz zu einer sensibleren Nachweisgrenze auf den Stuhlkarten im Vergleich mit den nativen Stuhlproben. So ließen sich eine *Norovirus* GI- (siehe Tabelle 5 Matrix 3) sowie zwei *Norovirus* GII-Stuhlkarten-Proben (siehe Tabelle 6 Matrix 1 & 3) eine Verdünnungsstufe höher noch nachweisen als ihre entsprechenden nativen Proben. Andererseits ließ sich eine *Norovirus* GII-Probe (siehe Tabelle 6 Matrix 2) auf der Stuhlkarte im Vergleich nur einen Verdünnungsschritt tiefer detektieren als ihr natives Gegenstück. Aufgrund der schwankenden Nachweisgrenzen wurden die Ergebnisse mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (MicroGen DX®, Lubbock, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in einem CFX96 Echtzeit-Detektionssystem (Bio-Rad Laboratories®, Munich, Germany) auf ihre Richtigkeit überprüft. Das LOD des GPP für Noroviren wird von Luminex® mit 37,16 – 40,85 CT angegeben.

Norovirus GI												
	Matrix 1				Matrix 2				Matrix 3			
	Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte	
Verdünnung	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10²	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10⁴	x	x	x	x	x	x	x	x	pos	pos	pos	pos
10⁶	x	x	x	x	x	x	x	x	pos	pos	pos	pos
10⁸	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	pos	pos

Tabelle 5 Ergebnisse der Norovirus GI Verdünnungsreihe

Norovirus GII												
	Matrix 1				Matrix 2				Matrix 3			
	Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte		Nativprobe		Stuhlkarte	
Verdünnung	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10²	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10⁴	pos	pos	pos	pos	pos	pos	x	x	x	x	pos	pos
10⁶	pos	pos	pos	pos	x	x	x	x	x	x	x	x
10⁸	x	x	pos	pos	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabelle 6 Ergebnisse der Norovirus GII Verdünnungsreihe

3.2 Lagerungsreihen

3.2.1 Stabilität während der Lagerungsreihen

Die auf den Stuhlkarten gelagerten und an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 getesteten *Campylobacter jejuni* konnten in 41 von 42 Proben detektiert werden. Dies entspricht einer Detektionsrate von 97,6%. Lediglich am Tag 28 ließ sich eines der technischen Duplikate nicht auffinden (siehe Tabelle 7 *C. jejuni* Matrix 3). Die mit *Entamoeba histolytica* gespickten Stuhlproben konnten in allen Testungen erfolgreich auf den Stuhlkarten gefunden werden (Detektionsrate von 100%). Bezüglich der *Norovirus* GI-Proben waren 41 von 42 Proben positiv (siehe Tabelle 7 *Norovirus* GI Matrix 1), sowie sämtliche *Norovirus* GII-Proben. Für die *Norovirus* GI-Proben liegt somit eine Detektionsrate von 97,6% vor, für die *Norovirus* GII-Proben entspricht sie 100%.

Eine *Norovirus*-Stuhlprobe zeigte zudem ein durchgehend positives Signal für eine *Cryptosporidium* spp. Infektion an (siehe Tabelle 7 *Norovirus* GI Matrix 1). *Cryptosporidium* spp. konnte in 13 von 14 Testungen dieser Stuhlprobe auf der Stuhlkarte nachgewiesen werden sowie am Tag Null in beiden technischen Duplikaten der Nativprobe. Dieses unerwartete *Cryptosporidium*-Ergebnis konnte in der Original-Stuhlprobe per Mikroskopie und Antigen-Testung mit einem ProSpecT *Cryptosporidium* Microplate Assay (Oxoid®, Hants, UK) bestätigt werden.

