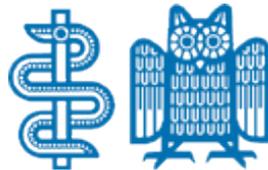


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. Sören Becker



**Molekulare Diagnostik und Charakterisierung von intestinalen
Infektionen mit dem Helminthen *Strongyloides stercoralis***

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER
MEDIZIN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES
SAARLANDES**

2021

vorgelegt von Nivetha Bauer-Piraisoody

geboren am 5. Mai 1992 in Dudweiler-Saar

Tag der Promotion: 21. Januar 2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Lutz von Müller

Prof. Dr. Marcin Jan Krawczyk

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Fassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung.....	3
2.1 <i>Strongyloides stercoralis</i>	3
2.1.1 Vorkommen und Verbreitung.....	3
2.1.2 Lebenszyklus.....	4
2.1.3 Klinisches Bild der Infektion.....	6
2.1.4 Therapiemöglichkeiten	9
2.1.5 Koinfektionen mit Hakenwürmern	9
2.2 Diagnostische Methoden zur Detektion einer <i>S. stercoralis</i> -Infektion.....	10
2.2.1 Direkte Stuhlmikroskopie	11
2.2.2 Kato-Katz Technik.....	11
2.2.3 Koga-Agarplatten-Kultur.....	12
2.2.4 Baermann-Anreicherung.....	12
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	13
2.3 Molekulare Charakterisierung von <i>Strongyloides</i> spp.....	14
2.4 Ziele dieser Arbeit.....	16
3 Material und Methoden.....	17

3.1	Ethische Stellungnahme.....	17
3.2	Herkunft der Stuhlproben	17
3.3	Molekulare Nachweisverfahren.....	21
3.3.1	DNA-Extraktion.....	21
3.3.2	Real-time PCR	23
3.3.3	DNA-Sequenzierung.....	24
3.4	Statistische Analyse	27
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Evaluation eigens entwickelter Primer zur <i>Strongyloides</i> -Diagnostik	29
4.2	Testung einiger publizierter Primer	31
4.3	Vergleich zweier automatisierter Nukleinsäureextraktionsverfahren.....	31
4.4	Vergleich von Mikroskopie und real-time PCR zum Nachweis von <i>Strongyloides</i> spp.....	32
4.4.1	Altersverteilung.....	32
4.4.2	Geschlechterverteilung	34
4.4.3	Methodenvergleich	34
4.4.4	Abgrenzung zu Hakenwurm-Infektionen	38
4.4.5	Koinfektionen von <i>S. stercoralis</i> und Hakenwürmern	39
4.4.6	Laborvergleich der Koinfektionsrate von PCR-positiven <i>S. stercoralis</i> -Proben	40
4.5	Exemplarische Darstellung einer real-time PCR mit nachfolgender DNA-Sequenzierung für <i>S. stercoralis</i>	42
4.6	Sequenzierung des 18S SSU RNA-Gens von <i>Strongyloides</i> spp.	42
4.7	Implementation der 18S SSU RNA Sequenzierung für die Typisierung	44
5	Diskussion.....	47
5.1	Klinische Relevanz der Strongyloidiasis unter Berücksichtigung der durchgeführten Diagnostik.....	47
5.2	Diagnostische Bedeutung der Koinfektionen von <i>S. stercoralis</i> und	

Hakenwürmer.....	51
5.3 Bedeutung der DNA-Sequenzierung für die <i>Strongyloides</i> -Forschung.....	53
5.4 Abschließende Beurteilung.....	54
6 Literaturverzeichnis	55
7 Publikationen	65
8 Danksagung.....	66
9 Curriculum vitae	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 Geschätzte weltweite Prävalenz von <i>S. stercoralis</i> -Infektionen.....	4
Abb. 2-2 Lebenszyklus von <i>S. stercoralis</i>	6
Abb. 2-3 Exemplarische Hautmanifestation einer <i>S. stercoralis</i> Infektion	8
Abb. 2-4 Vorbereitung für den direkten Fäkalausstrich.....	11
Abb. 2-5 Sekundäre Struktur der 18S rDNA von <i>Strongyloides</i> spp	15
Abb. 3-1 Herkunft der verwendeten Stuhlproben.....	18
Abb. 3-2 Karte des Taabo HDSS.....	19
Abb. 3-3 Eingesetzte Oligonukleotidprimer für die real-time PCR.	23
Abb. 3-4 Arbeitsschritte zur molekularen Sequenzanalyse von real-time PCR-positiven Proben von <i>Strongyloides</i> spp.....	24
Abb. 4-1 Sequenz AF279916 - <i>S. stercoralis</i> 18s small subunit ribosomal RNA gene	29
Abb. 4-2 Prävalenz der Ko- und Monoinfektionen in Korrelation mit den Altersgruppen.....	33
Abb. 4-3 Prävalenz von <i>S. stercoralis</i> in verschiedenen diagnostischen Techniken.....	36
Abb. 4-4 Auswertung C _t -Werten von Labor 1 & 2 anhand einer Boxplot-Grafik.	37
Abb. 4-5 Kreisdiagramm zur Darstellung der Hakenwurm Koinfektionen in PCR positiven Proben für <i>S. stercoralis</i> in Labor 1.....	40
Abb. 4-6 Kreisdiagramm zur Darstellung der Hakenwurm Koinfektionen in PCR positiven Proben für <i>S. stercoralis</i> in Labor 2.....	41
Abb. 4-7 Exemplarische real-time PCR mit der Probe ID 381.....	43
Abb. 4-8 Gel-Elektrophorese mit den Amplifikaten der Nested-PCR	43
Abb. 4-9 Sequenzierungsergebnis der Probe ID 381 mit dem Primer Str-365F.	44
Abb. 4-10 Übersicht über die Sequenzierungen der 34 mikroskopisch positiven Proben für <i>S. stercoralis</i> aus drei verschiedenen Studien.....	45
Abb. 5-1. Morphologie rhabditiformer <i>S. stercoralis</i> L ₁ Larven (A+B) und Hakenwurm L ₁ Larven (C+D) -detektiert mittels Baermann Technik.....	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1 Übersicht über die entwickelten Primer	30
Tab. 4-2 Vorbeschriebene und getestete Primer zur molekularen Detektion von <i>S. stercoralis</i>	31
Tab. 4-3 Vergleich zweier Extraktionsverfahren für <i>S. stercoralis</i>	32
Tab. 4-4 Altersverteilung der Probanden aus Taabo, 2009	33
Tab. 4-5 Geschlechtsspezifische Prävalenzunterschiede von Infektionen mit <i>S. stercoralis</i> , Hakenwürmern und Koinfektionen bei Studienteilnehmern in Taabo	34
Tab. 4-6 Prävalenz des <i>S. stercoralis</i> in verschiedenen diagnostischen Techniken..	35
Tab. 4-7 Diagnostischer Vergleich von BM, KAP und <i>S. stercoralis</i> spezifischer PCR in zwei verschiedenen Laboratorien	36
Tab. 4-8 Vergleich der C _t -Werte der real-time PCR zweier verschiedener Laboratorien	37
Tab. 4-9 Prävalenz der Hakenwurm-Infektionen.....	38
Tab. 4-10 Prävalenz der <i>S. stercoralis</i> – und Hakenwurminfektion anhand einer Vierfeldertafel.....	39
Tab. 4-11 Vergleich von parasitologischen Befunden in 13 Stuhlproben.	39
Tab. 4-12 Ergebnisse von der real-time PCR und DNA-Sequenzierung aus dem Sediment mikroskopisch positiver Proben für <i>S. stercoralis</i>	42
Tab. 4-13 Darstellung der Punktmutationen von sequenzierten <i>Strongyloides spp.</i>	46

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BM	Baermann-Anreicherungs-methode
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C _t	Cycle threshold
EKM	Ether-Konzentrations-Methode
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GE	Gelelektrophorese
HDSS	Health and demographic surveillance system
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HVR	Hypervariable regions
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IgG	Immunglobulin G
KAP	Koga-Agarplatten-Kultur
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIDIAG	Studienkonsortium “Diagnosis of Neglected Infectious Diseases”
NPV	Negative predictive value
PCR	Polymerase chain reaction
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
SSU	Small subunit rDNA
STH	Soil-transmitted helminths (dt.: durch Bodenkontakt übertragbare Würmer)
WHO	World Health Organization

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Humane Infektionen mit dem Rundwurm *Strongyloides stercoralis* verursachen ein breites klinisches Krankheitsspektrum, das von einem asymptomatischen Verlauf bis zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung reichen kann. Um die eingeschränkte Sensitivität der herkömmlichen mikroskopischen Techniken zu erhöhen, wurde als molekulare Detektionstechnik eine spezifische real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entwickelt, deren diagnostische Genauigkeit im Vergleich zu klassischen mikrobiologischen Methoden zum Nachweis von *S. stercoralis* und den morphologisch ähnlichen Hakenwürmern in dieser Arbeit untersucht wird. Darüber hinaus wurden real-time PCR Untersuchungen für mikroskopisch *S. stercoralis* gesicherte Proben durchgeführt und die Resultate mit dem Schweizerischen Tropeninstitut verglichen. In einem weiteren experimentellen Teil wurden Sequenzierungen durchgeführt, um eine molekulare Feincharakterisierung der *Strongyloides*-positiven Proben anhand von Detektion hypervariabler Regionen des 18S rRNA-Gens zu erreichen. Für diese Untersuchungen standen fixierte humane Stuhlproben, gesammelt im Rahmen verschiedener afrikanischer Forschungsprojekte, zur Verfügung. Die real-time PCR zeigte die höchste Detektionsrate (16.8%), gefolgt von den mikroskopischen Techniken. Dabei wurden 50% der *S. stercoralis*- Infektionen ausschließlich durch die real-time-PCR als positiv nachgewiesen. Alle Proben, die mikroskopisch positiv auf *S. stercoralis* getestet wurden, konnten durch die PCR bestätigt werden. Die durchgeführten Sequenzierungen des 18S rRNA-Gens von *Strongyloides spp.* aus insgesamt 24 PCR-positiven Proben ergaben nur in fünf Fällen eindeutig auswertbare Sequenzen, wobei sich eine 100%-ige Übereinstimmung mit publizierten Sequenzen von *S. stercoralis* zeigte. Die Sequenzierung waren nur bei Proben erfolgreich, welche bereits mikroskopisch positiv waren und damit eine quantitativ hohe Wurmlast aufwiesen. In dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass die eingesetzte PCR sensitiver als mikroskopische und kulturelle Diagnostikverfahren zum Nachweis von *S. stercoralis* ist und eine sichere Abgrenzung von Infektionen mit morphologisch ähnlichen Helminthen erlaubt. Mittels Sequenzierung des 18S rRNA-Gens kann eine exaktere Differenzierung innerhalb der verschiedenen *Strongyloides*-Spezies vorgenommen werden, jedoch bedarf diese Methodik noch einer weiteren Optimierung und sollte zukünftig durch Ganzgenomsequenzierungs-Experimente ergänzt werden.

1.2 Abstract

Human infections with the helminth species *Strongyloides stercoralis* encompass a wide clinical spectrum, ranging from asymptomatic carriage to life-threatening disease. To increase the sensitivity of conventional microscopy new molecular tools, for example the real-time polymerase-chain-reaction has been developed. We compared the diagnostic accuracy of those real-time PCR with microscopy tools for the detection of *S. stercoralis* and the morphologically similar nematode hookworm. Furthermore, we investigated the inter-laboratory concordance of *S. stercoralis*-specific real-time PCR in already microscopically tested positive samples in our and a foreign laboratory. In another experimental part of our work we implemented sequencing for more detailed molecular characterization of *S. stercoralis* stains, which was based on the detection of hypervariable regions of the 18S-rRNA. For the investigation we needed human stool specimens which were collected during various african research projects in the last years. The real-time PCR resulted in higher detection rates (16.8%) as compared to the microscopic techniques. 50% of the *S. stercoralis*-infections were exclusively detected by the real-time PCR. All samples with positive microscopy were also positive by real-time PCR. The sequencing of the 18S rRNA of 24 samples yielded only 5 clearly evaluable sequences showing 100% agreement with published sequences of *S. stercoralis*. The sequencing was only successful in samples that were already microscopically positive and thus had a quantitatively high worm load. In this work it could be shown that the used real time PCR is more sensitive than microscopic and cultural diagnostic methods for the detection of *S. stercoralis* and allows clear discrimination to helminths with similar morphologically. By sequencing the 18S rRNA gene subtyping of different *Strongyloides* species can be made, but this method needs further optimization and should be complemented in the future by whole genome sequencing experiments.

2 Einleitung

2.1 *Strongyloides stercoralis*

2.1.1 Vorkommen und Verbreitung

Strongyloides stercoralis ist ein humanpathogener Parasit aus der Gruppe der Fadenwürmer (Nematoden) und kann in endemischen Regionen bei geeigneten klimatischen Bedingungen über auf dem Erdboden befindliche infektiöse Larven auf den Menschen übertragen werden (Schär et al., 2014), weshalb er auch zur Gruppe der durch Bodenkontakt übertragenen Würmer (Helminthen) gehört, die im Englischen als *soil-transmitted helminths* (STHs) bezeichnet werden. Die globale Verbreitung von Infektionen durch *S. stercoralis* ist bisher unzureichend untersucht und wissenschaftlichen Schätzungen zufolge liegt die Gesamtzahl der Infizierten zwischen 30 Millionen und mehr als 370 Millionen infizierten Menschen global (Bisoffi et al., 2013). Aufgrund der großen Anzahl an betroffenen Menschen und der dennoch geringen Bedeutung, welche die biomedizinischen Wissenschaftsdisziplinen dieser Infektion über lange Zeit beigemessen haben, zählt die Strongyloidiasis auch zu den sogenannten „vernachlässigten Tropenkrankheiten“, im Englischen als *neglected tropical diseases* bezeichnet. Als endemische Gebiete gelten Regionen mit warmfeuchtem Klima sowie mit fehlenden flächendeckenden Sanitär- und Abwasseranlagen (Khieu et al., 2013). Infektionen finden sich nicht nur in den tropischen und subtropischen Regionen von Afrika, Südostasien, Lateinamerika oder Australien, sondern auch in Teilen der Vereinigten Staaten von Amerika (z.B. Appalachen) und in südlichen Teilen Europas (z.B. spanische Mittelmeerküste) (Becker et al., 2015)(Pocaterra et al., 2005)(Luvira et al, 2014) (s. Abb.2-1). Insgesamt sind die Epidemiologie, die humanmedizinische Bedeutung sowie die adäquate Diagnostik und Therapie von Infektionen durch *S. stercoralis* deutlich weniger gut beschrieben als für andere STHs, zu denen der Spulwurm *Ascaris lumbricoides*, der Peitschenwurm *Trichuris trichiura* und die beiden Hakenwurmspezies *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* gehören (Schär, et al., 2013).

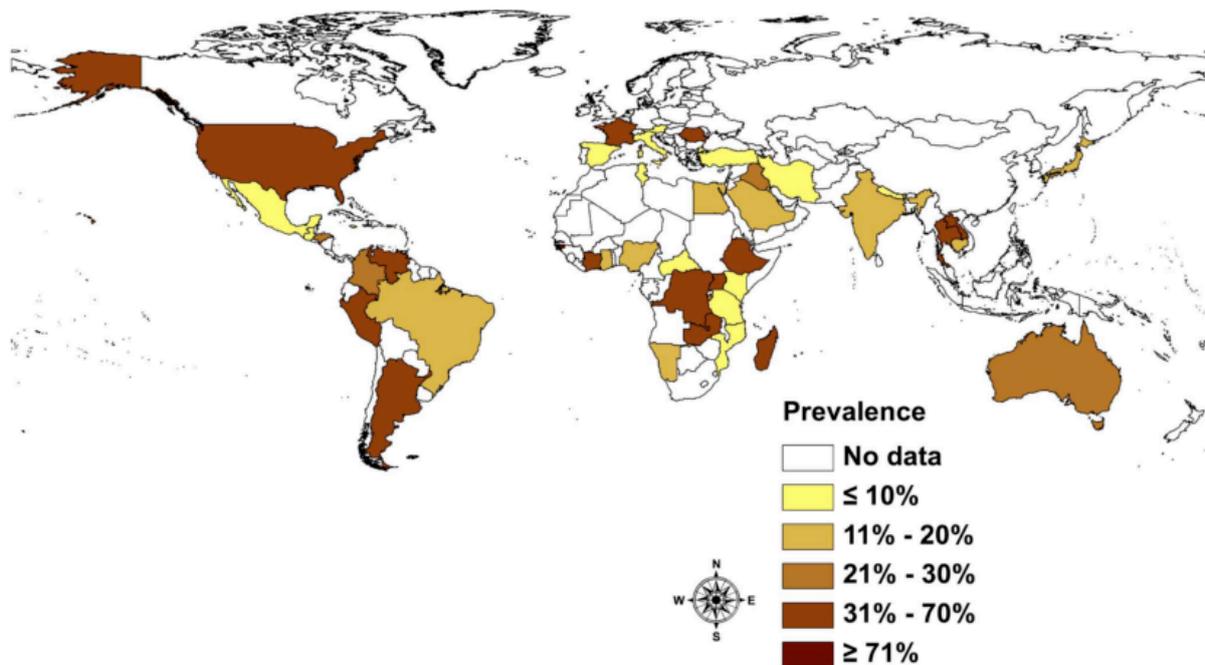


Abb. 2-1 Geschätzte weltweite Prävalenz von *S. stercoralis*-Infektionen, basierend auf publizierten epidemiologischen Studien (aus: Schär et al., 2013).

2.1.2 Lebenszyklus

S. stercoralis wurde erstmals im Jahre 1876 als pathogen beschrieben (Schär, et al., 2013). Der gesamte Lebenszyklus, die Pathogenese der Strongyloidiasis, sowie die unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen beim Menschen wurden jedoch erst in den 1930er Jahren weitergehend untersucht (Schär et al., 2013). Der Lebenszyklus von *S. stercoralis* ist komplex und weist aus humanmedizinischer Sicht zwei spezifische und besonders wichtige Verläufe auf, die sogenannte Autoinfektion und die Hyperinfektion (Jürg Utzinger et al., 2012). Ist ein menschlicher Wirt mit *S. stercoralis* infiziert, so leben die adulten Weibchen im menschlichen Gastrointestinal-Trakt und legen dort ihre Eier ab. Die Larven des ersten Stadiums (L_1 , sogenannte rhabditiforme Larven) schlüpfen bereits im Darm und werden anschließend teilweise über den Stuhl ausgeschieden, was in Regionen mit unzureichenden hygienischen Standards (z.B. Nicht-Verfügbarkeit von Toiletten) auf diesem Weg zu einer Kontamination des Erdbodens führen kann. Im Falle entsprechender Umgebungsbedingungen (hohe Temperatur und Feuchtigkeit) entwickeln sich die rhabditiformen Larven im Boden (= außerhalb des menschlichen Wirtes) zu infektiösen filariformen Larven (L_3), welche wiederum in die intakte Haut (z.B. beim Barfußgehen) in den menschlichen Organismus eindringen können. Die eingedrungenen L_3 -Larven erreichen über die Blutzirkulation die Alveolarräume der Lunge. Von dort aus können sie über den Bronchialbaum und die Trachea

bis in den Rachenbereich wandern, wo sie unbemerkt verschluckt werden und so in den Gastrointestinaltrakt gelangen (Siddiqui & Berk, 2001). Im Gastrointestinaltrakt reifen die Larven zu adulten Würmern heran und beginnen schließlich mit der Eiproduktion (Utzinger et al., 2012). Dieser Teil des Zyklus stellt den Weg der sogenannten Autoinfektion dar, in welchem sich *S. stercoralis* über viele Jahre befinden kann und sich kontinuierlich repliziert (Abb.2-2). Da das Immunsystem des infizierten Wirtes jedoch eine überschießende Eiproduktion verhindert, handelt es sich zumeist um asymptomatisch verlaufende Infektionen. Einige Studien berichten von Personen mit Infektionen, die über 60 Jahre bestanden, bevor sie erstmals symptomatisch wurden. Die Autoinfektion ist ein Merkmal von *S. stercoralis*, das diesen Helminthen von nahezu allen anderen Parasiten, welche den Menschen befallen unterscheidet (mit Ausnahme des seltenen Wurmes *Capillaria* spp.) (www.antimicrobe.org, zuletzt aufgerufen am 15.12.2020).