Probe	Duplikat	Tag 0	Tag 7 / 14 / 21	Tag 28	Tag 35 / 42
<i>C. jejuni</i> Matrix 1 + 2	1	pos	pos	pos	pos
	2	pos	pos	pos	pos
<i>C. jejuni</i> Matrix 3	1	pos	pos	x	pos
	2	pos	pos	pos	pos
<i>E. histolytica</i> Matrix 1 - 3	1	pos	pos	pos	pos
	2	pos	pos	pos	pos
<i>Norovirus</i> GI Matrix 1	1	pos	pos	pos	pos
		Crypto	Crypto	Crypto	Crypto
	2	x	pos	pos	pos
		x	Crypto	Crypto	Crypto
<i>Norovirus</i> GI Matrix 2 + 3	1	pos	pos	pos	pos
	2	pos	pos	pos	pos
<i>Norovirus</i> GII Matrix 1 - 3	1	pos	pos	pos	pos
	2	pos	pos	pos	pos

Tabelle 7 Ergebnisse des Lagerungsversuchs

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung

Diese Studie prüft, ob es prinzipiell machbar ist, Haemocult®-Stuhlkarten als unkompliziertes, kosteneffektives Instrument für die Lagerung und den Transport von Stuhlproben bei fehlender Kühlkette in Kombination mit dem xTAG® Gastrointestinal-Pathogen-Panel (GPP) der Firma Luminex® einzusetzen. Hierfür wurden stellvertretend für die zahlreichen TD-auslösenden Bakterien, Viren und Einzeller Stuhlproben genutzt, die *Campylobacter jejuni*, *Norovirus* GI / GII beziehungsweise *Entamoeba histolytica* enthielten. In Verdünnungsreihen wurde zunächst überprüft, ob es durch die Extraktion von auf Stuhlkarten getrockneten Stuhlproben zu einer Abschwächung des Signals im Vergleich zu herkömmlich tiefgefrorenen Proben kommt. Anschließend wurde in einem Lagerungsversuch die korrekte Nachweisbarkeit der auf dem Filterpapier getrocknet bei Raumtemperatur lagernden Stellvertreterpathogene nach bis zu 6 Wochen überprüft.

4.2 Verdünnungsreihen

In den Verdünnungsreihen zeigt sich, dass die Nachweisgrenzen der Stuhlkarten mit jenen der Nativproben vergleichbar sind. Sowohl die nativ, wie auch die auf den Stuhlkarten gelagerten *Campylobacter jejuni*-, *Entamoeba histolytica*- und *Norovirus*-Stuhlproben stimmen insgesamt bezüglich ihrer letzten positiven Verdünnungsstufen überein. Da sämtliche LPDs beziehungsweise LPCs sowohl der Nativproben als auch der Proben auf den Stuhlkarten unterhalb des LoD des GPPs liegen und sich insgesamt gleichen, ist ein maßgeblicher Sensitivitätsverlust durch die Extraktion von Karten unwahrscheinlich. Durch die Nutzung von Stuhlkarten an Stelle von tiefgefrorenen, konventionell gelagerten Stuhlproben steigt somit vermutlich nicht die Gefahr bereits abklingende Infektionen mit geringeren Keimzahlen zu übersehen.

Lediglich bei den verwendeten *Norovirus*proben kam es in den Verdünnungsreihen zu unerwarteten Schwankungen bezüglich der LPDs der einzelnen Proben. Die Nachweisgrenzen der unterschiedlichen Proben reichen von den Verdünnungsschritten 10^2 bis zu 10^8 (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Diese Ergebnisse konnten mit einer kommerziell erhältlichen Echtzeit-PCR für Noroviren (MicroGen DX®, Lubbock, USA) bestätigt werden. Da sich die LPDs der einzelnen *Norovirus*-Stuhlproben gleichen, unabhängig davon, ob sie konventionell aus Tubes oder von Stuhlkarten extrahiert wurden, muss nicht davon ausgegangen werden, dass die Schwankungen mit der Stuhlkarten-Extraktion zusammenhängen. Eine mögliche Erklärung für die Schwankungen könnte

vielmehr das, im Vergleich zu den *Campylobacter*- und *Entamoeba histolytica*-Versuchen, verschiedene Vorgehen bei der Erstellung der Verdünnungsreihen sein. Aufgrund der exponentiellen Verdünnungsschritte und den folglich extrem großen beziehungsweise kleinen zu pipettierenden Volumina wurde hier immer ein Milliliter des letzten Verdünnungsschrittes mit 9 ml PBS gemischt (siehe Abbildung 2). Trotz bewusst sorgfältigem Vortexen könnte es hierbei zur Weitergabe erregereicher Bereiche der Verdünnungen gekommen sein. Dies könnte das vorzeitige, symmetrische Abbrechen einiger verdünnter *Norovirus*-Stuhlproben sowohl in den Nativproben, als auch in jenen auf den Stuhlkarten erklären.