Die L₁-Larven, die im Darm schlüpfen und nicht mit dem Stuhl ausgeschieden werden, können außerdem einen alternativen Entwicklungsweg nehmen: Sie können sich im Darm des Menschen auch direkt zu infektiösen L₃-Larven entwickeln, welche in der Lage sind, die Darmschleimhaut zu penetrieren und sich im gesamten Körper des menschlichen Wirts auszubreiten. Im Falle einer Immunsuppression (z.B. bei malignen Erkrankungen, hochdosierter Kortikosteroid-Behandlung, Koinfektionen mit Retroviren wie HIV oder Organtransplantationen) kann der Wirt seine Fähigkeit verlieren, die Infektion im oben beschriebenen Stadium der Autoinfektion zu kontrollieren. In diesem Fall können sich die Wurmlarven rasch vermehren, sich in großer Anzahl in extraintestinale Organsysteme ausbreiten und einen Sepsis-ähnlichen Zustand verursachen, welcher als Hyperinfektionssyndrom bezeichnet wird (Buonfrate et al., 2013). Unbehandelt verläuft diese Form der Infektion häufig tödlich.

Aufgrund des Lebenszyklus, welcher es *S. stercoralis* erlaubt sich über viele Jahre unbemerkt in einem infizierten Wirt zu replizieren, muss eine Strongyloidiasis auch dann bei Reiserückkehrern aus endemischen Regionen differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden, wenn der letzte Aufenthalt in einem Endemiegebiet bereits viele Jahre zurückliegt (Utzinger et al., 2012).

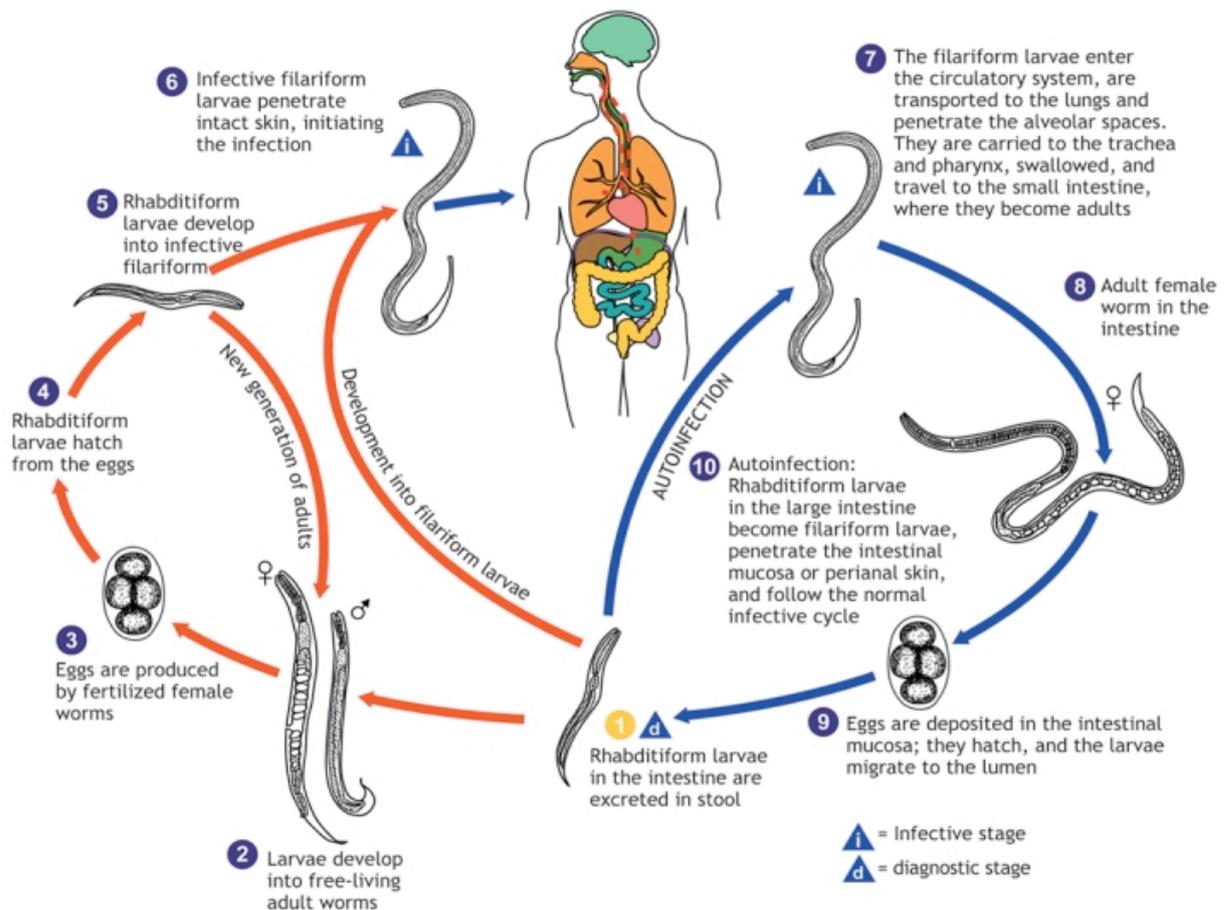


Abb. 2-2 Lebenszyklus von *S. stercoralis*. Das Schaubild veranschaulicht sowohl den externen Infektionsweg über die Penetration der intakten Haut, als auch den Weg der Autoinfektion durch die Penetration der Darmschleimhaut
(Quelle: <https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/>-zuletzt aufgerufen am 15.12.2020)

2.1.3 Klinisches Bild der Infektion

Das klinische Bild einer Infektion mit dem Fadenwurm *S. stercoralis* ist äußerst variabel und kann sich aufgrund des skizzierten Lebenszyklus sowohl asymptomatisch, als auch mit lebensbedrohlichen Verläufen präsentieren. Diese Unterschiede in der klinischen Ausprägung hängen maßgeblich von der Intensität der Infektion sowie vom Immunstatus des betroffenen Patienten ab (Khieu et al., 2013).

2.1.3.1 Akute Strongyloidiasis

Unmittelbar oder einige Tage bis Wochen nach dem Eindringen der Larve durch die intakte Haut kann es zu einer lokalen Reaktion mit Rötung und Juckreiz kommen (Freedman,1991). In einigen Fällen kann die Migration der Larve durch das Subkutangewebe als sich relativ schnell bewegendes (einige cm pro Stunde) juckender Hautausschlag (sogenannte „Larva currens“) beobachtet werden. Pulmonale Symptome wie Husten und tracheale Irritationen entstehen einige Tage später durch das Erreichen der Lunge. Symptome wie Diarrhoen, Obstipationen und Bauchschmerzen beginnen etwa zwei Wochen nach der Infektion und kommen durch die Passage der Larven durch den Gastrointestinaltrakt zustande. Die Larven sind drei bis vier Wochen nach der Primärinfektion erstmals im Stuhl nachweisbar (Keiser et al,2004).

2.1.3.2 Chronische Strongyloidiasis und Hyperinfektionssyndrom

Chronische Infektionen verlaufen meistens asymptomatisch. Häufige gastrointestinale Beschwerden sind intermittierendes Erbrechen, Diarrhoen und wechselnde Stuhlgewohnheiten. (Peri-)analer Juckreiz und dermatologische Manifestationen wie Urtikaria oder juckende Hautausschläge (Abb.2-3) sind ebenso möglich. Seltener kann es zur Ausbildung eines nephrotischen Syndroms (Wong et al, 1998) oder zu asthmatischen Beschwerden kommen. Bei sprunghaft ansteigender Larvenlast im Rahmen einer Immunsuppression können akute Komplikationen wie Ileus und hämodynamisch relevante gastrointestinale Blutungen durch die Schleimhautpenetration und rasche Vermehrung der Larven verursacht werden (Keiser et al., 2004).



Abb. 2-3 Exemplarische Hautmanifestation einer *S. stercoralis* Infektion. Hautausschlag auf dem Rücken und dem Bauch eines 43-jährigen Landwirts aus Kambodscha als Symptom einer *S. stercoralis* Infektion (publiziert in Khieu et al., 2013)

Ein beginnendes Hyperinfektionssyndrom äußert sich meist durch eine Verschlechterung von gastrointestinalen sowie pulmonalen Symptomen (Keiser et al., 2004). Der Beginn eines Hyperinfektionssyndroms kann akut oder schleichend sein (Wurtz et al., 1994). In der Mehrzahl der Fälle ist das Syndrom mit einer immunsuppressiven Therapie, Organ- und Knochenmarkstransplantationen, hämatologischen Malignomen oder anderen Infektionskrankheiten assoziiert (Kia et al., 2008). Fieber und Schüttelfrost sind nicht charakteristisch, können jedoch insbesondere auftreten, wenn die mit Bakterien kontaminierten Wurmlarven aus dem Gastrointestinaltrakt in andere Organe vordringen. Allgemeinerscheinungen sind Müdigkeit, Schwäche und unspezifische Schmerzen im gesamten Körper. Blutuntersuchungen während einer Hyperinfektion zeigen häufig eine Eosinophilie, diese tritt jedoch nicht bei allen Erkrankten auf und kann insbesondere bei besonders schweren Verläufen fehlen. Patienten mit erhöhter Eosinophilenzahl während der Infektion scheinen eine bessere Prognose zu haben (Keiser et al., 2004).

2.1.4 Therapiemöglichkeiten

Da bei einer *S. stercoralis*-Infektion immer die Gefahr eines lebensbedrohlichen Hyperinfektionssyndroms besteht, sollten selbst asymptomatische Verläufe frühzeitig und ausnahmslos behandelt werden (Zaha et al, 2000). Bei Patienten aus endemischen Regionen sollte vor einer immunsuppressiven Therapie, zum Beispiel im Rahmen von einer Transplantationsvorbereitung, eine latente *S. stercoralis*-Infektion ausgeschlossen werden. Da durch die Möglichkeiten der modernen Medizin auch die Zahl immunsupprimierter Patienten stetig zunimmt, stellt die schwere Strongyloidiasis ein zunehmendes Problem dar. Eine präzise, schnelle und zuverlässige Diagnostik von *S. stercoralis* ist daher essentiell (Sharifdini et al, 2015). Das antiparasitäre Medikament Ivermectin in einer Dosis von 200 µg/kg Körpergewicht, stellt als Tablette verabreicht die Behandlungsmethode der ersten Wahl dar. Ein alternatives Therapeutikum mit jedoch deutlich niedrigeren Heilungsraten ist das Medikament Albendazol in einer Dosis von 400 mg (Marti et al., 1996;Henriquez-Camacho et al., 2016).

2.1.5 Koinfektionen mit Hakenwürmern

Hakenwürmer gehören ebenso wie *S. stercoralis* zur Gruppe der Fadenwürmer. Die beiden Spezies *N. americanus* und *A. duodenale* sind für den Menschen pathogen und werden auf dem gleichen Weg wie *S. stercoralis* übertragen. Weltweit wird nach wissenschaftlichen Schätzungen von ca. 740 Millionen Hakenwurm-infizierten Menschen ausgegangen (Brooker et al., 2008). Endemisch sind Hakenwürmer auf dem indischen Subkontinent, in vielen Gebieten Afrikas, Südamerikas sowie in Südostasien. In allen betroffenen Regionen ist eine Korrelation zwischen der Hakenwurm-Prävalenz und einem niedrigen sozioökonomischen Status beschrieben worden. Die akute und chronische Strongyloidiasis kann somit als Armutserkrankung angesehen werden. Im kontaminierten Erdboden vorkommende infektiöse Larven können sowohl die intakte Haut penetrieren (*N. americanus* und *A. duodenale*), als auch oral aufgenommen werden (*A. duodenale*). Der Lebenszyklus gleicht dem von *S. stercoralis*, jedoch können Hakenwürmer sich nicht im humanen Wirt replizieren. Die Infektionsintensität wird von der Menge der adulten Würmer bestimmt (Hotez et al, 2005). *S. stercoralis*-Larven und Hakenwurmlarven haben mikroskopisch sehr viele morphologische Ähnlichkeiten, was die mikroskopische Differenzierung erschweren kann (Wang et al., 2017). Hakenwurminfektionen sind einer der häufigsten Gründe für behandlungsbedürftige Anämien in vielen Teilen der Welt (Bethony et al., 2006)(Navitsky et al., 1998). Die Anämie entsteht dadurch, dass der Wurm sich an die intestinale Mukosa des infizierten Wirtes anheftet und

dort Blut „saugt“ (Williamson et al, 2003). In der Folge kommt es zu einem Blutverlust und damit einhergehender chronischer Anämie, die klinisch häufig als Eisenmangelanämie mit begleitendem Eiweißmangel imponiert. Bei Kindern, Frauen im gebärfähigen Alter und anderen Bevölkerungsgruppen mit niedrigen Eisenreserven besteht häufig eine Korrelation zwischen Infektionsintensität und reduzierten Hämoglobinwerten (Hotez et al., 2005). Hakenwurm-induzierte Anämien während einer Schwangerschaft haben deutliche Auswirkungen für Mutter und Kind: Frühgeburtlichkeit, Milchbildungsstörungen und erniedrigtes Geburtsgewicht (Brooker et al., 2008). Neben der Anämie als der häufigsten klinischen Manifestation kann eine Hakenwurminfektion auch mit Brust-, und Bauchschmerzen, Erbrechen, Übelkeit, Obstipationen und Durchfällen assoziiert sein (Utzinger et al., 2012).

2.2 Diagnostische Methoden zur Detektion einer *S. stercoralis*-Infektion

Zurzeit existiert kein Goldstandard für die Diagnosestellung einer *S. stercoralis*-Infektion (Dacal et al., 2017). Bei chronischen Infektionen kommen die Larven nur in sehr geringer Anzahl vor und werden daher auch nur in quantitativ niedriger Zahl im Stuhl ausgeschieden, was die Diagnostik deutlich erschwert. Zu den verfügbaren Methoden für einen direkten Erregernachweis gehören die direkte mikroskopische Stuhluntersuchung, die Baermann-Anreicherung (BM), eine Stuhlkultur auf einem speziell hierfür hergestellten Agarplattenmedium, sowie der direkte molekulardiagnostische Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR). Indirekt kann der Erregernachweis mittels Serologie erfolgen. Die immundiagnostischen Methoden haben eine höhere Sensitivität als die konventionellen mikroskopischen Techniken (Sharifdini et al., 2015) und sind sehr hilfreich für das Screening, während sie eine niedrige Spezifität aufweisen und damit meist keine exakten Aussagen treffen können, da es zu Kreuzreaktionen mit anderen Helminthen (insbesondere Filarien) kommen kann (Requena-Méndez et al., 2013)(Buonfrate et al., 2017). Neben Stuhl kann – insbesondere bei Hyperinfektionen – auch Sputum auf *S. stercoralis*-Larven untersucht werden. Die wichtigsten diagnostischen Methoden werden nachfolgend kurz vorgestellt.

2.2.1 Direkte Stuhlmikroskopie

Die einfachste Methode zur Detektion eines Wurmbefalls im Darm ist der direkte Stuhlausstrich. Mit einem Lichtmikroskop kann das Vorhandensein von intestinalen Protozoen oder Wurmeiern und in Einzelfällen auch von *S. stercoralis*-Larven festgestellt werden. Dazu wird eine kleine Menge der Stuhlprobe jeweils mit einem Tropfen Kochsalzlösung und einem Tropfen Lugol'scher Jodlösung versetzt. Jeder Tropfen wird mit einem Deckglas unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig bedeckt und lichtmikroskopisch in einer 100-fachen Vergrößerung (10x Objektiv) betrachtet. Um den Ausstrich systematisch zu untersuchen, wird der Objektträger vorwärts und rückwärts oder nach oben und unten verschoben (Abb. 2-4) (WHO,1994). Infektionen niedriger Intensität können jedoch mit dieser Technik zumeist nicht erkannt werden, da die Sensitivität eingeschränkt ist.

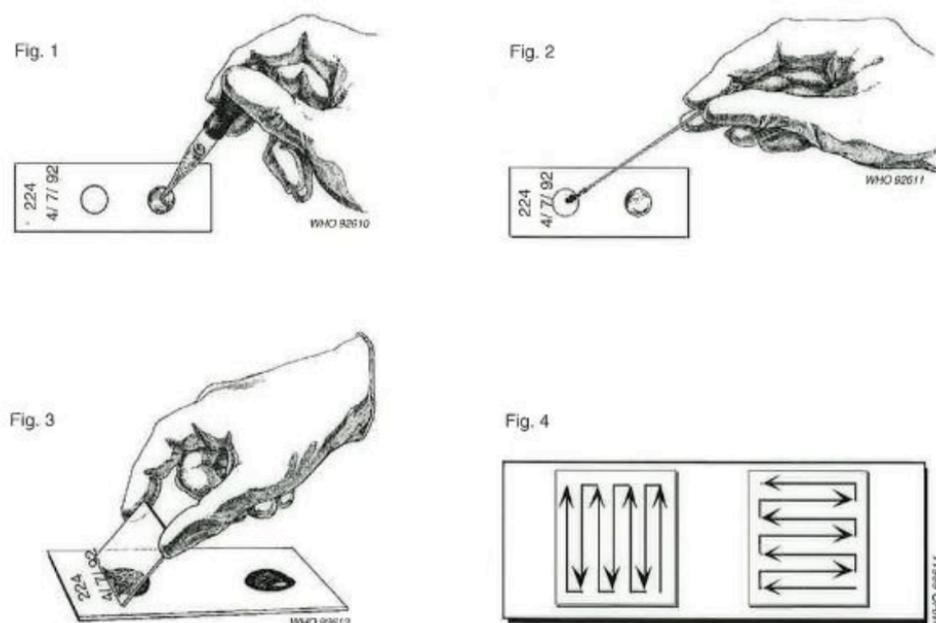


Abb. 2-4 Vorbereitung für den direkten Fäkalausstrich (WHO, 1994). Fig. 1-4 zeigen die Schritte eines direkten Fäkalausstrichs mithilfe eines Tropfens physiologischer Kochsalzlösung und einem Tropfen Lugol'scher Jodlösung auf einem Objektträger. Mit Hilfe eines zweiten Objektträgers wird ein Stuhlausstrich angefertigt, um anschließend die Mikroskopie durchführen zu können.

2.2.2 Kato-Katz Technik

Ein weit verbreiteter diagnostischer Ansatz zur Bewertung von Prävalenz und Infektionsintensität von verschiedenen Würmern ist die Kato-Katz Technik (Knopp et al., 2008). Die Kato-Katz Technik beruht darauf, dass eine geringe Menge (ca. 42 mg) Stuhl auf einen Objektträger aufgetragen, gereinigt und mit einem Farbstoff versetzt wird, um nach

einer Wartezeit von ca. 40-60 Minuten lichtmikroskopisch untersucht zu werden. Die mikroskopische Anzahl der gesehenen Wurmeier wird gezählt, um die Infektionsintensität zu quantifizieren (Knopp et al., 2008). Die direkte Stuhluntersuchung und die Kato-Katz-Technik sind für einige humanpathogene Würmer gut geeignet (z.B. *Schistosoma* spp., Hakenwürmer), jedoch haben sie eine zu geringe Sensitivität in der Diagnostik einer *S. stercoralis*-Infektion (Steinmann et al., 2007), da Wurmlarven – im Unterschied zu Wurmeiern, die bei den anderen Würmern im Stuhl ausgeschieden werden – mit dieser Technik nur selten nachgewiesen werden können.