In einer ähnlichen, kürzlich veröffentlichten Studie gelang es Lalani et al. ebenfalls mit Bakterien, Protozoen und Viren beimpfte Stuhlproben auf Filterpapier ohne Fixiermittel zu lagern und mithilfe einer PCR nachzuweisen. Lalani et al. wiesen in ihrer Studie ähnliche Nachweisgrenzen für *Campylobacter jejuni* und Noroviren in den konventionellen Proben sowie jenen auf Elute-Karten nach [49]. Nachdem die Proben für eine Woche auf FTA Karten (GE HealthCare Bio-Science, Pittsburgh, USA) gelagert wurden, konnten Lalani et al. für *Campylobacter jejuni* 10^5 Kolonien bildende Einheiten (Colony Forming Unit, CFU) und für *Norovirus* GI und GII 10^3 Plaque formende Einheit (Plaque Forming Units, PFU) pro Gramm Stuhl als niedrigste Erreger-Konzentrationen nachweisen. In der vorliegenden Studie wurde keine Bestimmung der CFUs von *Campylobacter jejuni* vorgenommen, weshalb der Zusammenhang von CFUs und der Bakterienzahl unbekannt ist. Die Nachweisgrenzen reichten von 25 000 (Verdünnungsschritt 1:4) bis 12 500 Bakterien pro Gramm Stuhl (Verdünnungsschritt 1:8). Versucht man, die direkte mikroskopische Zählung der Erreger und jene der Kolonie bildenden Einheiten zu vergleichen, muss man davon ausgehen, dass die mikroskopische Zählung eine etwas zu hohe, die Zählung der Kolonie bildenden Einheiten etwas zu niedrige Zahl angibt. Während bei der direkten Zählung nicht zwischen toten und lebendigen Erregern unterschieden werden kann, können bei den Kolonien bildenden Einheiten dicht beieinanderliegende Erreger gemeinsame Kolonien bilden und entsprechend unterschätzt werden. Insgesamt muss hier jedoch bedacht werden, dass es sich sowohl bei dieser als auch bei der Studie von Lalani et al. um Machbarkeitsnachweise mit äußerst geringen Probenzahlen handelt. Durch die finanziell bedingte Beschränkung auf lediglich zwei Replikate pro Konzentration, dürfen die gefundenen LPCs lediglich als grobe Anhaltspunkte genutzt werden. Für die Bestätigung sowie Präzisierung der LPCs und die Reproduzierbarkeit sind weiterführende Studien mit deutlich größeren Probenzahlen notwendig. Bezüglich der *Norovirus*-Stuhlproben ist zudem daraufhin zu weisen, dass die Proben nach ihrer extern durchgeführten CT-Wert-Bestimmung zur Gewährleistung einer konsistenten Verarbeitung geringfügig (wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben) mit PBS verdünnt wurden.

Von einem Rückschluss von den Verdünnungsstufen auf exakte CT-Werte sollte entsprechend Abstand genommen werden.

4.3 Lagerungsreihen

In den Lagerungsversuchen konnten die beispielhaften Durchfallerreger verlässlich in wöchentlichen Intervallen bis zum getesteten Tag 42 auf den Stuhlkarten nachgewiesen werden. Es scheinen sich folglich nicht nur die von Grimes et al. getesteten bakteriellen *Escherichia coli* auf einem Filterpapier lagern und mittels PCR nachweisen zu lassen, sondern auch virale und parasitäre Erreger. Die mit dieser Studie als technisch machbar nachgewiesene Lagerungsdauer von sechs Wochen sollte für die meisten Reisen, beziehungsweise den Versand per Post, ausreichend sein. Da die Erreger auch nach der sechsten Woche auf allen Stuhlkarten mit dem GPP auffindbar waren, lässt sich allerdings vermuten, dass die Lagerungsdauer mit 42 Tagen noch nicht ausgereizt ist. Diese Vermutung wird auch durch die 2008 von Grimes et al. veröffentlichte Studie unterstützt [37]. Grimes et al. gelang es, auch nach 14 Monaten noch auf Haemocult®-Stuhlkarten gelagerte *E. coli* mittels einer PCR erfolgreich zu detektieren. Angemerkt werden muss jedoch, dass Grimes et al. in ihrem Versuch Fixiermittel nutzten, was sich positiv auf die Lagerungsdauer ausgewirkt haben könnte. Während in dieser Studie die Lagerung sowie der Nachweis für 6 Wochen auch ohne entsprechende Fixiermittel gelang, vermuten Grimes et al. einen DNase-inaktivierenden Effekt des Fixiermittels, welcher eventuell für Langzeitlagerungen genutzt werden könne. Zu hinterfragen ist an dieser Stelle jedoch die tatsächliche Notwendigkeit einer Lagerung über mehrere Monate hinweg. Die meisten Reisen und auch der potentielle Versand einer Stuhlprobe auf einer Haemocult®-Karte aus dem Reiseland in die Heimat werden mit den hier getesteten 6 Wochen abgedeckt sein. Ob eine entsprechende Lagerung von *Campylobacter*, *Norovirus* und *Entamoeba histolytica* auch ohne Fixiermittel über mehrere Monate hinweg möglich ist, konnte in dieser Studie aufgrund begrenzter finanzieller Mittel nicht überprüft werden. Für die Vermeidung von Fixiermitteln sprechen die geringeren Kosten sowie die einfachere Handhabung. Eine möglichst simple Methode, für welche kein zusätzliches Fixiermittel mitgeführt und angewandt werden muss, könnte von den Reisenden mit einer höheren Compliance belohnt werden. Zudem würde speziell in größer angelegten epidemiologischen Studien ein Verzicht auf entsprechende Mittel die Kosten senken.

Lalani et al. nutzen in ihrer Studie FTA Elute Karten (GE HealthCare Bio-Sciences Pittsburgh, USA) als Medium sowie ein selbst entwickeltes Luminex®-basiertes PCR-Kit. Während Lalani et al. *Norovirus* GI/II bis zu drei Monate auf den Karten nachweisen konnten, waren die *Campylobacter* nur einen Monat lang detektierbar. Die Ursache des fehlgeschlagenen Nachweises von *Campylobacter* über die

vier Wochen hinaus ist nicht geklärt. Neben den FTA Elute Karten und dem PCR-Kit verwendeten Lalani et al. mit dem Qiagen® QiaAmp® Stool Extraction Kit auch ein anderes Extraktionsverfahren (Qiagen®, Les Ulis, Frankreich), welches einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit haben könnte. In wie fern Fixiermittel, unterschiedliche Filterpapier-Medien, PCR-Kit und Extraktionsmethoden sich auf die Nachweisbarkeit auswirken, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Für Haemocult®-Stuhlkarten im Vergleich zu FTA Elute Karten sprechen der Preis, die vorhandene Vertiefung im Karton, die eine gezielte Applikation der Proben ermöglicht, als auch die Abdeckung mittels Karton-Deckel, welche den hygienischen Transport erleichtert.

4.4 Zu beachtende Punkte

Mehrere Punkte müssen bedacht werden. Die vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellten *Norovirus*-Proben waren dorthin zur Testung auf Noroviren gesandt worden und unbekannter Herkunft. Informationen über weitere darin befindliche Pathogene waren nicht vorhanden. Auf diese Weise kann die Detektion des *Cryptosporidium spp.* in einer der *Norovirus* GI Proben erklärt und die Notwendigkeit von PCRs mit breitem Spektrum in der TD-Diagnostik noch einmal unterstrichen werden. Co-Infektionen sind im Rahmen der TD häufig und durch Beschränkungen bei der Testung leicht zu übersehen. Gerade aufgrund solcher Situationen wurde in dieser Studie ein Multiplex-PCR-Kit mit besonders breitem Detektionsspektrum genutzt. In Zukunft könnte eine entsprechende, unvermutete Co-Infektion korrekt diagnostiziert werden.

Gleichzeitig kann die erfolgreiche Detektion der Cryptosporidien auch als Hinweis darauf gesehen werden, dass sich auch andere Protozoen auf den Stuhlkarten bis zu 6 Wochen lagern und detektieren lassen. Die Cryptosporidien konnte in 13 von 14 Testungen dieser Stuhlprobe auf der Haemocult®-Karte über die gesamte Dauer der 6 Wochen nachgewiesen werden. Dies steht jedoch im Widerspruch mit den Ergebnissen von Lalani et al. Jene hatten Schwierigkeiten Cryptosporidien auf ihren FTA Elute Karten zu detektieren. Auch hier gilt es, wie im Falle der unzureichenden *Campylobacter*-Detektion, in größeren Studien die unterschiedlichen Karten, PCR-Kits sowie Extraktionsmethoden hinsichtlich ihrer Effektivität zu vergleichen.