2.2.3 Koga-Agarplatten-Kultur

Eine weitere diagnostische Technik ist die sogenannte Koga-Agarplatte (KAP), eine spezielle Agarplattenkultur, welche erstmals 1991 von dem japanischen Mikrobiologen Kaori Koga beschrieben wurde (Koga et al., 1991). Zu diesem Zweck werden frisch aufbereitete Agarplatten hergestellt, welche u.a. Pepton, Natriumchlorid und Fleischextrakt enthalten. Am Tag der Beprobung wird eine erdnussgroße Stuhlportion (etwa 2 g) in die Mitte der Agarplatte gebracht. Die geschlossene Petrischale wird für zwei Tage in einer feuchten Kammer bei etwa 28° Celsius inkubiert. Nach der Inkubation werden diese Platten lichtmikroskopisch auf die Anwesenheit mikroskopisch sichtbarer Spuren untersucht, welche durch die Wanderung von *S. stercoralis*-Larven auf der Agarplatte entstehen. Zusätzlich kann die Oberfläche der Agarplatte mit einer formalinhaltigen Lösung gespült werden. Anschließend wird eben diese Lösung mikroskopisch auf das Vorhandensein von Wurmlarven untersucht. Abgesehen von der *S. stercoralis* Diagnostik hat sich diese Methode auch schon als Nachweismethode für Hakenwürmer bewährt (Knopp et al., 2008).

2.2.4 Baermann-Anreicherung

Das Prinzip der Baermann-Anreicherungsmethode (BM) beruht auf der Eigenschaft, dass die Laven von *S. stercoralis* thermophil (= Bevorzugung warmer Temperaturen) und hydrophil (= bevorzugtes Aufhalten in feuchten Arealen) sind (Yap et al., 2012). Eine walnussgroße Stuhlportion (etwa 10 g) wird auf eine Gaze in einen Glastrichter eingebracht. Der Trichter wird mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach 2 Stunden werden die unteren 50 ml abgezogen und zentrifugiert. Das Sediment wird auf einen Objektträger transferiert und lichtmikroskopisch betrachtet. Eine 100-fache Vergrößerung reicht aus, um die Larven zu detektieren. Um die Larven genauer als *S. stercoralis* zu identifizieren, ist jedoch eine Betrachtung unter 400-facher Vergrößerung notwendig (Knopp et al., 2008).

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Diagnose parasitärer Infektionen nimmt die Bedeutung der Nukleinsäure-Nachweismethoden seit einigen Jahren deutlich zu. Die PCR ist eine wichtige Arbeitsmethode, die auf dem Prinzip der Primer-vermittelten enzymatischen Amplifikation der Nukleinsäure basiert und mit deren Hilfe identische DNA-Abschnitte eines zu untersuchenden Ziel-DNA-Bereichs erzeugt werden können (Kolmodin & Birch, 2002; Staněk, 2013). Dieses Verfahren wurde vor etwa drei Jahrzehnten erfunden und gehört heutzutage weltweit zu den unverzichtbaren Methoden in der Labordiagnostik (Kolmodin & Birch, 2002). Während die PCR in den letzten Dekaden eine bedeutende Stellung in der Infektionsdiagnostik von bakteriellen und viralen Krankheitserregern eingenommen hat, ist ihr Einsatz in der Humanparasitologie erst in den letzten zehn Jahren häufiger geworden. Das Prinzip der PCR beruht auf immer wiederkehrenden Zyklen aus drei Schritten:

1. **Denaturierung:** DNA, der zu vermehrenden Nukleotidsequenz, wird durch Hitze in Einzelstränge zerlegt.
2. **Hybridisierung:** Komplementäre Primer (chemisch synthetisierte Oligodesoxynukleotide) setzen an die Einzelstränge durch Temperaturniedrigung an.
3. **Elongation:** Durch erneute Erhöhung der Temperatur wird die DNA-Polymerase aktiviert, die durch die Primer den Aufbau der charakteristischen DNA-Sequenz beginnt.

Die PCR-basierte Stuhluntersuchung für *S. stercoralis* hat in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Im Vergleich zu konventionellen Methoden war die Sensitivität mindestens gleichwertig oder höher (Sitta et al., 2014). Eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR stellt die sogenannte real-time PCR (Echtzeit-PCR) dar, welche die Anzahl der notwendigen Replikationszyklen bis zum Nachweis des gesuchten Agens in der Probe angibt und somit ein (semi-)quantitatives Verfahren darstellt. Die real-time PCR ermöglicht bereits während der Amplifikation die Menge an neu gebildetem Produkt über die Zunahme der Fluoreszenz sichtbar zu machen. Die Menge an Produkt korreliert direkt mit der Menge an eingesetzter DNA, gibt somit Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration des Template und wurde auch in unserer Arbeit eingesetzt um die Erregerlast im Stuhl zu quantifizieren. Eine für die Routine-Diagnostik von *S. stercoralis* geeignete PCR wurde von einer niederländischen Arbeitsgruppe entwickelt (Verweij et al., 2009). Diese real-time PCR aus Stuhlproben wurde bisher in einigen Studien untersucht, wobei sich die Ergebnisse teilweise unterschieden. (Sultana et al., 2013; Basuni et al., 2011; Schär et al., 2013). Es zeigte

sich in allen Studien, dass die zur DNA-Extraktion genutzte Aufreinigungsmethode der Stuhlprobe ein wesentlicher Faktor zu sein scheint, der die Resultate der sich anschließenden real-time PCR maßgeblich beeinflussen kann. Daraus ergibt sich, dass eine angemessene DNA-Extraktionsmethode für die Sensitivitätssteigerung molekular diagnostischer Tests unabdingbar ist (Sharifdini et al., 2015). Eine für Helminthen-PCRs geeignete Standardisierung solcher Extraktionstechniken ist wichtig, war jedoch nur bisher im geringen Maße Gegenstand von Forschungsarbeiten (Moghaddassani et al., 2011).

2.3 Molekulare Charakterisierung von *Strongyloides* spp.

Die Gattung *Strongyloides* beinhaltet über 50 unterschiedliche Spezies (Hunt et al., 2016). Hierzu gehören neben *S. stercoralis* beispielsweise die tierpathogenen Spezies *S. ratti* und *S. venezuelensis*. Einige dieser Spezies haben amphibische Wirte, andere werden bei Reptilien gefunden. Die überwiegende Mehrheit parasitiert jedoch in Säugetieren, vor allem in domestizierten Tieren wie Hunden und Katzen, aber auch in Nutztieren. Humanpathogen sind *S. stercoralis*, *S. fuelleborni* und *S. fuelleborni kelleyi* (Dorris et al., 2002). *S. fuelleborni* infiziert sowohl nicht-menschliche Primaten in Afrika als auch Menschen in den betroffenen Regionen. *S. fuelleborni kelleyi* wurde in Papua-Neuguinea mit einer hohen Prävalenz vor allem bei Säuglingen gefunden, ohne dass eine eindeutige Erklärung für diese regionale Häufung gefunden werden konnte (Labes et al., 2011). Aufgrund fehlender Forschung und nicht vorhandener klinischer Daten ist es aktuell unbekannt, ob *S. stercoralis* und z.B. *S. fuelleborni* sich in ihrem Pathogenitätspotential für den Menschen unterscheiden. Ein verbessertes Verständnis der einzelnen Arten könnte entscheidend zur Weiterentwicklung und Optimierung der derzeit angewandten Behandlungsmethoden beitragen. Zur besseren molekularen Charakterisierung der einzelnen *Strongyloides*-Spezies wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits die 18S ribosomale RNA (18S rDNA) und die mitochondriale DNA des Parasiten analysiert, um anschließend Sequenzierungsuntersuchungen durchzuführen (Putland et al., 1993). Es wird angenommen, dass die 18S rDNA-Sequenz häufig in nahezu identischer Weise in Spezies einer Gattung vorkommt und somit für die Identifikation einzelner Arten ungeeignet ist. Im Jahr 2008 untersuchte eine japanische Forschungsgruppe vier kurze Abschnitte der 18s rDNA unterschiedlicher *Strongyloides* spp. und verglich diese miteinander. Es konnten verschiedene Regionen in diesen kurzen 18s rDNA Abschnitten identifiziert werden, welche dann als „hyper-variable regions“ (HVR-I bis -IV) bezeichnet wurden. Nach genauerer Analyse der verschiedenen „hyper-variable regions“ kamen die

Autoren zum Schluss, dass sich die Region HVR IV besonders gut für die Differenzierung einzelner Spezies eignen könnte, da diese die spezifischste Nukleotidabfolge beinhaltet (Hasegawa et al., 2009) (Abb. 2-5).

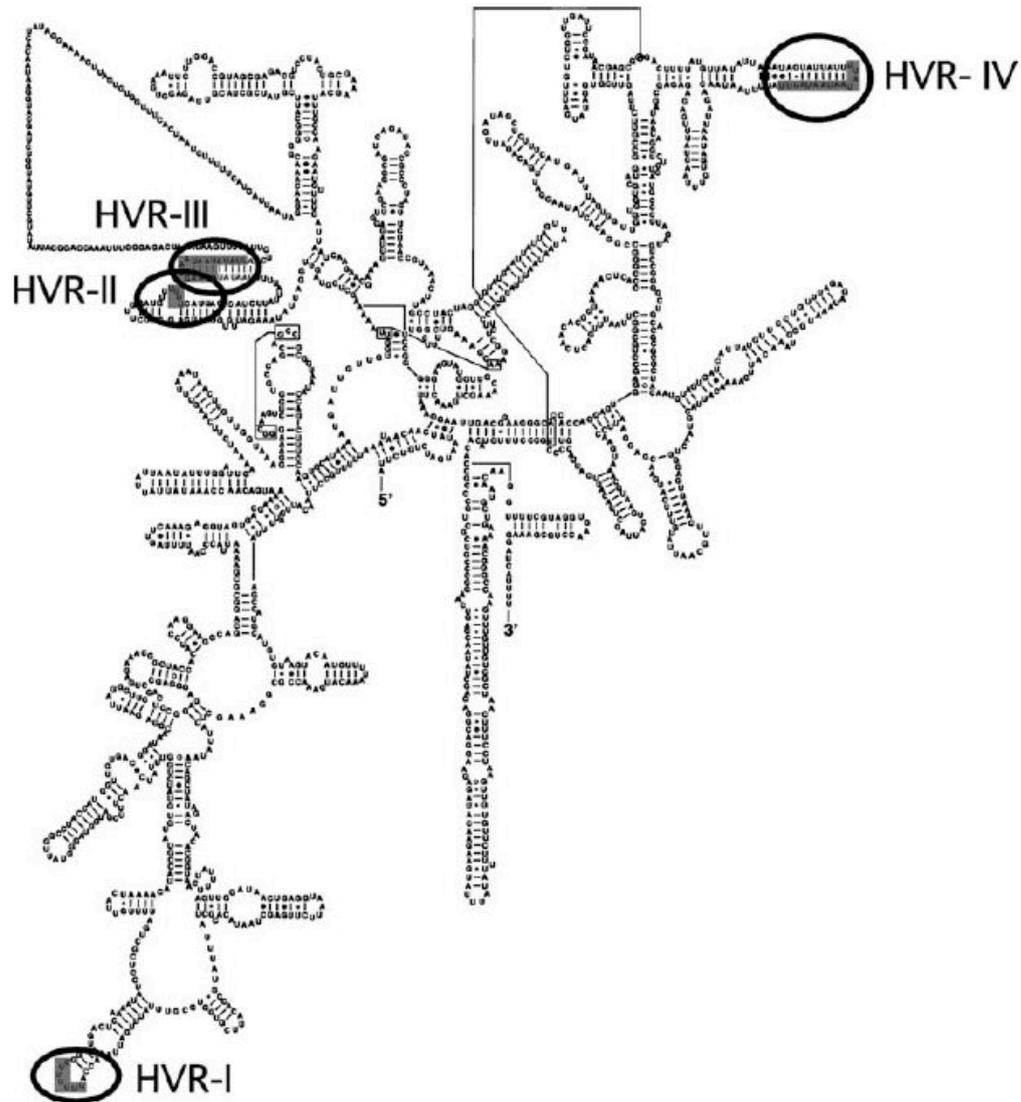


Abb. 2-5 Sekundäre Struktur der 18S rDNA von *Strongyloides* spp. mit markierten hypervariablen Regionen (HVR) I-IV (Hasegawa et al., 2009).

2.4 Ziele dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung der Diagnostik von *S. stercoralis* in menschlichen Stuhlproben. Dabei soll eine real-time PCR angewandt werden und auch eine spezifische molekulare Charakterisierung von verschiedenen *S. stercoralis*-Stämmen erfolgen. Außerdem soll untersucht werden, ob aufgrund des ähnlichen Übertragungsmodus eine Assoziation zwischen einer Infektion mit *S. stercoralis* und einer Infektion mit Hakenwürmern besteht.

Es werden die folgenden vier spezifischen Ziele verfolgt:

1. Vergleich der diagnostischen Genauigkeit einer Stuhl-basierten PCR mit den konventionellen mikroskopischen Methoden (BM und KAP) zur Diagnose einer Infektion mit *S. stercoralis* aus menschlichen Stuhlproben
2. Messung der Übereinstimmung von Ergebnissen, welche mittels *S. stercoralis*-spezifischer real-time PCR in zwei europäischen Laboratorien (Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut, Basel und Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar) erzielt worden sind.
3. Vergleichende Untersuchung von Stuhlproben aus Taabo (Elfenbeinküste) zur Erfassung von Koinfektionen mit Hakenwürmern, sowie einer möglichen Assoziation beider Wurmerkrankungen.
4. Molekulare Charakterisierung mittels DNA-Sequenzierung des 18S rDNA-Gens zur Differenzierung unterschiedlicher *Strongyloides* spp.

3 Material und Methoden

3.1 Ethische Stellungnahme

Die hier untersuchten Proben wurden im Rahmen von epidemiologischen Studien gewonnen, deren Durchführung zuvor von den jeweils zuständigen Ethik-Kommissionen bewilligt wurde. Die meisten Stuhlproben dieser Untersuchung stammen aus einer epidemiologischen Querschnittsstudie im Health and Demographic Surveillance System (HDSS) in Taabo, einer zentralen Region der Elfenbeinküste (Côte d'Ivoire) (Becker et al., 2011). Diese Studie wurde von den Forschungskommissionen des Schweizerischen Tropen- und Public Health-Instituts (Swiss TPH; Basel, Switzerland) und dem Centre Suisse de Recherches Scientifiques in Côte d'Ivoire (CSRS, Abidjan, Côte d'Ivoire) genehmigt. Positive Voten wurden von den Ethikkommissionen in Basel (EKBB, Referenz Nr.316/08) und dem Ministerium für Hochschulwesen und wissenschaftliche Forschung in Côte d'Ivoire (Referenz Nr. 124/MESRS/ DGRSIT/ YKS7 sac) erteilt. Alle Studienteilnehmenden willigten nach Aufklärung schriftlich in die Teilnahme an der Studie ein. Den Probanden wurde am Ende der Studie bei Nachweis einer Helminthen-Infektion eine kostenfreie Therapie (400mg Einzeldosis Albendazol gegen bodenübertragene Helminthen und 200µg/kg Ivermectin gegen *S. stercoralis*) angeboten. Die PCR-Ergebnisse beider Laboratorien unserer Arbeit wurden unabhängig voneinander mehrere Monate nach der Feldarbeit in Côte d'Ivoire erhoben, sodass diese nicht für die Behandlungsentscheidung herangezogen werden konnten (Becker et al., 2015).

3.2 Herkunft der Stuhlproben

In dieser Arbeit wurde mit Stuhlproben gearbeitet, welche im Rahmen von drei epidemiologisch-klinischen Studien gesammelt wurden, die im Zeitraum zwischen 2009 und 2013 durchgeführt wurden (Abb.3-1). Nachfolgend werden die Studiengebiete und ihre wichtigsten Charakteristika kurz vorgestellt.



Abb. 3-1 Herkunft der verwendeten Stuhlproben. Die Stuhlproben stammten aus der Elfenbeinküste (2009 Taabo, 2012 Dabou) sowie aus Tansania (2013).

Quelle: <http://www.heute.de/wahlen-in-tansania-und-elfenbeinkueste-aufschwung-und-demokratie-in-afrika-40682980.html>

Taabo, Côte d’Ivoire, 2009

Studienggebiet

2009 wurde im Dorf Léléblé und in fünf umliegenden kleinen Dörfern in der südlich-zentralen Elfenbeinküste eine Studie zur Ermittlung der Prävalenz von *S. stercoralis*, sowie Helminthen und *Plasmodium*-Infektionen durchgeführt. Léléblé ist eines der 13 Hauptdörfer des Taabo HDSS (Abb.3-2) und liegt etwa 160 km nordwestlich von Abidjan, der wirtschaftlichen Hauptstadt der Elfenbeinküste. Das Klima der Untersuchungsgebiete ist tropisch warm und feucht.

Studienpopulation

In dem Dorf Léléblé lebten zum Untersuchungszeitpunkt im Frühjahr 2009 ca. 5000 Einwohner und weitere 2000 Menschen in kleinen Siedlungen rund um das Dorf herum. Dabei war die überwiegende Mehrheit der BewohnerInnen jünger und nur wenige Personen älter als 40 Jahre.