Da sich diese Studie zunächst auf die prinzipielle Machbarkeit der Lagerung und Detektion von bakterieller, viraler und parasitärer DNA / RNA auf Stuhlkarten konzentrierte, wurden die Lagerungsbedingungen selbst konstant gehalten. Bemüht um einen möglichst simplen Aufbau mit wenigen Variablen wurden die nicht fixierten Proben auf den Stuhlkarten mit geschlossenem Kartondeckel in Druckverschluss-Plastikbeuteln ohne Sauerstoff- und Feuchtigkeits-Absorber bei

Raumtemperatur gelagert. Da auf einer typischen Reise in den für TD besonders interessanten Ländern die Lagerungsbedingungen zwischen tropischen Temperaturen mit hoher Luftfeuchtigkeit bis hin zu trockener, kühler Luft aus Klimaanlage variieren, müssen diese Variablen in zukünftigen Studien mitbedacht werden.

Lalani et al. lagerten zwei weitere Stuhlartenreihen sowohl bei 4°C als auch bei 31°C für die Dauer von einer Woche. Hierbei konnten sie keinen Effekt auf die Detektion durch die veränderten Lagerungsbedingungen feststellen, mit Ausnahme von *Cryptosporidium spp.* und *Campylobacter jejuni*, welche nur schwach unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden konnten. Allerdings ist hier zu bedenken, dass Lalani et al. auch in ihrem Lagerungsversuch bei Raumtemperatur Schwierigkeiten mit der Detektion der *Campylobacter* und *Cryptosporidien* hatten und entsprechend unklar ist, was letztlich die verantwortliche Variable war.

4.5 Resümee

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass Stuhlkarten ein vielversprechendes Werkzeug zur Sammlung, Lagerung und Multiplex PCR-Testung sein können. Auch nach einer Lagerung von bis zu 6 Wochen bei Raumtemperatur ohne Sauerstoff- und Feuchtigkeits-Absorber sowie Fixiermittel lassen sich virale, bakterielle und parasitäre Erreger nachweisen. Um die Methode jedoch als verlässliches Instrument für die TD Diagnostik zu etablieren, braucht es weitere Studien. Fixiermittel, Sauerstoff- und Feuchtigkeitsabsorber müssen auf ihren Nutzen überprüft werden. Ebenfalls müssen die verschiedenen Filterpapier-Karten sowie Extraktionsmethoden in ihrer Effizienz verglichen und weitere mögliche TD-Erreger auf ihre Lagerungsfähigkeit überprüft werden. Ausstehend ist letztlich auch die Testung der Methode unter realen Bedingungen mit tatsächlichen Patientenstühlen unbekannter Pathogenität und tropischem Klima.

Sollte sich das Verfahren durchsetzen, würden sowohl Kühlketten wie auch unvollständige Analysen in Reiseländern und verspätete Analysen abgeklungener Infektionen in der Heimat der Vergangenheit angehören. Die einfache Handhabung könnte bei Reisenden zu einer hohen Compliance führen. Es könnten mehr und realitätsnähere Daten bezüglich der Epidemiologie von TD erhoben werden. Die Entwicklung wirksamer prophylaktischer Maßnahmen sowie von Impfstoffen würde voranschreiten, die Ausbreitung von Erregern könnte eingedämmt werden.

Gleichzeitig müssen aber auch die Beschränkungen der Methode erkannt werden. Während sich die Erreger zwar erfolgreich per PCR detektiert lassen, verfügt man letztlich nicht über eine Probe mit lebensfähigen Erregern. Eine Anzucht der detektierten Erreger ist nicht mehr möglich. Ein Nachweis von Antibiotikaresistenzen muss genetisch erfolgen. Innerhalb dieser Einschränkungen könnte die Methode jedoch zu einer deutlichen Verbesserung der Datenlage und damit auch der Prävention, Diagnostik und Therapie von TD führen. Es gilt nun das Vorgehen in weiteren Studien zu verfeinern.

5 Zusammenfassung

Ziel: Bis zu 30% der international Reisenden erkranken an Traveller's Diarrhea (TD). Die Datenlage bezüglich TD ist sehr begrenzt, da in Ländern mit hohen TD-Inzidenzen Labore mit der notwendigen Kapazität und Ausstattung für eine umfassende Diagnostik oftmals nicht ausreichend vorhanden sind. Gleichzeitig ist der Transport konventionell in Tubes tiefgefrorener Stuhlproben mithilfe einer geschlossenen Kühlkette, wenn nicht unmöglich, dann zumindest teuer und umständlich. Diese Studie überprüft die prinzipielle Tauglichkeit von Haemocult®-Stuhlkarten in Kombination mit einer Multiplex-PCR als unkompliziertes Instrument für die Lagerung, den Transport sowie die nachfolgende Untersuchung von Stuhlproben bei fehlender Kühlkette.

Methoden: In Verdünnungsreihen wurde zunächst überprüft, ob es durch die Extraktion von auf Stuhlkarten getrockneten Stuhlproben, die exemplarische Pathogene in abnehmenden Konzentrationen enthielten, zu einer Abschwächung des Signals im Vergleich zu jenem von herkömmlich tiefgefrorenen Proben kommt. Hierzu wurden die letzten positiven Verdünnungsstufen verglichen. Anschließend wurde in einem Lagerungsversuch die korrekte Nachweisbarkeit der auf dem Filterpapier getrockneten und bei Raumtemperatur gelagerten Pathogene über einen Zeitraum von bis zu 6 Wochen überprüft. Stellvertretend für die zahlreichen TD-auslösenden Bakterien, Viren und Einzellern wurden Stuhlproben genutzt, die *Campylobacter jejuni*, *Norovirus GI / GII* beziehungsweise *Entamoeba histolytica* enthielten.

Ergebnisse: Die letzten positiven Verdünnungsstufen der konventionell in Tubes sowie auf Stuhlkarten gelagerten Stuhlproben der Verdünnungsreihen waren vergleichbar. Im Lagerungsversuch war die Detektion der Pathogene bis zu Tag 42 möglich. Bei der Lagerung auf den Stuhlkarten konnten 97,6% der *C. jejuni* positiven, 100% der *E. histolytica* positiven, 97,6% von *Norovirus GI* sowie 100% von *Norovirus GII* positiven Proben erfolgreich detektiert werden.