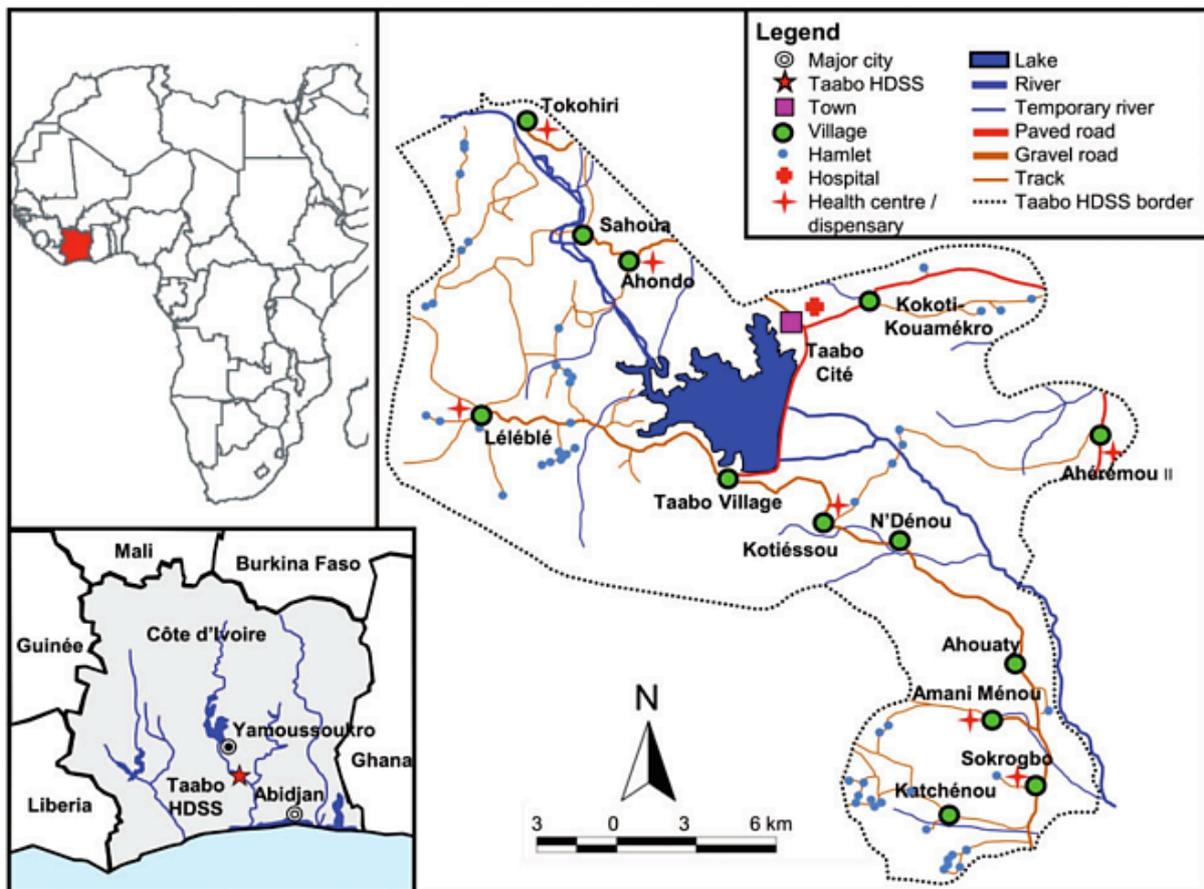


Abb. 3-2 Karte des Taabo HDSS (Koné et al., 2015)

Studiendesign

Im Rahmen einer klinisch-epidemiologischen Querschnittsstudie im Dorf Léléblé im südlichen Zentrum der Côte d'Ivoire wurden Stuhlproben von 292 Studienteilnehmern unter Anwendung von verschiedenen Methoden (Kato-Katz-Technik, FLOTAC, Ether-Konzentrations-Methode (EKM)) auf Infektionen mit Helminthen und intestinalen Protozoen sowie mittels Baermann-Technik (BM) und Koga-Agarplatte-Methode (KAP) speziell auf *S. stercoralis* untersucht. Ein Teil der Stuhlproben wurde anschließend nach Europa transportiert und für die Durchführung dieser molekulardiagnostischen Arbeit zu *S. stercoralis* zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden in unserer Arbeit zum Vergleich von PCR-Ergebnissen aus zwei verschiedenen Laboratorien (Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut, Basel nachfolgend Labor 2 und Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar nachfolgend Labor 1) und zum Vergleich von mikroskopischen Techniken herangezogen.

Dabou, Côte d'Ivoire, 2012

Studiengebiet

Eine weitere Studie wurde 2012 in der Stadt Dabou und in 11 umliegenden Dörfern im südlichen Regionen der Elfenbeinküste durchgeführt. Das Studiengebiet liegt etwa 30 km westlich von Abidjan und die Rekrutierung von StudienteilnehmerInnen wurde im Hôpital Méthodiste de Dabou, einem von zwei Krankenhäusern der Stadt, durchgeführt

Studiendesign

Die Studie war Teil einer multinationalen Untersuchung, die im Rahmen eines internationalen Forschungskonsortiums mit dem Akronym NIDIAG (Better **DIAG**nosis of Neglected Infections) durchgeführt wurde. NIDIAG verfolgte das Ziel, einen einfachen und praktisch anwendbaren Algorithmus zur verbesserten Diagnostik und Therapie von persistierender Diarrhoe und langanhaltenden, infektiös bedingten abdominellen Schmerzen in den Tropen zu entwickeln. In die hier aufgeführte Studie wurden Individuen, die mindestens ein Jahr alt waren, mit persistierender Diarrhoe eingeschlossen. Für die persistierende Diarrhoe wurde die Definition der WHO hingezogen (> 3mal täglich für >14 Tage) (*WHO, 2009*). Die Studie wurde als Fall-Kontroll-Studie durchgeführt und als Kontrollgruppe wurden Probanden ausgewählt, die in den vorausgegangenen zwei Monaten komplett beschwerdefrei waren (Becker et al., 2015). Ein Teil aller Stuhlproben wurde nativ eingefroren und nach Deutschland transferiert. Da vor Ort auch mikroskopische Untersuchungen zur Diagnose von *S. stercoralis* durchgeführt worden waren, bot es sich an, einen Teil dieser Proben auch für die aktuelle Arbeit mittels real-time PCR zu untersuchen. Des Weiteren konnten durch die Notwendigkeit der Aufreinigung der nativen Stuhlproben die Baermann-Technik mit der KAP-Technik miteinander verglichen werden.

Pemba, Tansania, 2013

Studienpopulation

Die Studie wurde auf der sehr nah an Sansibar gelegenen Insel Pemba durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden zwei Schulklassen in den Dörfern Mchangamdogo und Shungi ausgesucht, in denen aus früheren Studien bekannt war, dass STH-Infektionen häufig auftreten (Speich et al., 2014).

Studiendesign

Die Untersuchung wurde als randomisierte, kontrollierte Studie durchgeführt, in der eine Medikamentenkombinationen (Oxantel Pamoate kombiniert mit Albendazol), zwei Einzelpräparate (Oxantel Pamoate sowie Mebendazol) und das Standardmedikament Albendazol zur Behandlung des Nematoden *T. trichiura* miteinander verglichen wurden. Kinder zwischen 6 und 14 Jahren wurden mit einer solchen Infektion in die Studie eingeschlossen (Speich et al., 2014). Des Weiteren wurden auch diagnostische Tests zu Diagnostik anderer Wurminfektionen, u.a. die BM-Technik für *S. stercoralis*, durchgeführt. Einige der mikroskopisch positiven Proben für *S. stercoralis* wurden in Ethanol konserviert und nach Europa transferiert, wo sie nicht nur für die Evaluierung der real-time PCR für *S. stercoralis* zur Verfügung standen, sondern auch für die Sequenzierungsuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden.

3.3 Molekulare Nachweisverfahren

Nachdem die Stuhlproben aus den verschiedenen Studiengebieten nach Europa und schließlich an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums in Homburg/Saar transferiert worden waren, wurden die nachfolgend dargestellten Laborarbeiten im Rahmen des aktuellen Dissertationsprojekts durchgeführt.

3.3.1 DNA-Extraktion

Proben aus der Côte d'Ivoire von 2009

Die DNA der Stuhlproben aus Taabo (n=256) wurde im Sommer 2009 am Swiss TPH in Basel extrahiert und bei -80° C gelagert. Die Aufreinigung erfolgte mittels QIAmp Stool Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) und anschließend wurde in Basel eine real-time PCR für *S. stercoralis* durchgeführt. Im Jahr 2012 wurden die Proben nach Homburg transferiert, wo ebenfalls eine *S. stercoralis*-spezifische PCR mit den identischen Primern durchgeführt wurde.

Proben aus der Côte d'Ivoire von 2012

Die DNA der Stuhlproben aus Dabou (n=335) wurde im Herbst 2012 in nativer Form nach Homburg transferiert. Acht Proben, die zuvor sowohl mittels BM als auch KAP positiv für *S. stercoralis* getestet worden sind, wurden anschließend mittels zweier unterschiedlicher Systeme zur automatisierten DNA-Extraktion aufgereinigt. Darauffolgend wurde die Extraktionseffizienz der beiden Systeme miteinander verglichen. Die beiden Aufreinigungsmethoden werden nachfolgend kurz vorgestellt.

Maxwell 16 MDx-Instrument: Pro Probe wurde eine Kartusche benötigt, in der bereits Lysepuffer enthalten war. In diesen Puffer wurde jeweils eine weiße Öse Stuhl eingerührt. Pro Kartusche wurde ein 0,5ml Elutiontube mit 75 µl destilliertes Wasser bereitgestellt. Das Gerät (Maxwell 16 MDx Instrument; Promega) wurde mit Programm 3, Aufreinigung der gesamten viralen Nukleinsäure, gestartet.

Hain GenoXtract: Diese Extraktion beruht auf dem Prinzip der Zellyse und der anschließenden Kopplung der freigesetzten DNA an Magnetpartikel. Der Partikelkomplex wird gewaschen und die DNA auf diesem Weg freigesetzt. Pro Probe wurde eine GXT-Kartusche und pro Kartusche ein leeres geöffnetes 1,5ml Elutionsgefäß bereitgestellt. Eine blaue Öse (erdnussgroß) der zu untersuchenden Stuhlprobe wurde mit je 1ml „stool stabilizer“ Puffer in einem 2ml Schraubdeckengefäß eingerührt, 5 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortexet und 4 min bei 5000*g zentrifugiert. 500µl des resultierten Überstandes wurden in ein 2ml Tube überführt und ins Gerät gebracht. Das Gerät (Hain GenoXtract) wurde mit dem Elutionsvolumen von 200µl und dem Programm: GXT_Stool_DNA_V₂ gestartet.

Proben aus Tansania von 2013

Im Unterschied zu den Proben aus der Elfenbeinküste wurden aus Tansania keine Stuhlproben, sondern das Sediment mikroskopisch positiver BM-Tests in 70% Ethanol konserviert. Die so konservierten *S. stercoralis*-Larven konnten anschließend bei Raumtemperatur nach Homburg transferiert. Es erfolgte vor der Nukleinsäureextraktion ein zusätzlicher Waschschrift. Dazu wurden die Proben über 4 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe und Mischen von 1 ml 0,9%iger NaCl Lösung erfolgte erneut eine Zentrifugation und der Überstand konnte abpipettiert werden. Zum

Abschluss wurden 300 µl eines Lysepuffers dazu gegeben. Anschließend erfolgte eine Nukleinsäureextraktion mittels Hain-Methode.

3.3.2 Real-time PCR

Zur Durchführung einer *Strongyloides*-spezifischen PCR wurde ein von Verweij und Kollegen in den Niederlanden entwickeltes real-time PCR-Protokoll verwendet (Verweij et al., 2009). Die real-time PCR wurde auf einem Roche LightCycler 96 System durchgeführt.

Zur Durchführung wurde ein Ansatz mit einer Gesamtmenge von 20µl benötigt. Wie vorbeschrieben wurde als Vorwärtsprimer (F-Primer) Stro18s-1530F, als Rückwärtsprimer (R-Primer) Stro18s-1630R und als Sonde (S) Stro18s1586T benutzt (s. Abb.3-3). Die Gesamtlänge des zu erwartenden Amplifikationsprodukts betrug 101 Basenpaare (Jaco J. Verweij et al., 2009). Der Gesamtansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 1µl F-Primer, 1µl R-Primer, 0,2 µl Sonde, 2,8 µl Wasser, 5 µl DNA-Template, 10 µl HotStarMastermix (Qiagen). Als Mastermix wurde der Roche Fast Start Essential DNA Probes Master mit den folgenden Reagenzien genutzt: Taq-DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix und MgCl₂. Der PCR-Ablauf bestand initial aus 15 min bei 95° C, anschließend gefolgt von 50 Zyklen à 15 Sekunden bei 95° C und 1 min bei 60°C. Bei jedem PCR-Lauf war sowohl eine Positivkontrolle (mikroskopisch deutlich positive Probe aus Taabo, 2009) als auch eine Negativkontrolle (destilliertes Wasser) dabei.

Target (GenBank accession no.)	Oligo name	Oligonucleotide sequence	Expected product size
<i>S. stercoralis</i> 18S rRNA gene (AF279916)			
Stro18S-1530F		5'-GAATTC CAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3'	101 bp
Stro18S-1630R		5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3'	
Stro18S-1586T		FAM-5'-ACACACCGGCCGTCGCTGC-3'-BHQ1	

Abb. 3-3 Eingesetzte Oligonukleotidprimer für die real-time PCR. Zur Detektion von *S. stercoralis* durch eine real-time PCR wurde basierend auf der Publikation von Verweij et al., 2009 ein Vorwärts-, ein Rückwärtsprimer sowie eine Sonde mit in der Abbildung gezeigten Oligonukleotidsequenzen gewählt.

3.3.3 DNA-Sequenzierung

Die Proben aus den verschiedenen afrikanischen Studien wurden mittels real-time PCR auf das Vorhandensein von *Strongyloides* spp. gescreent. Positive Proben in der real-time PCR wurden anschließend für eine genauere molekulare Charakterisierung in mehreren Zwischenschritten für eine nachfolgende DNA-Sequenzierung des 18S rDNA-Gens aufbereitet, um Unterschiede zwischen den verschiedenen *Strongyloides* spp. zu analysieren. Die hierfür notwendigen Einzelschritte werden nachfolgend kurz vorgestellt.



Abb. 3-4 Arbeitsschritte zur molekularen Sequenzanalyse von real-time PCR-positiven Proben von *Strongyloides* spp.

Abb. 3-4 zeigt die einzelnen Schritte, die notwendig waren, um vom positiven PCR-Ergebnis zu den einzelnen Sequenzabschnitten zu gelangen. Die Durchführung einer Such-PCR hatte zwei verschiedene Gründe: Einerseits sollte so festgestellt werden, ob parasitäre DNA vorhanden ist. Andererseits sollte durch sie auch eine vorhandene DNA amplifiziert werden. Die sehr empfindliche Nested PCR wurde in unserer Arbeit nachgeschaltet, um die geringen DNA-Mengen nochmals zu amplifizieren. Die Gel-Elektrophorese, die jeweils

dazwischengeschaltet ist, zeigt die amplifizierten DNA-Abschnitte visuell anhand von Banden. Um das PCR-Produkt zu sequenzieren, muss dieses aufgereinigt werden. Diese Aufreinigung beseitigt die Primer und die Nukleotide, die zuvor dazugegeben wurden, um die Amplifikation zu ermöglichen und es resultiert reine DNA, die durch die anschließende Sequenzierungs-PCR in einen Vorwärts- und Rückwärtsstrang aufgeteilt wird. Im letzten Schritt wird nach einer weiteren Aufreinigung und Zugabe von Primern die Sequenzierung gestartet. Je nachdem, welche Primer in diesen Arbeitsschritten verwendet werden, entstehen Sequenzabschnitte, die mit internationalen Datenbanken verglichen werden können (BLAST-Tool). Die Primer für die Such-PCR, Nested-PCR und Sequenzierungs-PCR wurden mit einer Basenlänge zwischen 20 und 24 bp mithilfe der AF279916 Sequenz des *S. stercoralis* ausgewählt. (Abb. 4-1) (Tab.4-1)

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte näher erläutert:

Such-PCR

Der Gesamtansatz für die Such-PCR betrug 25µl und beinhaltete 10µl Wasser, 12,5µl PCR-Mix (Hot Start PCR Master-Mix – Peqlab) 0,2µl F-Primer, 0,2µl R-Primer und 2,5µl DNA-Template (Amplifikationsprodukt der RT-PCR). Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl eingesetzt. Als Primerpaare wurden pro Probe folgende Kombinationen benutzt: Str-251F/Str-707R, Str-365F/Str-707R, Str-1193F/Stro 18s1630R, Str-251F/Stro 18s1630R, Str-365F/Stro 18s1630R, Str-595F/Stro 18s1630R. Die Amplifikationsschritte bestanden in 95°C bei 7 min, 40 Zyklen mit jeweils 95°C bei 30 sek., 54,8°C bei 1 min, 72°C bei 2 min und 72°C bei 10 min.

Gel-Elektrophorese

Geladene Moleküle können in einem elektrischen Feld räumlich mit Hilfe einer Elektrophorese getrennt werden. Das Gel mit seinen Poren fungiert als Trägermedium. Die negativ geladene DNA wandert immer zur Anode. Die DNA-Fragmente sind nativ nicht sichtbar und werden mit Ethidiumbromid angefärbt, sodass sie als sichtbare Banden im Trägermedium erscheinen. Mit den Amplifikationsprodukten der Such und Nested PCR wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1%-iges Gel benutzt und die Elektrophorese bei 150V und 50 min durchgeführt.

Nested- PCR

Unter einer Nested PCR (= geschachtelte PCR) versteht man die Kopplung zweier PCR-Reaktionen, die nacheinander stattfinden. Ein Teil des PCR-Produkts aus der ersten Amplifikation (in dem hier beschriebenen Fall ein Teil der Such-PCR) dient als Matrize für die zweite Amplifikation. Es wird mit einem zweiten Primerpaar ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Mit dieser Methode können auch geringste Spuren von DNA nachgewiesen werden. Die Nested PCR wurde mit den in der Gel-Elektrophorese positiven Proben durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Konzentrationen, Primern und Amplifikationsschritten verwendet. Die DNA Template-Menge betrug 0,8 µl und die Wassermenge 11,3 µl.

Aufreinigung für die Sequenzierungs-PCR

10 µl des PCR-Volumens wurden in einer Probenplatte zu 18 µl AMPure XP pipettiert, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde für 2 min auf eine Magnetplatte gestellt. Bei diesem Schritt wurden die magnetischen Bestandteile als Bodensatz isoliert. Das komplette Volumen wurde bis auf den Bodensatz heraus pipettiert und mit jeweils 200µl einer 70%-iger Ethanollösung für 30 Sekunden gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden 40 µl Wasser dazu gegeben und gut durchgemischt. Die Platte wurde für 1 Minute auf die Magnetplatte gestellt und anschließend das Eluat vorsichtig in ein 5 ml-Röhrchen überführt.

Sequenzierungs-PCR

Nach der Aufreinigung wurde die Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Es wurden dazu 5µl des aufgereinigten Templates sowie 1 µl Primer in einer Konzentration von 10pmol/µl und 4 µl DTCS Quick-Start Mix, eingesetzt. Die Primer wurden im Gegensatz zu den vorherigen PCRs getrennt dazugegeben. Die Amplifikationsschritte bestanden aus 30 Zyklen mit jeweils 96°C für 20 Sekunden, 50°C für 20 Sekunden, 60°C für 4 min.

Aufreinigung für den Sequencer

Das komplette Produkt von 10 µl der Sequenzierungs-PCR wurde mit 10 µl Magnetbeads und 42 µl 85%iger Ethanollösung gemischt. Das gesamte Reagenz konnte auf eine Sample-Platte

überführt und für 3 min auf eine Magnetplatte gestellt werden. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt, mit 100 µl 85%igem Ethanol für 30 sec. gewaschen und von der Magnetplatte entfernt. Zu jeder Probe auf der Sampleplatte erfolgte die Zugabe von 40 µl SLS Lösung („sample loading solution“). Die Sample-Platte wurde durch ein Papier getrennt auf die Magnetplatte für 5 min gestellt um anschließend jede Probe mit einem Tropfen Mineralöl zu versetzen. Für den Sequencer wurde noch eine Pufferplatte mit einem Trennungspuffer (GenomeLab™, Beckman Coulter) vorbereitet und anschließend die Nukleinsäure-Sequenzierung auf dem Gerät Genome Lab GeXP der Firma Beckman Coulter gestartet.

Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem Gerät Genome Lab GeXP der Firma Beckman Coulter durchgeführt, mit dem Programm FinchTV Geospitza analysiert und mit der Online-Datenbank BLAST des US-amerikanischen National Center for Biotechnology Information (NCBI) ausgewertet.