Schlussfolgerung: Stuhlkarten scheinen ein vielversprechendes Werkzeug zur unkomplizierten Sammlung und Lagerung von Stuhlproben bei Raumtemperatur zu sein, welches in Kombination mit einer Multiplex-PCR den Nachweis von gängigen TD-Pathogenen ermöglicht.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. <https://www.e-unwto.org/doi/pdf/10.18111/9789284419029>
2. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/2014-west-africa/case-counts.html>
3. Kumarasamy, K.K., et al., *Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study*. *Lancet Infect Dis*, 2010. **10**(9): p. 597-602.
4. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf>
5. Freedman, D.O., et al., *Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(2): p. 119-30.
6. Ericsson, C.D., *Travellers' diarrhoea*. *Int J Antimicrob Agents*, 2003. **21**(2): p. 116-24.
7. Kittittrakul, C., et al., *Traveler's Diarrhea in Foreign Travelers in Southeast Asia: A Cross-Sectional Survey Study in Bangkok, Thailand*. *Am J Trop Med Hyg*, 2015. **93**(3): p. 485-90.
8. Greenwood, Z., et al., *Gastrointestinal infection among international travelers globally*. *J Travel Med*, 2008. **15**(4): p. 221-8.
9. Steffen, R., et al., *Epidemiology, etiology, and impact of traveler's diarrhea in Jamaica*. *JAMA*, 1999. **281**(9): p. 811-7.
10. Hill, D.R. and E.T. Ryan, *Management of travellers' diarrhoea*. *BMJ*, 2008. **337**: p. a1746.
11. Apelt, N., et al., *The Prevalence of Norovirus in returning international travelers with diarrhea*. *BMC Infect Dis*, 2010. **10**: p. 131.
12. Zaidi, D. and E. Wine, *An update on travelers' diarrhea*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015. **31**(1): p. 7-13.
13. McGregor, A.C. and S.G. Wright, *Gastrointestinal symptoms in travellers*. *Clin Med (Lond)*, 2015. **15**(1): p. 93-5.
14. Piyaphanee, W., et al., *Incidence and impact of travelers' diarrhea among foreign backpackers in Southeast Asia: a result from Khao San road, Bangkok*. *J Travel Med*, 2011. **18**(2): p. 109-14.
15. DuPont, H.L., *Systematic review: prevention of travellers' diarrhoea*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **27**(9): p. 741-51.
16. Kozicki, M., R. Steffen, and M. Schar, *'Boil it, cook it, peel it or forget it': does this rule prevent travellers' diarrhoea?* *Int J Epidemiol*, 1985. **14**(1): p. 169-72.
17. Shlim, D.R., *Looking for evidence that personal hygiene precautions prevent traveler's diarrhea*. *Clin Infect Dis*, 2005. **41 Suppl 8**: p. S531-5.
18. de la Cabada Bauche, J. and H.L. Dupont, *New Developments in Traveler's Diarrhea*. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2011. **7**(2): p. 88-95.
19. Connor, B.A., *Sequelae of traveler's diarrhea: focus on postinfectious irritable bowel syndrome*. *Clin Infect Dis*, 2005. **41 Suppl 8**: p. S577-86.
20. Okhuysen, P.C., et al., *Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(9): p. 1774-8.
21. Stermer, E., et al., *Is traveler's diarrhea a significant risk factor for the development of irritable bowel syndrome? A prospective study*. *Clin Infect Dis*, 2006. **43**(7): p. 898-901.
22. Mutsch, M., et al., *Post-infectious sequelae of travelers' diarrhea: irritable bowel syndrome*. *J Travel Med*, 2014. **21**(2): p. 141-3.
23. Connor, B.A., *Chronic diarrhea in travelers*. *Curr Infect Dis Rep*, 2013. **15**(3): p. 203-10.
24. Schwille-Kiuntke, J., N. Mazurak, and P. Enck, *Systematic review with meta-analysis: post-infectious irritable bowel syndrome after travellers' diarrhoea*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015. **41**(11): p. 1029-37.
25. Yates, J.A. and L.C. Stetz, *Reiter's syndrome (reactive arthritis) and travelers' diarrhea*. *J Travel Med*, 2006. **13**(1): p. 54-6.

26. Sole, M., et al., *Extended spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli faecal carriage in Spanish travellers returning from tropical and subtropical countries*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(10): p. O636-9.
27. Kantele, A., et al., *Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(6): p. 837-46.
28. Steffen, R., C. deBernardis, and A. Baños, *Travel epidemiology—a global perspective*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003. **21**(2): p. 89-95.
29. Hill, D.R., *Health problems in a large cohort of Americans traveling to developing countries*. J Travel Med, 2000. **7**(5): p. 259-66.
30. Steffen, R., et al., *Epidemiology of travelers' diarrhea: details of a global survey*. J Travel Med, 2004. **11**(4): p. 231-7.
31. Steffen, R., D.R. Hill, and H.L. DuPont, *Traveler's diarrhea: a clinical review*. JAMA, 2015. **313**(1): p. 71-80.
32. Pitzurra, R., et al., *Diarrhoea in a large prospective cohort of European travellers to resource-limited destinations*. BMC Infect Dis, 2010. **10**: p. 231.
33. Liu, J., et al., *Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(1): p. 98-103.
34. Zboromyrska, Y., et al., *Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(10): p. O753-9.
35. Paschke, C., et al., *Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(8): p. 1194-200.
36. Sinha, R., et al., *Collecting Fecal Samples for Microbiome Analyses in Epidemiology Studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. **25**(2): p. 407-16.
37. Grimes, K.A., et al., *PCR-based assay using occult blood detection cards for detection of diarrheagenic Escherichia coli in specimens from U.S. travelers to Mexico with acute diarrhea*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2227-30.
38. Ajami, N., et al., *Characterization of norovirus-associated traveler's diarrhea*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(2): p. 123-30.
39. Amar, C.F., et al., *Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007. **26**(5): p. 311-23.
40. Atmar, R.L., et al., *Norwalk virus shedding after experimental human infection*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(10): p. 1553-7.
41. Iversen, A.M., et al., *Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: evidence of prolonged infectivity in a food handler*. Lancet, 1987. **2**(8558): p. 556-8.
42. Coste, J.F., et al., *Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(6): p. 1841-9.
43. Chapin, A.R., et al., *Prevalence of norovirus among visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1112-7.
44. Navidad, J.F., et al., *Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(9): p. 3018-24.
45. Mengelle, C., et al., *Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(10): p. E458-65.
46. Allos BM, Iovine N, Blaser M (2015) *Campylobacter jejuni and Related Species*. In: 349 Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases vol 2. 350 Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, pp 2485---2493