3.4 Statistische Analyse

Alle Daten wurden in Excel, Version 10.0 (2002 Edition; Microsoft Corporation) erfasst. Für die statistische Auswertung wurde die Software STATA Version 12.0 (StataCorp.; College Station, TX, USA) benutzt. In Ermangelung eines „Goldstandard“-Referenztests für die sichere Diagnose einer Infektion mit *S. stercoralis* wurden Proben, die in mehreren mikroskopischen Verfahren positiv für den Erreger waren, als eindeutig „richtig positive“ Proben angesehen, sodass die Spezifität sowie die prädiktiven Werte der einzelnen Diagnostikverfahren berechnet werden konnten. Zur Berechnung der Sensitivität wurde die Kombination aus allen genutzten Testverfahren herangezogen und jedes positive Testergebnis wurde als „true positive“ betrachtet. Zur Quantifizierung der statistischen Unsicherheit wurde bei all diesen Berechnungen auch das 95%-Konfidenzintervall (95% KI) ermittelt.

Beim Vergleich der real-time PCR mit mikroskopischen Verfahren zur Detektion einer *Strongyloides*-Infektion wurde für jede PCR-positive Probe der Cycle threshold (C_t)-Wert (= theoretische Größe, die den PCR-Zyklus beschreibt, bei dem das real-time PCR Signal einen festgelegten Schwellenwert übertrifft) ermittelt, um eine quantitative Aussage zu der in der Probe enthaltenen DNA-Menge des Erregers herzustellen (d.h. je kleiner der C_t -Wert, desto größer die Menge der in der Probe vorhandenen DNA). Die statistische Signifikanz wurde ermittelt, indem ein p -Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Die Cohen's Kappa-

Bestimmung (κ) wurde zur Einschätzung der Übereinstimmung der Resultate in zwei unterschiedlichen Laboratorien eingesetzt, dabei wurde der Kappa-Wert folgendermaßen interpretiert: $\kappa < 0$, keine Übereinstimmung; $\kappa = 0-0,2$, wenig Übereinstimmung; $\kappa = 0,21-0,4$, ausreichende Übereinstimmung; $\kappa = 0,41-0,6$, moderate Übereinstimmung; $\kappa = 0,61-0,80$, nahezu perfekte Übereinstimmung.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluation eigens entwickelter Primer zur *Strongyloides*-Diagnostik

Zur Vorbereitung und Durchführung unserer Sequenzierungsversuche wurde anhand der Sequenz AF279916 vom *S. stercoralis* 18S small subunit ribosomal RNA gene Primer mit der Basenlänge zwischen 20 und 24 Basenpaare entwickelt (Abb.4-1) (Tab.4-1). Diese Primer deckten die hypervariablen Regionen HVR-2 bis HVR-4 ab, die als besonders geeignet zur Differenzierung verschiedener *Strongyloides* spp. beschrieben wurden (Hasegawa et al., 2009). Die Such-PCR ergab in der Gelelektrophorese vorwiegend positive Ergebnisse mit dem Primerpaar Str-365F – Stro1630R und die darauffolgenden Arbeitsschritte bis zur Sequenzierung konnten mit den Primerpaaren Str-365F – Str-707R, Str-685F – Str-1213R und Str-1193F – Stro1630R erfolgreich durchgeführt werden. Da die Primer Str-251F und Str-595F keine positiven Ergebnisse in der Gelelektrophorese ergaben und folglich auch die Sequenzierungen erfolglos waren, wurden sie für die darauffolgenden Untersuchungen verworfen.

```

5'→TNAAGATTNAGCCAAGCANGTGTAAAGACAATGTTTTAAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACA
GCTATAGACTACACGGTAAATATTTAGTTGGATAACTGAGGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTATAACC
ACATTAGTGGTGCCTTTATTGATTAACCAATTTATATTGGTTGACTCAAAAATATCCTCGCTGATTTTGTTACT
AAAACATACCGTATGTGTATCTGGTTTATCAACTTTCGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGTTGTGACGGAT
AACGGAGAATTAGGGTTCGACTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGG
CGCGAAAATTACCAATTTTAGTTAAAAGAGGTAGTGACGAAAAATGACAACCAAAATATTATTATAATTTT
GGATTGAAAATCTTCAAGTTTAAATAACTTGTGGTAAAGGAAAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACCAGCTTTCCAAGTGCATAAAATGATTGTTGTGGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTATAAAGATTGTATAA
TGAGCATCTTGGATGTTATTTAATCATTATCATCTTATATTTTATTATATTAGAAAATAATAAATAACTGTTAC
TTTGAATAAATCAGAGGGTTTAAACCAGACATTATATGTTTGTATGGTCTAGCATGGAATAACACTATAGAAA
AATTAGTGTGGTTTCACCTAATTTTTCATGATTAATAGGAACAAACGGGGCATTTCGTATCGCTACGTTAGAG
GTGAAATCTTGACCGTAGCGAGACGTCTACTGCGAAAGCATTGCCAAGAATGTTTTCATTAAATCAAGAAC
GAAAGTTAGAGGTTGAAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCGTAAACTATGCCTACTAGATGTATGA
ATTATTAGTTATAATAATTTATGCATCTTCTCGGAAACGAAAAGTCTTTCGGTTCGGGGGAAGTATGGTTGCAA
AGCTGAAAACCTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTAATTTGACTCAACACG
GGAAAACCTACCCGGCCGGACACTATAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCATGATTTAGTGGTTGGTGGT
GCATGGCCGTTCTTAGTTGTGGATATGATTTGTCTTGATTCCGATAACGAGCGAGACTTTTATGTTATATT
AAATATTATTATTTTATTATTTAATAATAAATAATTAATATTTTAAATAACAGATTAATAGTGTAACTATTTG
AGAGAGAGCGATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCGGGGCTGCACGCGCTACAATGTAGTGATCAT
TATGTTCCGTTTAGAGATAAATGGGTAAACATTGAAAACATTACGTAACGGGAATGAAAATTGCAATTATTT
TTCATGAACGAGGAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGTTACATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGACACAC
CGGCCGTCGCTGCCGGAACTGAGCAATATCCAGAGGCAGGAAGAGATGTAATAAAATTTTAAATTTTATA
TTAAATCCTTCCAATCGTGTGTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGTTTTTCGTAGGTGAACCTGCAGAA
GGATCATCA ← 3'

```

Abb. 4-1 Sequenz AF279916 - *S. stercoralis* 18s small subunit ribosomal RNA gene (Verweij et al., 2009). Die in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten Primer sind farblich markiert.

Real-Time PCR (Verweij et al., 2009)	→ Stro18S-1530F GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC (28 Basen) → Stro18S-1586T (Sonde) ACACACCGGCCGTCGCTGC (19 Basen) → Stro18S-1630R GAACTGAGCAATATCCAGAGGCA (23 Basen)
Such-PCR 5' → 3'	Forward: CTTTCGATGGTAGGGTATTGG (21 Basen) [251-272] → Str-251 F Forward: CGCGAAAATTACCCAATTTAG (22 Basen) [365-387] → Str-365 F Reverse: TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC (23 Basen) [1562-1595] → Stro18S-1630R
Sequenzierung 5' → 3'	Primerpaar 1: Forward: CTTTCGATGGTAGGGTATTGG (21 Basen) → Str-251 F Reverse: CCATACAAACATATAATGTCTG (22 Basen) → Str-707 R Primerpaar 2: Forward: CGCGAAAATTACCCAATTTAG (22 Basen) [365-387] → Str-365 F Reverse: CCATACAAACATATAATGTCTG (22 Basen) → Str-707 R Primerpaar 3: Forward: GGATGTTATTTAATCATTATCATC (24 Basen) → Str-595 F Reverse: TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC (23 Basen) → Stro18S-1630R Primerpaar 4: Forward: CAGACATTATATGTTTGTATGG (22 Basen) → Str-685 F Reverse: CCAGACAAATCATATCCACG (20 Basen) → Str-1213-R Primerpaar 5: Forward: CGTGGATATGATTGTCTGG (20 Basen) → Str-1193-F Reverse: TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC (23 Basen) → Stro18S-1630R

Tab. 4-1 Übersicht über die entwickelten Primer

4.2 Testung einiger publizierter Primer

Für die Durchführung der real-time PCR wurden Primer von Verweij & Kollegen genutzt (Verweij et al., 2009). Für die verschiedenen PCR-Untersuchungen bis zur Sequenzierung wurden Primer aus weiteren drei verschiedenen publizierten Arbeiten getestet (Hasegawa et al., 2009)(Hasegawa et al., 2010)(Schär et al., 2014). Tabelle 4-2 zeigt die Primer, die in dieser Dissertation getestet wurden. Während die Primer für die real-time-PCR sehr gute Resultate erbrachten, konnte mit den anderen Primern keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Veröffentlichung	Primer	Erfolg
Verweij et al., 2009	18S – 1530F, 18S – 1630R, 18S – 1586 T	✓
Hasegawa et al., 2009	Nem18SF, 18SP2F, 18SPCR	✗
Hasegawa et al., 2010	StroCoxAfrF, StrCoxAfrR, Ss18RF, MH28R	✗
Schär et al., 2014	RH5401, RH5402, 18SP4F, 18SPCR	✗

Tab. 4-2 Vorbeschriebene und getestete Primer zur molekularen Detektion von *S. stercoralis*. Die veröffentlichten Primer von Verweij et al., 2009 ergaben positive Signale in der real-time PCR, während die Primerkombinationen aus Hasegawa et al., 2009 & 2010 sowie Schär et al., 2014 kein positives Signal ergaben.

4.3 Vergleich zweier automatisierter Nukleinsäureextraktionsverfahren

Von einer im Jahr 2012 in der Côte d’Ivoire durchgeführten Studie, in deren Rahmen 316 Individuen untersucht worden waren und 18 ein positives Ergebnis für *S. stercoralis* mittels BM oder KAP gezeigt hatten, wurden in Homburg weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Extraktionseffizienz der automatisierten Nukleinsäureextraktionsgeräte GenoXtract® (Hain Lifescience) und Maxwell®16 MDx Instrument (Promega) zu untersuchen.

Es wurden 4 Proben, die sowohl mittels BM als auch mittels KAP eindeutig positiv gewesen waren, unabhängig mit beiden Verfahren aufgereinigt und anschließend mit der identischen real-time PCR auf *S. stercoralis* untersucht. Analog wurde bei 4 Stuhlproben mit negativer Stuhlmikroskopie vorgegangen. Nach Maxwell-Aufreinigung zeigte sich eine von vier

mikroskopisch positiven (Larvenanzahl in der BM-Technik: 1021) in der real-time PCR eindeutig positive Ergebnisse. Nach der Hain-Aufreinigung konnten weitere zwei mikroskopisch positive in der real-time PCR bestätigt werden (Larvenanzahl in der BM-Technik: 422 & 15). Eine Probe mit 848 Larven in BM konnte weder mit der Hain- noch mit der Maxwell-Extraktion bestätigt werden (Tab.4-3).

Probe	Larvenanzahl in der Baermann Technik	Larvenanzahl in der KAP-Technik	Real-time PCR
1	422	3	Hain + Maxwell –
2	848	3	Hain – Maxwell –
3	1021	2	Hain – Maxwell +
4	15	2	Hain + Maxwell –
5	0	0	-
6	0	0	-
7	0	0	-
8	0	0	-

Tab. 4-3 Vergleich zweier Extraktionsverfahren für *S. stercoralis* anhand der Resultate in der real-time PCR und unter Angabe der Larvenmenge in BM und KAP.

4.4 Vergleich von Mikroskopie und real-time PCR zum Nachweis von *Strongyloides* spp.

Die im Kapitel 5.4 dargestellten Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift *Acta Tropica* publiziert:

Becker SL, Piraisoody N, Kramme S, Marti H, Silué KD, Panning M, Nickel B, Kern WV, Herrmann M, Hatz CF, N’Goran EK, Utzinger J, von Müller L (2015). Real-time PCR for detection of Strongyloides stercoralis in human stool samples from Côte d’Ivoire: diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. Acta Tropica 150:210-217.

4.4.1 Altersverteilung

Für die Evaluation einer real-time PCR zur Diagnostik von *Strongyloides* spp. wurden 256 Individuen aus einer 2009 in Taabo, Côte d’Ivoire durchgeführten epidemiologischen Studie untersucht. Das mittlere Alter der Studiengruppe betrug 13,5 Jahre, wobei die jüngste Person 1 Monat und die älteste Person 75 Jahre alt war. Es zeigten sich sowohl bei den

Monoinfektionen mit *S. stercoralis* und Hakenwürmern als auch bei Koinfektionen beider Helminthen eine erhöhte Prävalenz von Nematoden bei älteren Individuen, insbesondere in der Altersgruppe von 30-49 Jahren. Insgesamt lag die Hakenwurmprävalenz in allen Altersgruppen etwa um den Faktor 3 höher als die *Strongyloides*-Prävalenzen. Dies ist für die unterschiedlichen Altersgruppen in der Abbildung 4-1 und Tabelle 4-1 dargestellt.

Variable	Alter	N	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	Koinfektion
Gruppe 1	<5	36	4 (11%)	11 (31%)	1 (3%)
Gruppe 2	5-14	95	16 (17%)	49 (52%)	9 (9%)
Gruppe 3	15-29	51	11 (22%)	31 (61%)	8 (16%)
Gruppe 4	30-49	55	21 (38%)	35 (64%)	15 (27%)
Gruppe 5	≥50y	19	4 (21%)	7 (37%)	2 (11%)

Tab. 4-4 Altersverteilung der Probanden aus Taabo, 2009. Es zeigt sich insbesondere in der Altersgruppe 4 eine erhöhte Prävalenz sowohl der Monoinfektionen als auch der Koinfektionsrate von *S. stercoralis* und Hakenwürmer (n= 256).

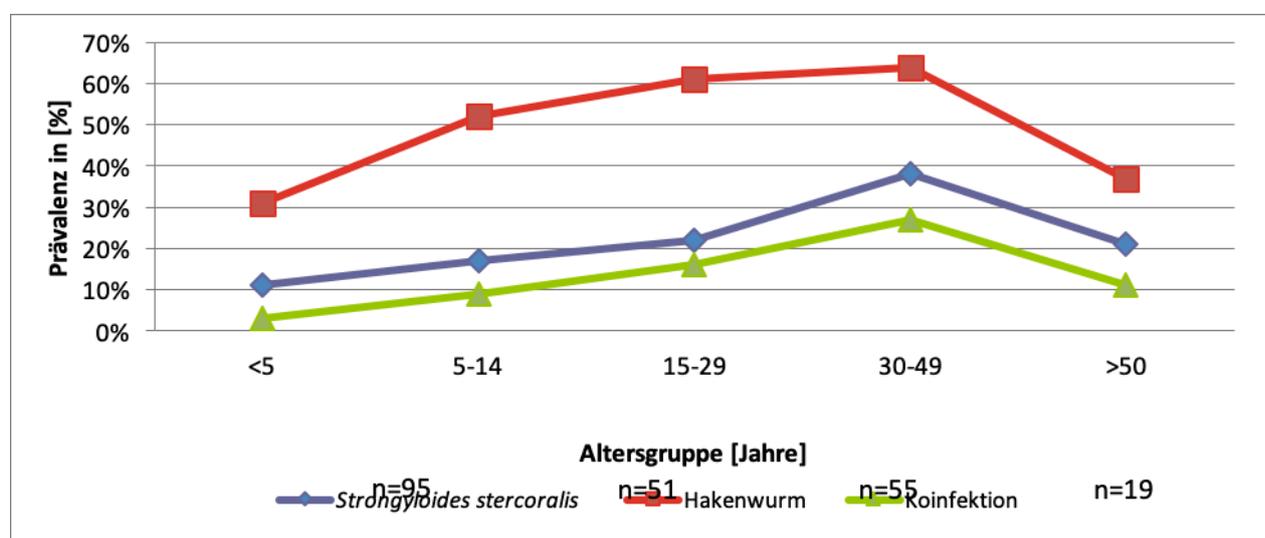


Abb. 4-2 Prävalenz der Ko- und Monoinfektionen in Korrelation mit den Altersgruppen. Die Grafik stellt die Prävalenz der Monoinfektionen mit *S. stercoralis* sowie mit dem Hakenwurm als auch die Koninfektionsrate mit beiden Helminthen in Korrelation der unterschiedlichen Altersgruppen in Taabo Côte d'Ivoire dar.

4.4.2 Geschlechterverteilung

Von den insgesamt 256 Probanden aus Taabo waren 123 männliche und 133 weibliche Teilnehmer. Auf die Geschlechter bezogen war der Einzelbefall der Nematoden *S. stercoralis* und Hakenwurm war nicht signifikant unterschiedlich. Auffällig war allerdings, dass Männer mit 17,9% öfters von Koinfektionen betroffen waren als Frauen (9,8%)

Geschlecht	n	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	Koinfektion
Frauen	133	27 (20%)	62 (47%)	13 (9,8 %)
Männer	123	29 (24%)	71 (58%)	22 (17,9%)
p-Wert		0.059	0.076	0.526

Tab. 4-5 Geschlechtsspezifische Prävalenzunterschiede von Infektionen mit *S. stercoralis*, Hakenwürmern und Koinfektionen bei Studienteilnehmern in Taabo, Côte d'Ivoire im Frühjahr 2009 (n=256)

4.4.3 Methodenvergleich

Die Prävalenz einer Infektion mit *S. stercoralis* betrug 21,9% (n= 56; 95% KI: 16,8 – 27,0%), wobei hierbei alle positiven Testergebnisse als „tatsächlich positiv“ interpretiert wurden (d.h. dass von den unterschiedlichen Testmethoden, die pro ProbandIn angewandt worden sind, ein positives Ergebnis in einem der Tests ausreichte, um insgesamt als positiv zu gelten). Aus der real-time PCR (kombinierte Resultate beider Testlaboratorien) ergab sich die höchste Prävalenz (16,8%, n=43, 95% KI: 12,2-21,4%), gefolgt von BM (8,2%, n= 21; 95% KI: 4,8-11,6%) und KAP (4,7%, n=12, 95%KI: 2,1-7,3%). Über die Hälfte der *S. stercoralis*-Infektionen wurden ausschließlich mit der real-time PCR detektiert (Abb. 4-2). Die Sensitivitäten von KAP, BM, Kombination von KAP und BM und real-time PCR für die Diagnose von *S. stercoralis* betragen 21,4% (95% KI: 11,6-34,4%), 37,5% (95%KI: 24,9-51,5%), 50,0% (95%KI: 36,3-63,7%) und 76,8% (95%KI: 63,6-87,0%). Die Spezifität der real-time PCR im Vergleich zu der Kombination aus KAP und BM betrug 89,7% (200/223 Proben). Der höchste negative prädiktive Wert errechnete sich für die real-time PCR (93,9%; 95%KI: 89,8-96,7%) und die Kombination von KAP und BM (87,7%; 95%KI: 82,7-91,7%),

gefolgt von den beiden mikroskopischen Techniken (BM: 85.1%; KAP: 82.0%). Alle Stuhlproben, die mithilfe von KAP und BM für *S. stercoralis* als positiv getestet wurden, konnten durch die PCR bestätigt werden. Die diagnostische Übereinstimmung zwischen Mikroskopie und real-time PCR war jedoch beträchtlich geringer, wenn nur eine mikroskopische Technik ein positives Resultat erbrachte (Tab. 4-3). Die Hälfte der BM-positiven und KAP-negativen Proben wurden mit der real-time PCR bestätigt, während keine *S. stercoralis*-spezifische DNA in 5 von 7 Proben detektiert wurden, die wiederum ausschließlich in der KAP-Methode positiv waren.

Techniken	Anzahl positiv getesteter Proben	%	95% KI
Baermann und Koga (kombiniert)	5	2.0	0.3-3.7
Koga	12	4.7	2.1-7.3
Baermann	21	8.2	4.8-11.6
Baermann oder Koga	28	10.9	7.1-14.8
PCR Labor 1	31	12.1	8.1-16.1
PCR Labor 2	34	13.3	9.1-17.5
PCRs kombiniert (beide Labore)	43	16.8	12.2-21.4
Alle positiven Techniken	56	21.9	16.8-27.0

Tab. 4-6 Prävalenz des *S. stercoralis* in verschiedenen diagnostischen Techniken. Prävalenzvergleich der unterschiedlichen Methoden zur Detektion von *S. stercoralis* in Taabo, 2009 (n= 256).

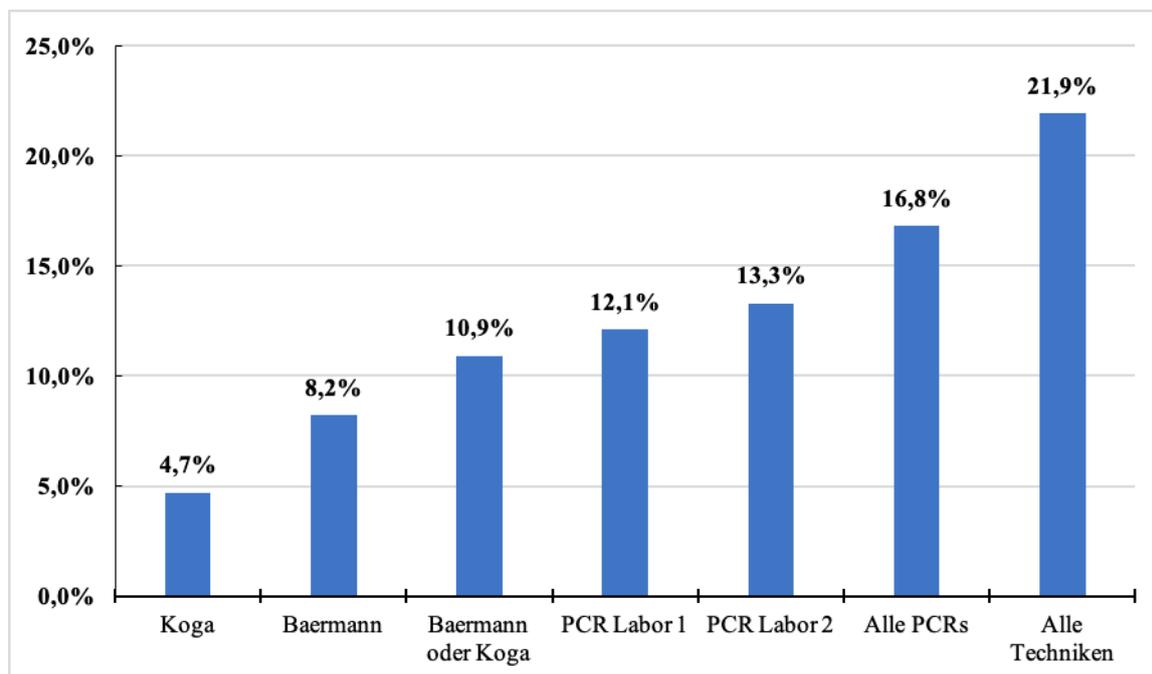


Abb. 4-3 Prävalenz von *S. stercoralis* in verschiedenen diagnostischen Techniken. Die höchste Prävalenz einer *S. stercoralis* – Infektion mit 21.9% ergab sich bei Kombination aller diagnostischer Methoden (KAP, BM sowie PCR) (n=256).

N	Mikroskopie		Real-time PCR Labor 1			Real-time PCR Labor 2			Diagnostische Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse in beiden Laboren
	Baermann	Koga	Positive Proben	Übereinstimmung in der Mikroskopie	Medianer C _t -Wert (min-max)	Positive Proben	Übereinstimmung in der Mikroskopie	Medianer C _t -Wert (min-max)	
5	+	+	5	100%	32 (24-35)	5	100%	37 (28-38)	100%
16	+	-	8	50%	31 (28-36)	8	50%	34 (31-40)	100%
7	-	+	1	14.9%	32	1	14.9%	39	71.4%
228	-	-	17	92.5%	34 (28-37)	20	91.2%	38 (31-42)	91.7%

Tab. 4-7 Diagnostischer Vergleich von BM, KAP und *S. stercoralis* spezifischer PCR in zwei verschiedenen Laboratorien (n=256)

Labor 1	Labor 2			Negativ	Gesamt
	C _t : < 30	C _t : 30-35	C _t : >35		
C _t : < 30	1	5	0	1	7
C _t : 30-35	0	7	7	5	19
C _t : >35	0	0	2	3	5
Negativ	0	2	10	213	225
Gesamt	1	14	19	222	256

Tab. 4-8 Vergleich der C_t-Werte der real-time PCR zweier verschiedener Laboratorien
Die Resultate basieren auf Stuhlproben von 256 Probanden aus Taabo, 2009, Elfenbeinküste.

Die real-time PCR zur Detektion von *S. stercoralis* zeigte im Labor 1 eine geringere Infektionsrate als in Labor 2 (31 versus 34 Infektionen). Im Gegenteil dazu zeigte sich ein Trend zu geringeren C_t-Werten in Labor 1 im Vergleich zu Labor 2. (medianer C_t 32 versus 37) (Abb. 4-4). Der Vergleich der Ergebnisse der real-time PCR in zwei europäischen Laboratorien lieferte konkordante Ergebnisse in 235 von 256 Proben (*S. stercoralis*-Infektion: n=22, Fehlen einer *S. stercoralis*-Infektion: n=213), was zu einer erheblichen diagnostischen Übereinstimmung führte (Cohen's kappa Messung, $\kappa = 0,63$, $p < 0,001$). Anzumerken ist, dass von den 21 diskordanten PCR-Resultaten 13 Proben einen C_t-Wert über 35 hatten, während nur eine Probe einen C_t-Wert unter 32 aufwies. Details zu den Ct-Werten sind in Tabelle 4-5 aufgeführt.

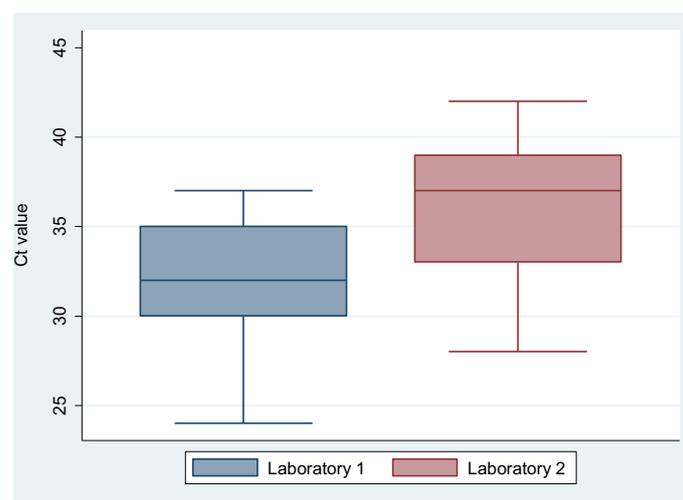


Abb. 4-4 Auswertung C_t-Werten von Labor 1 & 2 anhand einer Boxplot-Grafik. In die Auswertung sind nur die real-time PCR –positive Proben eingegangen. Es zeigt sich ein Trend zu geringeren C_t-Werten in Labor 1 im Vergleich zu Labor 2 (C_t 32 vs. C_t 37).

4.4.4 Abgrenzung zu Hakenwurm-Infektionen

Die Prävalenz der Hakenwurm-Infektionen, detektiert durch BM, real-time PCR, KAP und Kato-Katz betrug 8.2% (n=21), 14.1% (n=36), 32.1% (n= 82) und 38.7% (n=99) (Tab. 4-6). Die gesamte Prävalenz des Hakenwurms lag bei 52.0% (n= 133; 95% KI: 45.8-58.1%) auf der Basis, dass alle positiven Testergebnisse „richtig positiv“ waren. 98.5% (n=131) der Infektionen sind in die Gruppe der niedrigen Infektionsintensität (< 2000 Eier pro Gramm Stuhl) einzuordnen. Schwere Infektionen wurden nicht detektiert. Die Stuhlmikroskopie erlaubte keine Unterscheidung zwischen den Eiern der zwei untersuchten Hakenwurmspezies. Die spezien-spezifische Differenzierung wurde durch molekulare Untersuchungen erreicht. Die durchgeführte real-time PCR führte zu dem Ergebnis, dass alle molekularbiologisch positiven Proben (n=36) die Hakenwurmspezies *N. americanus* enthielten, wobei die Spezies *A. duodenale* nicht detektiert wurde. Alle positiven PCR-Proben waren mindestens in einer mikroskopischen Technik positiv. Die Sensitivität der Hakenwurm-PCR (vergleichen mit der Kombination aller diagnostischen Tests) betrug 27.1% und die Spezifität (verglichen mit den mikroskopischen Techniken) betrug 95.4%.

Techniken	Anzahl positiven Proben	der %	95% CI
Kato-Katz	99	38.7	32.7-44.7
Koga-Agar	82	32.0	26.3-37.8
Baermann	21	8.2	4.8-11.6
Alle mikroskopischen Techniken	133	52.0	45.8-58.1
PCR Labor 2	36	14.1	9.8-18.4
Alle positiven Techniken	133	52.0	45.8-58.1

Tab. 4-9 Prävalenz der Hakenwurm-Infektionen. Auswertung der Stuhlproben der, in Côte d'Ivoire anhand verschiedener diagnostischer Techniken stratifizierter, Hakenwurm-Infektionen.

4.4.5 Koinfektionen von *S. stercoralis* und Hakenwürmern

Eine Koinfektion von *S. stercoralis* und der Hakenwurmspezies *N. americanus* wurde bei 35 Individuen beobachtet. Die gesamte Koinfektionsprävalenz betrug 13,7% (Tab.4-7). 63% (n=23) der Koinfektionen betrafen männliche Probanden. In 10 von 13 Stuhlproben, die für *S. stercoralis* mikroskopisch positiv waren und in der real-time PCR ein negatives Ergebnis aufwiesen, wurde eine Koinfektion mit Hakenwurm nachgewiesen. In 6 von diesen Proben wurde die Koinfektion mit dem Hakenwurm durch zwei unabhängige Techniken detektiert. (n=5, Kato-Katz und KAP, n=1, KAP und Hakenwurm-spezifische PCR).

<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	35	21	56
Negativ	98	102	200
Gesamt	133	123	256

Tab. 4-10 Prävalenz der *S. stercoralis* – und Hakenwurminfektion anhand einer Vierfeldertafel. Ausgewertet wurden die Ergebnisse der Untersuchungen von 256 Personen aus Taabo, Elfenbeinküste.

Nummer	Kato-Katz	Baermann	Koga Agarplatte	Hakenwurm-PCR
1	-	-	Hakenwurm, <i>S. stercoralis</i>	-
2	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>S. stercoralis</i>	-	-
3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>S. stercoralis</i>	-	-
4	Hakenwurm	<i>S. stercoralis</i>	-	-
5	Hakenwurm	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	-
6	-	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	Hakenwurm (<i>N. americanus</i>)
7	Hakenwurm	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	-
8	Hakenwurm	-	Hakenwurm, <i>S. stercoralis</i>	-
9	-	-	<i>S. stercoralis</i>	-
10	<i>Hymenolepis nana</i>	-	Hakenwurm, <i>S. stercoralis</i>	-
11	Hakenwurm	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	-
12	Hakenwurm	<i>S. stercoralis</i>	Hakenwurm	-
13	Hakenwurm	-	<i>S. stercoralis</i>	-

Tab. 4-11 Vergleich von parasitologischen Befunden in 13 Stuhlproben. Die Befunde wurden mikroskopisch als *S. stercoralis*-Infektion diagnostiziert, ergaben aber ein negatives PCR-Ergebnis für *S. stercoralis*. Die Stuhlproben stammen von Personen aus Léléblé, Côte d'Ivoire.

4.4.6 Laborvergleich der Koinfektionsrate von PCR-positiven *S. stercoralis*-Proben

Im Labor 1 wurden insgesamt 31 Proben positiv für *S. stercoralis* mittels PCR getestet, von denen 18 (58%) zugleich auch mit Hakenwürmern infiziert waren. Insgesamt waren acht *S. stercoralis*-Proben ausschließlich in der PCR von Labor 1 positiv (und in keinem anderen diagnostischen Verfahren), davon wiesen zwei eine Hakenwurminfektion auf und sechs nicht (s. Abb. 4-6).

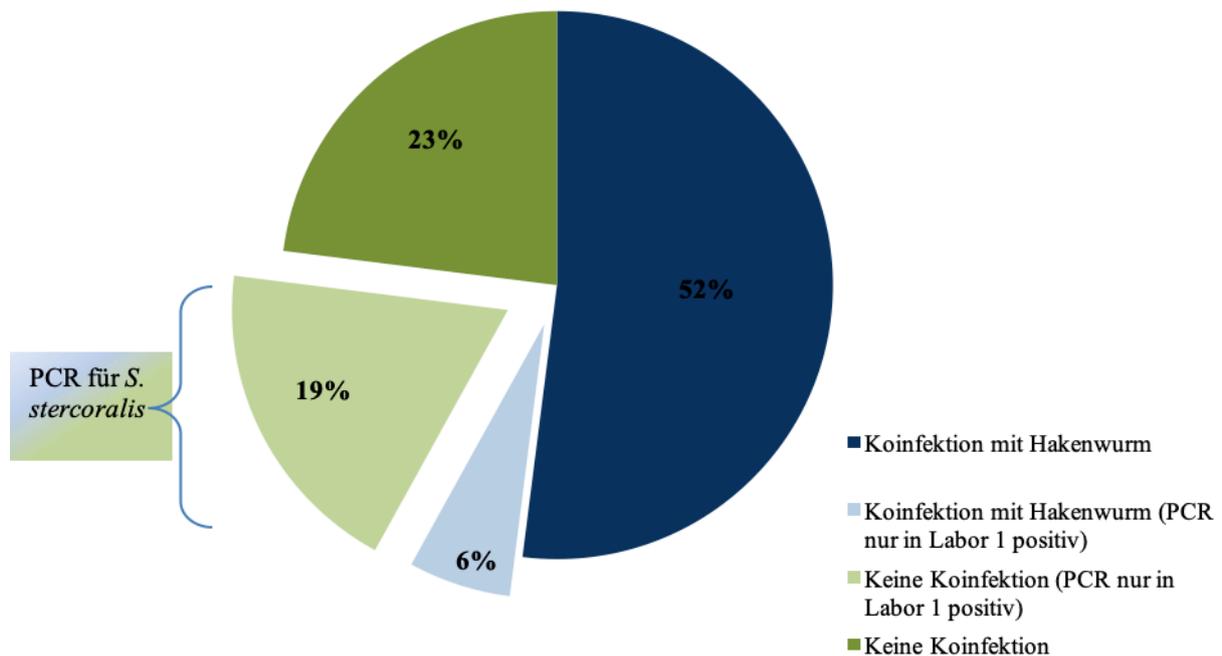


Abb. 4-5 Kreisdiagramm zur Darstellung der Hakenwurm Koinfektionen in PCR positiven Proben für *S. stercoralis* in Labor 1 (n=31).

Im Labor 2 wurden insgesamt 34 Proben positiv für *S. stercoralis* mittels PCR getestet, von denen 22 (65%) zugleich auch mit Hakenwürmern infiziert waren. Insgesamt waren elf *S. stercoralis*-Proben ausschließlich in der PCR von Labor 2 positiv (und in keinem anderen diagnostischen Verfahren), davon wiesen sechs eine Hakenwurminfektion auf und fünf nicht (s. Abb.4-7).

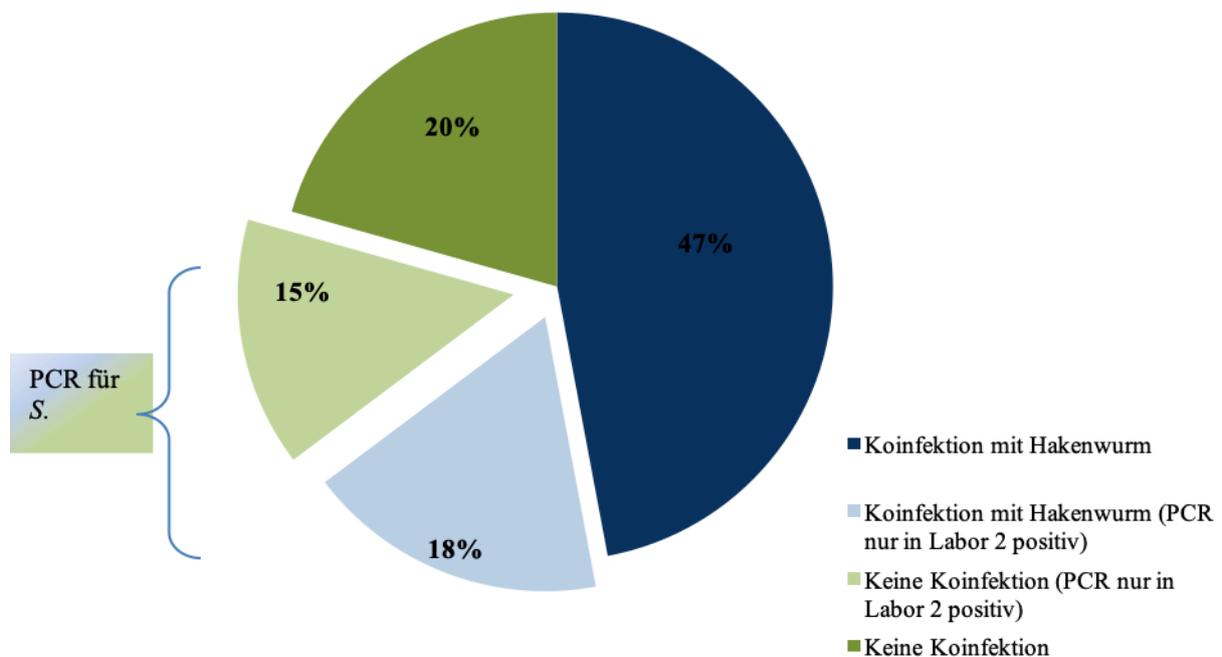


Abb. 4-6 Kreisdiagramm zur Darstellung der Hakenwurm Koinfektionen in PCR positiven Proben für *S. stercoralis* in Labor 2 (n=34).

4.5 Exemplarische Darstellung einer real-time PCR mit nachfolgender DNA-Sequenzierung für *S. stercoralis*

Acht Proben aus dem Sediment mikroskopisch positiver BM-Tests für *S. stercoralis* wurden mittels real-time-PCR untersucht. Nur bei zwei Proben konnte molekularbiologisch ein positives Ergebnis erzielt werden, eine anschließende Sequenzierung des 18S rDNA-Gens bestätigte die Speziesidentifizierung als *S. stercoralis* (s. Tab. 5-13).

Probe	real-time PCR	Sequenzierung (18S rDNA-Gen)
1	Negativ	nicht auswertbar
2	Negativ	nicht auswertbar
3	Positiv (C _t -Wert: 34)	100% <i>S. stercoralis</i>
4	Negativ	nicht auswertbar
5	Negativ	nicht auswertbar
6	Negativ	nicht auswertbar
7	Negativ	nicht auswertbar
8	Positiv (C _t -Wert: 29)	100% <i>S. stercoralis</i>

Tab. 4-12 Ergebnisse von der real-time PCR und DNA-Sequenzierung aus dem Sediment mikroskopisch positiver Proben für *S. stercoralis* 2 Proben, die in der real-time PCR positives Signal ergaben, konnten mittels nachfolgender Sequenzierung als *S. stercoralis* sequenziert werden.