47. Parija, S.C., J. Mandal, and D.K. Ponnambath, *Laboratory methods of identification of Entamoeba histolytica and its differentiation from look-alike Entamoeba spp.* Trop Parasitol, 2014. **4**(2): p. 90-5.
48. Marsden, A.T., *The detection of the cysts of Entamoeba histolytica in the faeces by microscopic examination.* Med J Aust, 1946. **1**: p. 915-9.
49. Lalani, T., et al., *Detection of enteropathogens associated with travelers' diarrhea using a multiplex Luminex-based assay performed on stool samples smeared on Whatman FTA Elute cards.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2015. **83**(1): p. 18-20.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Vorgehen bei der Erstellung der Campylobacter jejuni-Verdünnungsreihe	19
Abbildung 2 - Vorgehen bei der Erstellung der Norovirus-Verdünnungsreihen	21
Abbildung 3 - Aufbau einer Stuhlkarte	22
Abbildung 4 - Faltung eines ausgeschnittenen Filterpapierfelds in einem Tube.....	23
Abbildung 5 - Schematische Darstellung des miniMags von bioMérieux®	24
Abbildung 6 - Übersicht der gewonnenen Proben der Lagerungsversuche	30
Abbildung 7 - Zeitlicher Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	32
Abbildung 8 - Zeitlicher Ablauf der Hybridisierung.....	33

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Norovirus-Proben der Verdünnungsreihen.....	21
Tabelle 2 Norovirus-Proben des Lagerungsversuchs.....	28
Tabelle 3 Ergebnisse der Campylobacter-Verdünnungsreihe	35
Tabelle 4 Ergebnisse der Entamoeba-Histolytica-Verdünnungsreihe	36
Tabelle 5 Ergebnisse der Norovirus GI Verdünnungsreihe	37
Tabelle 6 Ergebnisse der Norovirus GII Verdünnungsreihe	37
Tabelle 7 Ergebnisse des Lagerungsversuchs	38

6.4 Abkürzungen

- AITM Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München
- CFU Colony Forming Unit
- ESBL Extended-Spectrum-Betalaktamase
- GPP Gastrointestinal Pathogen Panel der Firma Luminex
- LGL Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- LoD Limit of Detection
- LPC Last Positive Sample Concentration
- LPD Last Positive Dilutionstep
- MFI Mean Fluorescent Intensity
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PFU Plaque Forming Unit
- TD Traveller's Diarrhea

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

Da in dieser Untersuchung nur irreversibel anonymisierte Proben verwendet wurden, besteht nach Bescheinigung der Ethikkommission der LMU (Projekt Nr:19-582) bei der vorliegenden Arbeit keine Beratungspflicht.

7.2 Danksagungen

Ein erstes Dankeschön gebührt Carolin Mengele, Kerstin Helfrich und Malkin Bauer für ihre unermüdliche Unterstützung sowie die geduldige Einführung in die Welt der Pipetten, Agarplatten und Thermocycler.

Bei Prof. Dr. Thomas Löscher, Prof. Dr. Hans Dieter Nothdurft, Prof. Dr. Gisela Bretzel und Dr. Marcus Beissner möchte ich mich für die Betreuung und fachliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Alberer, welcher mich damals als studentische Hilfskraft einstellte und somit die wunderschöne Zeit im Tropeninstitut, die vielen Reisen in ferne Länder sowie letztlich diese Doktorarbeit ins Rollen brachte.

7.3 Eidesstattliche Versicherung

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

„Detektion gastrointestinaler Erreger auf Haemocult®-Karten mittels Multiplex-PCR“

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.

Bad Aussee, 18.03.2021

Abraham Nicklas Schlenker