4.6 Sequenzierung des 18S SSU RNA-Gens von *Strongyloides* spp.

Zur molekularen Charakterisierung von *Strongyloides* spp. wurde die DNA von mikroskopisch positiven Proben sequenziert. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der exemplarisch anhand einer Probe (ID 381) vorgestellt. Dies beinhaltet die real-time PCR (Abb. 4.7), die Gel Elektrophorese der Such-PCR und der Nested-PCR (Abb. 4.8), die Elution des Amplifikats aus dem Gel und die anschließende Sequenzierung (Abb. 4.9).

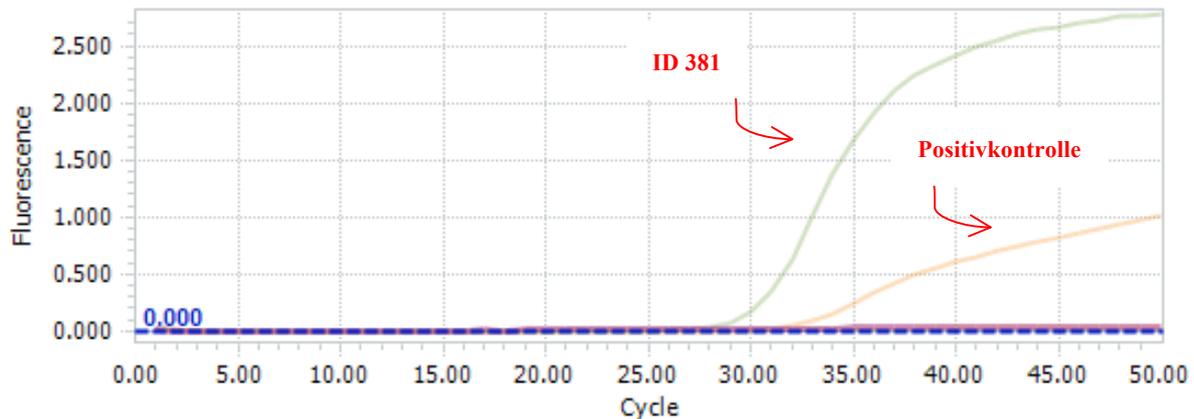


Abb. 4-7 Exemplarische real-time PCR mit der Probe ID 381. Die Probe ID 381 stammt aus Tansania (2013). Zur Ergebnissicherung wurde zudem eine Positivkontrolle (mikroskopisch bestätigter *S. stercoralis* aus Taabo, 2009) verwendet. Die Probe aus Tansania ergab bei einem C_t -Wert von 29 ein positives Signal.

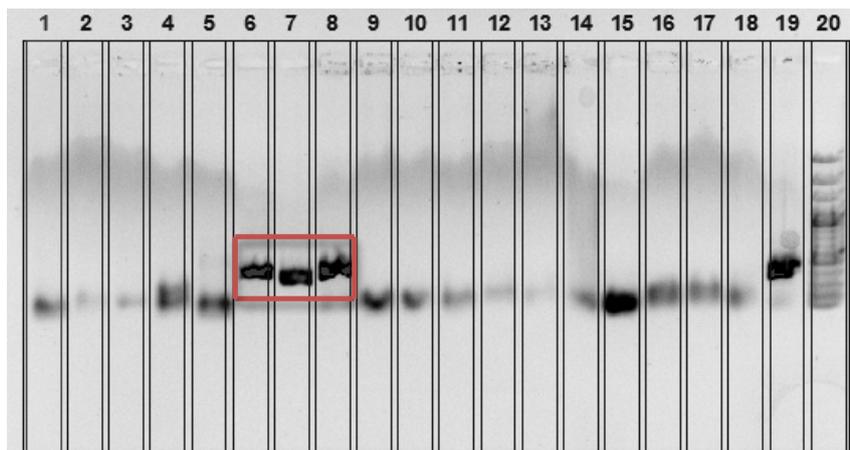


Abb. 4-8 Gel-Elektrophorese mit den Amplifikaten der Nested-PCR, Tansania ID 381
(rot umrandete Banden zeigen ein eindeutiges Signal bei ca. 500bp)

Bande 1-4 Probe ID 343 Tansania 2013 mit folgenden Primern für die Such-PCR: Str. 1193F & Stro 18s1630R (Bande 1), Str.251F & Stro 18s1630R (Bande 2), Str 365F & 18s1630R (Bande 3), Str 595F + Stro1630R (Bande 4) und dem Primerpaar für die Nested-PCR: 1193F -1630R.

Bande 5-8 Probe ID 381 Tansania 2013 mit folgenden Primern für die Such-PCR: Str. 1193F & Stro 18s1630R (Bande 5), Str.251F & Stro 18s1630R (Bande 6), Str 365F & 18s1630R (Bande 7), Str 595F + Stro1630R (Bande 8) und dem Primerpaar für die Nested-PCR: 1193F -1630R

Bande 9-12 Probe ID A14 Dabou 2012 mit folgenden Primern für die Such-PCR: Str. 1193F & Stro 18s1630R (Bande 9), Str.251F & Stro 18s1630R (Bande 10), Str 365F & 18s1630R (Bande 11), Str 595F + Stro1630R (Bande 12) und dem Primerpaar für die Nested-PCR: 1193F -1630R

Bande 13 Negativkontrolle mit Wasser

Bande 14-18 Probe ID 343 Tansania 2013 mit folgenden Primern für die Such-PCR: 251F & 707R (Bande 14), 365F & 707R (Bande 15), 251F & 1630R (Bande 16), 365F & 1630R (Bande 17), 595F & 1630R (Bande 18) und dem Primerpaar für die Nested-PCR: 365F + 707R

Bande 19 Probe ID 381 Tansania 2013 mit der Such-PCR mit den Primern 251F & 707R und dem Nested Primerpaar 365F & 707R

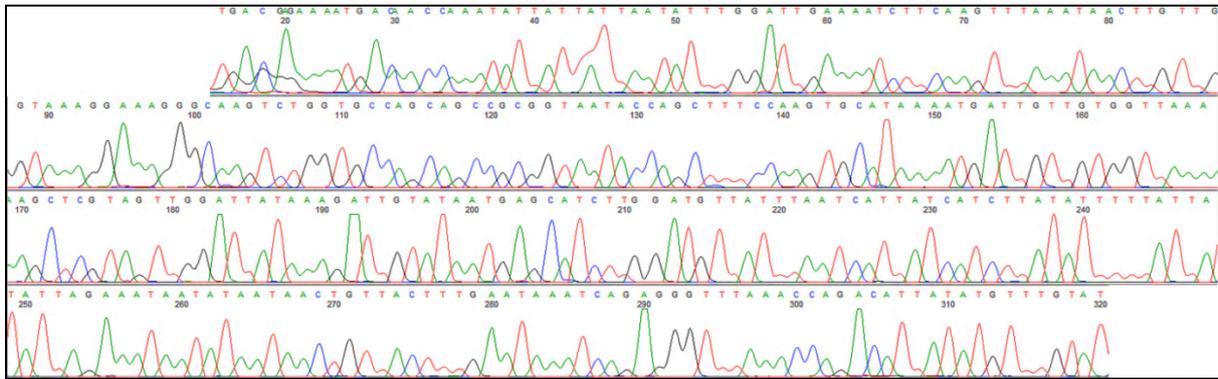


Abb. 4-9 Sequenzierungsergebnis der Probe ID 381 mit dem Primer Str-365F. Die Auswertung der Basenfolgen des 18S SSU RNA-Gens ergab zu 100% Homologien mit *S. stercoralis*.

4.7 Implementation der 18S SSU RNA Sequenzierung für die Typisierung

Aus 34 mikroskopisch positiven Proben für *S. stercoralis*, die aus drei verschiedenen Jahren und Studienorten stammten, konnten 5 Proben als *S. stercoralis* sequenziert und identifiziert werden (Abb. 4-11). Vergleichend wurde mit identischer Vorgehensweise eine Probe, welche die genetisch ähnliche Spezies *S. ratti* enthielt, analysiert. *S. ratti* konnte erfolgreich von *S. stercoralis* abgegrenzt werden, allerdings war mittels Analyse der untersuchten Sequenz keine Differenzierung zwischen *S. ratti* und den eng verwandten Spezies *S. venezuelensis*, *S. papillosus*, *S. fuelleborni* und *S. callosciureus* möglich. In nur 5 von 34 mikroskopisch positive Proben konnte eine *S. stercoralis* Infektion mittels Nested-PCR und einer anschließenden Sequenzierung typisiert werden.

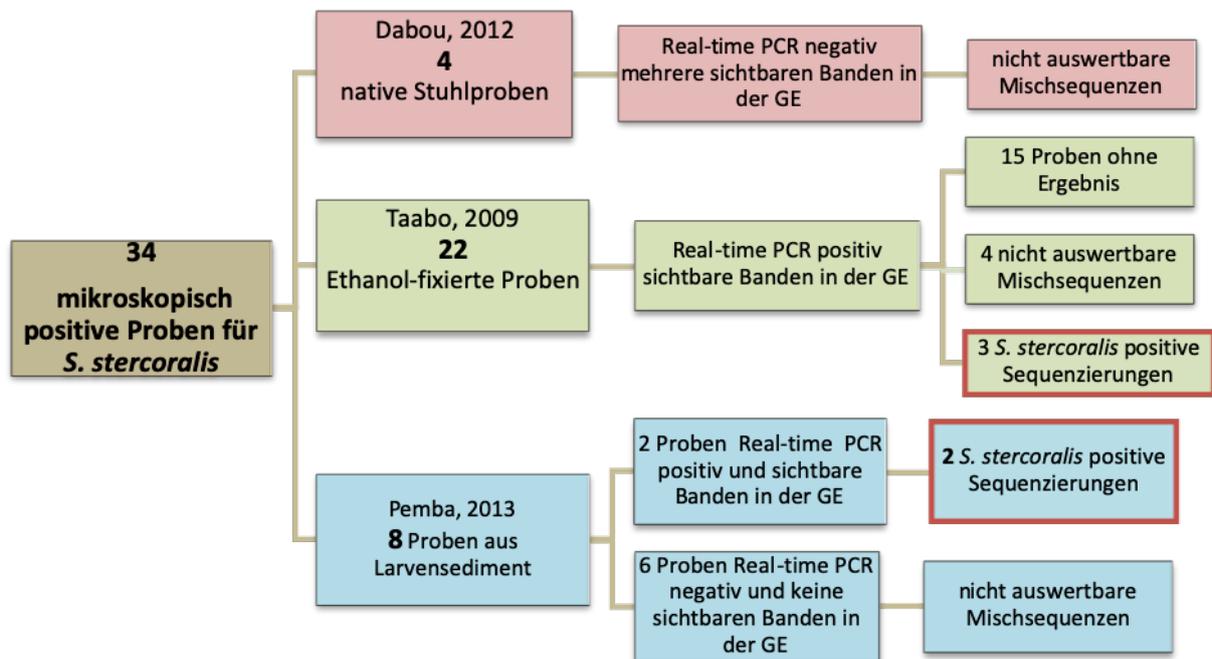


Abb. 4-10 Übersicht über die Sequenzierungen der 34 mikroskopisch positiven Proben für *S. stercoralis* aus drei verschiedenen Studien (GE = Gelelektrophorese).

Basierend auf Grundlagen der Publikationen von Hasegawa et al. wurde zur Detektion der hypervariablen Regionen die Sequenz *S. stercoralis* 18S SSU (GenBank: AF279916.2) mit der Sequenz *S. ratti* 18S SSU (GenBank: AB923889.1) verglichen. Diese ergab weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse mit den vorbeschriebenen HVR. Zum Vergleich unserer Sequenzierungsergebnisse und Detektion der Basenunterschiede zwischen *S. stercoralis* und *S. ratti* wurden exemplarisch die Sequenzierungsergebnisse einer der *S. stercoralis* positiven Proben (Übereinstimmung mit AF279916.2 zu 99.79%) mit den Ergebnissen einer *S. ratti* positiven Probe (Übereinstimmung AB923889.1 zu 99.22%) in Korrelation gebracht. Für den adäquaten Vergleich standen uns sequenzierte Bereiche beider Stämme mit dem Primerpaar 685F / 1213R und dem Paar 365F/707R bereit. Zur Auswertung konnten nur die Ergebnisse des Vorwärtsprimer 685F und des Rückwärtsprimer 707R herangezogen werden, da die jeweiligen dazugehörigen Primerpaare kein positives Sequenzierungssignal ergaben. Die von Hasegawa und Kollegen beschriebenen hypervariablen Regionen HVR I (215 bis 222 Basenfolge) sowie HVR IV (1292 bis 1314 Basenabfolge) wurden nicht abgedeckt. Der Abgleich der *S. stercoralis* 18S SSU mit unserem Sequenzierungsergebnis (Primerpaar 685F / 1213R) ergab eine 100%-ige Übereinstimmung der Basenabfolge. Ähnlich ergab auch der Abgleich der *S. ratti* 18S SSU mit unserem Sequenzierungsergebnis und gleichem Primerpaar eine 100%-ige Übereinstimmung. Der Vergleich beider Stämme mit den Primern 685F/1213R ergab eine Punktmutation. Der

Abgleich der Sequenzierung beider Stämme mit den Primern 365F/707R ergab zwei weitere Punktmutationen (siehe Tab. 5-14). Durch den vorherigen Vergleich unserer Sequenzen mit der 18S SSU der jeweiligen Subspezies konnten die 3 Punktmutationen als valider Unterschied deklariert werden.

	Sequenzierung mit dem Primer 685 F ab 250, 5' → 3'	Sequenzierung mit dem Primer 707 R ab ca.200/230, 3' → 5'
S. stercoralis 18S small subunit ribosomal RNA gene GenBank:AF279916.2	ATTTATGCA T CTTCT ↑ ↓	AAATA C TAA A AATAA ↑ ↑ ↓ ↓
S. ratti 18S small subunit ribosomal RNA gene GenBank: AB923889.1	ATTTATGCA C CTTCT	AAATA T TAA T AATAA

Tab. 4-13 Darstellung der Punktmutationen von sequenzierten *Strongyloides spp.*

5 Diskussion

5.1 Klinische Relevanz der Strongyloidiasis unter Berücksichtigung der durchgeführten Diagnostik

Helminthen, die über Bodenkontakt übertragen und dadurch verbreitet werden, haben in vielen Teilen der Welt eine sehr große medizinische Bedeutung. Das Zusammenspiel aus mangelhaften hygienischen Bedingungen, schlechter Gesundheitsversorgung vor Ort und unzureichenden und unzuverlässigen diagnostischen Mitteln zur Detektion dieser Helminthen führen zu einer stetigen Zunahme der Anzahl der Betroffenen. Infektionen mit *S. stercoralis* treten nicht nur in subtropischen und tropischen Regionen auf, sondern werden auch zunehmend süd- und osteuropäischen Ländern wie Frankreich, der Slowakei oder Spanien beobachtet. In Spanien wurden die meisten Fälle von *S. stercoralis*-Infektionen in Europa diagnostiziert (Belhassen-García et al., 2017). Strongyloidiasis wird auch in bestimmten Risikopopulationen wie Geflüchteten, Immigranten, Reiserückkehrern, immunsupprimierten Patienten und Menschen mit beruflichem Bodenkontakt (z.B. Bauern, Winzer) verstärkt beschrieben (Beknazarova et al., 2016). Die gesundheitlichen Folgen von *S. stercoralis* nehmen ein breites Spektrum ein und reichen von asymptomatischen leichten Infektionen bis zur chronischen symptomatischen Strongyloidiasis. Vor allem bei Patienten mit kompromittiertem Immunsystem (z.B. im Rahmen einer Organtransplantation oder Malignomen), kann es zu einer unkontrollierten und rasanten Vermehrung des Parasiten (Hyperinfektion) und zur lebensbedrohlichen Ausbreitung von Larven in die inneren Organe kommen (Olsen et al., 2009) (Kia et al., 2008). Entsprechend aktueller Praxisleitlinien wird das Screening von *S. stercoralis* Infektionen vor Transplantationen oder Beginn einer immunsuppressiven Therapie empfohlen (Tombly et al., 2009). Die Diagnose einer *S. stercoralis*-Infektion beruht hauptsächlich auf der nativen Stuhlmikroskopie und der Identifikation von Helminthenlarven. In asymptomatischen Individuen und bei einer leichten Verlaufsform besteht insbesondere eine diagnostische Herausforderung, da sich kaum Wurmeier im Stuhl befinden oder sich die Larvenlast als nur sehr gering darstellt. In diesen Fällen versagen häufig die gewöhnlich benutzten mikroskopischen Techniken der Stuhlproben zur Detektion des *S. stercoralis*. Anreicherungsverfahren (z.B. BM) und Agarplattenkulturen (z.B. KAP) verbessern die diagnostische Genauigkeit, sind aber unzureichend standardisiert und zeitaufwendig (Agrawal et al., 2009). Die letztgenannten

Techniken erfordern eine rasche Untersuchung, da der Nachweis in der Regel nur dann gelingt, wenn die Wurmlarven noch lebendig sind. Dies ist in der Praxis häufig nicht umsetzbar, wenn beispielsweise Stuhlproben an ein parasitologisches Referenzlabor verschickt werden (Buonfrate et al., 2017). Um die Sensitivität des direkten Larvennachweises zu erhöhen, wird häufig eine Kombination von BM und KAP empfohlen (Pocaterra et al., 2005). Aktuellen Berichten zufolge sind zwischen 30 und 370 Millionen Menschen weltweit mit *S. stercoralis* infiziert (Bethony et al., 2006). In parasitologischen und tropenmedizinischen Fachgesellschaften besteht Konsens, dass die Prävalenz von *S. stercoralis* aufgrund der Ungenauigkeit diagnostischer Techniken lange unterschätzt wurde (Beknazarova et al., 2016) (Taylor et al., 2014). Die Entwicklung und Validierung von sensitiven Untersuchungstechniken ist essentiell, um vor allem die leichten Infektionen zu erkennen. Zur Detektion des Erregers in Proben mit geringer Wurmlast hat sich als sensitive Technik die PCR bewährt (Marra et al., 2010). Neben der real-time PCR weisen auch serologische Untersuchungen zum indirekten Erregernachweis eine gute Sensitivität auf. In einer Arbeit von Buonfrate *et al.* wurde eine Sensitivität von 95% für die Serologie beobachtet, gefolgt von der Real-time PCR mit 57% und KAP mit 45% (Buonfrate et al., 2017). Die Serologie ist sehr nützlich, um die individuelle Exposition eines Individuums gegenüber *S. stercoralis* zu evaluieren. Demnach sollten Patienten sechs bis zwölf Monate nach erfolgreicher Behandlung sinkende IgG-Titers aufweisen, sodass die Serologie zur Therapiekontrolle eingesetzt werden kann (Buonfrate et al., 2015). Mit Ausnahme kürzlich erworbener Infektionen weist die Serologie eine hohe Empfindlichkeit und einen NPV von nahezu 100% auf (Buonfrate et al., 2015). Allerdings treten Kreuzreaktionen bei Infektionen mit anderen Nematoden häufig auf (Anderson et al., 2014).

Für die PCR-Diagnostik von *S. stercoralis* wurden verschiedene Protokolle entwickelt (Verweij & Stensvold, 2014), mit jedoch recht unterschiedlichen Ergebnissen: Einige Gruppen berichteten über eine hohe Sensitivität insbesondere der real-time PCR (Sharifdini et al., 2015), während andere Gruppen insbesondere bei geringer Wurmlast im Stuhl enttäuschende Ergebnisse publizierten (Sultana et al., 2013). Im Vergleich mit der KAP zeigte eine Studie eine Sensitivität von 100% für eine Nested PCR, wobei nur eine kleine Gruppe von 16 Individuen positiv für *S. stercoralis* war (Moghaddassani et al., 2011). Im Unterschied hierzu zeigten die Untersuchungen von Verweij und Kollegen keine höhere Sensitivität der PCR verglichen mit BM und KAP (Verweij et al., 2009). In unserer Studie untersuchten wir die diagnostische Genauigkeit der real-time PCR für die Diagnostik von *S. stercoralis* im Vergleich zu BM- und KAP-Techniken und analysierten die Übereinstimmung der mittels

real-time PCR ermittelten, verblindeten Ergebnisse in zwei europäischen Laboratorien. Die real-time PCR war die sensitivste Technik für die Diagnostik einer *S. stercoralis*-Infektion. Etwa die Hälfte aller Infektionen wäre bei alleiniger Durchführung einer Stuhlmikroskopie unentdeckt geblieben. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Daten und Studien hinsichtlich der unzureichenden Aussagekraft der Stuhlmikroskopie, wenn nicht mehrere Proben von konsekutiven Tagen untersucht werden (Siddiqui & Berk, 2001). Unabhängig von dem zu untersuchenden Erreger ist die diagnostische Übereinstimmung der real-time PCR in zwei unabhängigen Laboren (trotz leichter Modifikationen der PCR-Protokolle) mit einer hohen Reproduzierbarkeit bestätigt worden (Travis et al., 2011).

Eine systematische Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2014, in der elf Studien miteinander verglichen wurden, zeigt für die Baermann-Anreicherung eine Sensitivität von 72% und für die KAP 89%, während die direkte Stuhlmikroskopie lediglich eine Sensitivität von 21% aufwies (Polanco et al., 2014). Zu beachten ist, dass diese Metaanalyse die molekulare Diagnostik für *S. stercoralis* als Detektionsmöglichkeit nicht berücksichtigt hat. Denkbar wäre, dass die beschriebenen Sensitivitäten die wahre diagnostische Genauigkeit der konventionellen Techniken überschätzen. Ist der dringende Verdacht auf eine *S. stercoralis* Infektion ohne die Möglichkeit einer speziellen Diagnostik gegeben, sollten zur Erhöhung der diagnostischen Empfindlichkeit weiterhin mehrere Stuhlproben von unterschiedlichen Entnahmetagen mikroskopiert werden (Siddiqui & Berk, 2001), da Wurmlarven mit einer hohen Tagesvariabilität ausgeschieden werden (Utzinger et al., 2001). Es besteht vor allem bei Infektionen mit geringer Intensität ein großes Risiko, dass bei einmaliger Untersuchung die Infektionen nicht detektiert werden (Schär et al., 2013). In der hier vorliegenden Dissertation wurde ebenfalls lediglich eine Stuhlprobe pro Individuum untersucht, was zur Unterschätzung der tatsächlichen Prävalenz von *S. stercoralis* und Hakenwurm geführt haben könnte. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch für die Baermann-Anreicherung eine höhere Sensitivität als für die Koga-Agar-Methode. Gemessen an der quantitativen Larvenmenge in BM und KAP waren die meisten Infektionen im hier untersuchten Kollektiv von geringer Intensität, sodass eine Sensitivitätssteigerung durch den Einsatz größerer Mengen an Fäkalmaterial oder wiederholte Probennahme hätte erreicht werden können. In einer Arbeit von Dacal *et al.* konnte die Sensitivität der konventionellen Methoden bei Analyse konsekutiver Stuhlproben von 83% auf 100% gesteigert werden (Dacal et al., 2017). Selbst geringfügige Änderungen in der Aufbereitung für die Mikroskopie, wie zum Beispiel die Menge des aufzubereitenden Fäkalmaterials oder die Zentrifugationsgeschwindigkeit, nehmen maßgeblich Einfluss auf die Resultate (Anamart et al., 2010)(Inês et al., 2011). Diese

diagnostische Anfälligkeit führt dazu, dass eine genaue Standardisierung des Versuchsprotokolls für die jeweiligen Techniken zwingend nötig ist, um die Ergebnisse verschiedener Laboratorien miteinander vergleichen zu können. In der aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die PCR-Untersuchung maßgeblich durch die eingesetzte DNA-Extraktionsmethode beeinflusst wird. Zur Detektion von intestinalen Nematoden in Fäkalmaterial mittels PCR ist die Optimierung der DNA-Isolationsmethode essentiell, da Stuhlinhibitoren relativ häufig sind und stark die Resultate der PCR beeinflussen (Sharifdini et al., 2015). PCR-Inhibitoren sind Substanzen im Stuhlmaterial, wie z.B. bakterielle Proteasen, Nukleasen, Zelltrümmer oder auch Gallensäuren (Repetto et al., 2013). Die inhibitorischen Effekte treten verstärkt in Proben mit geringer Menge an Parasiten-DNA auf (Moghaddassani et al., 2011). Somit kann in unserer Studie das Vorkommen von Inhibitoren in der Stuhlprobe zu falsch negativen PCR Ergebnissen geführt haben. Eine Möglichkeit zum Binden und Neutralisieren der PCR-Inhibitoren wäre der Zusatz von BSA (Bovines Serumalbumin) (Abu Al-Soud & Rådström, 2000). Eine Verbesserung der DNA-Isolationstechniken wurde als wichtiges Forschungsziel identifiziert und eine Kombination mehrerer Isolierungsschritte scheint die Sensitivität zu erhöhen (Repetto et al., 2013). Deshalb sollten künftig Studien durchgeführt werden, um den Einfluss der Extraktionsmethoden beurteilen und die PCR-Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können.

Die Sensitivität der real-time PCR in unserer Studie betrug 76.8%. Eine kürzlich durchgeführte Studie in Spanien mit *S. venezuelensis* zeigte eine höhere Sensitivität in der real-time PCR mit 93.8% (Saugar et al., 2015). Eine weitere Studie, in der eine real-time PCR sowohl für *S. stercoralis* als auch für Hakenwürmer evaluiert wurde, zeigte eine Sensitivität von 88.9% für *S. stercoralis* (Schär et al., 2013). Im Gegensatz dazu gibt es Veröffentlichungen, in denen die real-time PCR im Vergleich mit den konventionellen Techniken eine geringe Sensitivität (30.9%) aufweist (Knopp et al., 2014). Auffällig in der zuletzt beschriebenen Arbeit war, dass die mittlere Larvenanzahl in PCR-negativen Proben geringer war als in den per PCR detektierten Proben. Dies führt zur Annahme, dass ein Ausgangsmaterial mit hoher Larvenanzahl zur Sensitivitätserhöhung in der real-time PCR führt. Die Spezifität der zuletzt genannten drei Studien reichte von 86.5% bis 93.9%. Dies ist wiederum vergleichbar mit der Spezifität unserer Arbeit, die bei 93.9% lag. Es ist zu beachten, dass chronische *S. stercoralis*-Infektionen meist nur eine geringe Larvenlast im Fäkalmaterial aufweisen, was zu falsch-negativen PCR Resultaten führen kann (Kramme et al., 2011) (Sultana et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen der mikroskopisch diagnostizierten Larvenmenge und den real-time PCR-

Ergebnissen ermittelt werden. Es fiel auf, dass die PCR-Ergebnisse aus den Ethanol-fixierten Proben deutlich stärker positiv waren als die Resultate aus den nativen Stuhlproben.

Die Stuhlproben unserer Studie stammten aus epidemiologischen Querschnittsstudien. Obwohl in der klinischen Untersuchung eine gewisse Morbidität bei *S. stercoralis*-positiven Personen nachweisbar war (Becker et al., 2011), ist davon auszugehen, dass die meisten Menschen unter einer chronischen Infektion mit einer geringen Wurmlast litten. Diese Tatsache kann die relativ geringe Sensitivität unserer real-time PCR teilweise erklären, insbesondere, wenn man die vorgenannten Berichte aus Spanien (Saugar et al., 2015) mit Proben von symptomatischen Patienten und aus Kambodscha (Khieu et al., 2013) mit hoher Infektionslast hinzuzieht.

5.2 Diagnostische Bedeutung der Koinfektionen von *S. stercoralis* und Hakenwürmer

S. stercoralis-Larven sind den Larven anderer Nematoden (besonders *Trichostrongylus* und Hakenwurmspezies) morphologisch sehr ähnlich, woraus sich Herausforderungen für die mikroskopische Diagnostik ergeben. Die Larven von *S. stercoralis* sind klein und linear, der Körper ist transparent, der Schwanz ist kurz, an einem Ende stumpf und am anderen Ende spitz zulaufend. Diese morphologischen Charakteristiken sind nicht immer spezifisch für *S. stercoralis* (Wang et al., 2017). Hakenwürmer gehören zu den bedeutsamsten STHs und wissenschaftlichen Schätzungen zu Folge liegt weltweit die Zahl der chronisch Infizierten bei über 600 Millionen (Humphries et al., 2011). Eine Fehlklassifikation der morphologisch ähnlichen Hakenwürmer als *S. stercoralis* könnte zur weiteren Herabsetzung der Spezifität in unserer Arbeit geführt haben; ein ähnliches Phänomen wurde bereits in einer Studie aus Ghana beobachtet (Verweij et al., 2009).

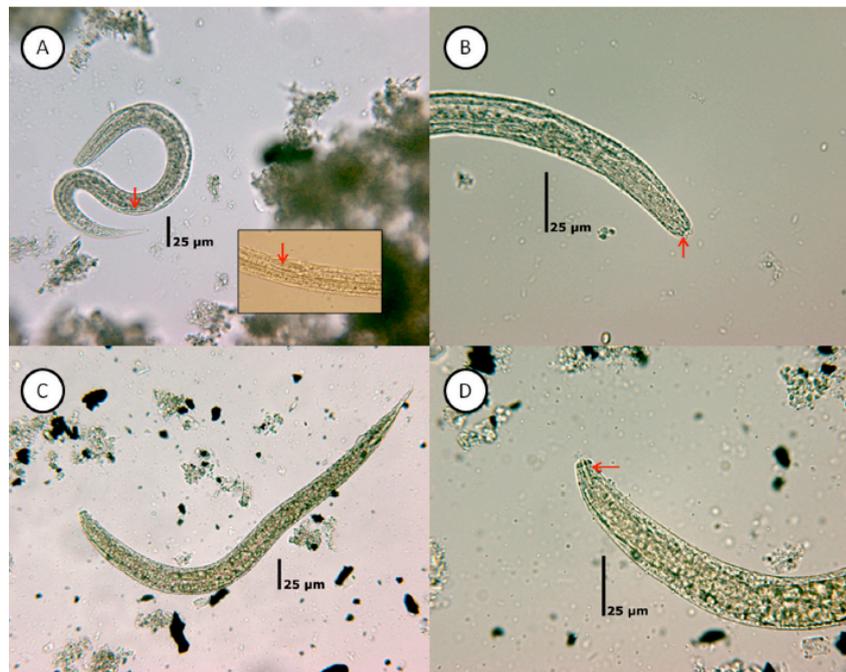


Abb. 5-1. Morphologie rhabditiformer *S. stercoralis* L₁ Larven (A+B) und Hakenwurm L₁ Larven (C+D) -detektiert mittels Baermann Technik. Charakteristische Unterschiede sind mit roten Pfeilen markiert.

Abbildung 5-1 zeigt die morphologischen Charakteristiken der *S. stercoralis*-Larven des Stadiums L₁ und der Hakenwurm-Larven auf, welche häufig zur Differenzierung herangezogen werden. Bei *S. stercoralis*-Larven kann man mikroskopisch ein prominentes Genitalprimordium und eine kurze Mundöffnung erkennen. Hakenwürmer präsentieren sich mit einer langen Mundhöhle und der Abwesenheit eines sichtbaren Genitalprimordiums. Die gehäufte Anzahl der Koinfektionen kann durch den ähnlichen Übertragungsweg beider Helminthen erklärt werden (Strunz et al., 2014). Mehrere Studien haben das ko-endemische Auftreten von Hakenwürmern und *S. stercoralis* bestätigt, vor allem in afrikanischen Regionen wie der Elfenbeinküste und Tansania, woher auch unsere Proben stammen (Becker et al., 2011)(Glinz et al., 2010). Die Auswertung unserer Daten ergab, dass die mikroskopische Analyse von Stuhlproben aus den Ursprungsgebieten, in denen Koinfektionen mit dem Hakenwurm und *S. stercoralis* möglich sind, präziser erfolgen sollte. 13 Proben, die mikroskopisch positiv für *S. stercoralis* waren, konnten in der real-time PCR nicht bestätigt werden (Tab. 4-8). In 10 dieser Proben wurde durch zwei unterschiedliche Techniken die Diagnose „Hakenwurm“ bestätigt, sodass die mikroskopische Diagnose „*Strongyloides*“ möglicherweise fehlerhaft war. Weltweit wird in mikrobiologischen Laboratorien eine Abnahme parasitologisch geschulter Labormitarbeiter beobachtet, sodass mangels Erfahrung und Expertise eine verlässliche mikroskopische Identifikation von Parasiten nicht immer

möglich ist. Auch in diesem Zusammenhang sind „Untersucher-unabhängige“ Methoden wie die Durchführung molekularbiologischer PCR-Verfahren sinnvoll.

Studien, die sich mit dem Verteilungsmuster von *S. stercoralis* und Hakenwürmer befassten, konnten einen Peak im Jugendalter und stabile Verteilung im Erwachsenenalter beobachten. Während manche Studien keinen geschlechterspezifischen Unterschied feststellten, konnten andere den bevorzugten Befall von männlichen Betroffenen darstellen. Dies zeigt möglicherweise die verschiedenen Expositionsarten auf (Krolewiecki et al., 2013). In unserer Studie waren Frauen und Männer gleichermaßen von beiden Erregern betroffen und der Altersgipfel lag im mittleren Erwachsenenalter von 30-49 Jahren.

5.3 Bedeutung der DNA-Sequenzierung für die *Strongyloides*-Forschung

In der Gattung *Strongyloides* haben die Spezies *S. stercoralis* und *S. fuelleborni* die größte humanmedizinische Relevanz (Hunt et al., 2016). Da eine sichere morphologische Differenzierung zwischen den Larven der einzelnen *Strongyloides*-Subspezies nicht möglich ist und Unklarheit besteht, welche der anderen Spezies möglicherweise auch humanpathogen sein könnten, hat die DNA-Sequenzierung Potential, eine genauere Zuordnung zu ermöglichen (Koosha et al., 2009). Die Sequenzierung kurzer Untereinheiten der ribosomalen 18S DNA (*small subunit ribosomal DNA*) zur Identifikation mikrobieller Taxa stellt hierbei eine recht präzise Option dar. In Nematoden wird die SSU häufig für phylogenetische Studien unter und innerhalb der Spezies verwendet (Schär et al., 2014) Auch bei Betrachtung kurzer Teilsequenzen ist die ribosomale DNA ausreichend variabel, um Unterscheidungen in einer Speziesart hervorzuheben (Countway et al., 2005). In verschiedenen Forschungsarbeiten konnten zahlreiche Genotypen von *Strongyloides stercoralis* sowie verschiedene *Strongyloides* spp. anhand genetisch variabler Regionen zugeordnet und differenziert werden (Hasegawa et al., 2009). Um die neu entdeckten Subspezies und ihre potentielle medizinische Relevanz zu erforschen, sind weitere Sequenzierungsuntersuchungen erforderlich. Die Auswertung der in dieser Arbeit untersuchten Proben ergab häufig nicht interpretierbare Mischsequenzen und Sequenzen, welche zwar ausgewertet werden konnten, die aber in den verfügbaren Datenbanken gleichermaßen mehreren Spezies zugeordnet wurden, sodass keine eindeutige Identifizierung möglich war. Diese Arbeit zeigte zudem, dass sich die Sequenzierung für die Routinediagnostik problematisch darstellt, da nur ein geringer Anteil

der für *S. stercoralis* mikroskopisch positiven Proben mittels Nested-PCR und anschließend einer Sequenzierung typisiert werden konnten.

Hasegawa und Kollegen beschrieben die 18S rDNA-Sequenz zwar prinzipiell als wenig geeignet zur Speziesdiagnostik, fanden jedoch die hypervariablen Regionen (HVR), die in ihrer Arbeit doch als Spezies-spezifische Marker beschrieben wurden. Unsere Primer deckten die hypervariablen Regionen II (Bp 641 - 643), III (Bp 667 – 687) und IV (Bp 1292 – 1314) ab, eine genaue Differenzierung innerhalb der *Strongyloides* spp. war jedoch zumeist nicht möglich. Es besteht daher Anlass zu der Annahme, dass es sich bei in menschlichen Proben als *S. stercoralis* diagnostizierten Proben durchaus auch einen Komplex aus mehreren eng verwandten Arten oder Unterarten handeln könnte (Schär et al., 2014). Zukünftige Studien sollten neuere Methoden wie die Ganzgenomsequenzierung einsetzen, um eine präzisere Differenzierung zu ermöglichen.

5.4 Abschließende Beurteilung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine real-time PCR empfindlicher als die Kombination aus BM- und KAP-Techniken für die Diagnose von *S. stercoralis* aus humanen Stuhlproben ist. Es konnte eine wesentliche Übereinstimmung in den Ergebnissen der PCR von Stuhlproben für *S. stercoralis* in zwei europäischen Laboratorien gezeigt werden. Die PCR kann neben einer erhöhten Sensitivität auch die Spezifität erhöhen, indem sie eine Fehldiagnose von morphologisch ähnlichen Nematoden (z.B. *Strongyloides* spp. und Hakenwürmer) verhindert. Da sowohl *S. stercoralis* als auch Hakenwürmer im selben Gebiet ko-endemisch vorkommen, ist eine Methode der Differentialdiagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität erforderlich. Für eine bestmögliche Diagnostik aus klinischen Proben empfiehlt sich die Anwendung eines Algorithmus, der eine real-time PCR und Stuhlmikroskopie unter Verwendung der BM- und KAP-Techniken kombiniert. Die partielle DNA-Sequenzierung ermöglicht eine differenziertere Betrachtung der einzelnen *Strongyloides*-Spezies, kann jedoch in den hier untersuchten Genabschnitten zumeist keine zweifelsfreie Speziesidentifizierung ermöglichen. Eine weitere Optimierung sowie die Ausweitung sequenzbasierter *Strongyloides*-Studien sind daher für zukünftige Forschungsprojekte empfehlenswert. Ein stärkeres Bewusstsein bei forschenden, diagnostischen und klinischen Disziplinen für diese vernachlässigte Tropenkrankheit ist essentiell, um die mit der Strongyloidiasis assoziierte Krankheitslast dauerhaft zu reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abu Al-Soud, W., & Rådström, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(12), 4463–4470.
- Agrawal, V., Agarwal, T., & Ghoshal, U. C. (2009). Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(3), 242–6.
- Anamnat, W., Pattanawongsa, A., Intapan, P. M., & Maleewong, W. (2010). Factors Affecting Recovery of *Strongyloides stercoralis* Larvae: an Approach to a Newly Modified Formalin-Ether Concentration Technique for Diagnosis of Strongyloidiasis, *48*(1), 97–100.
- Anderson, N. W., Klein, D. M., Dornink, S. M., Jespersen, D. J., Kubofcik, J., Nutman, T. B., Theel, E. S. (2014). Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(5), 732–736.
- Basuni, M., Muhi, J., Othman, N., Verweij, J. J., Ahmad, M., Miswan, N., Rahumatullah A., Aziz F.A., Zainudin N.S., Noordin, R. (2011). A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(2), 338–343.
- Becker, S. L., Chatigre, J. K., Gohou, J.-P., Coulibaly, J. T., Leuppi, R., Polman, K., Chappuis, F., Mertens, P., Herrmann, M., N'Goran, E.K, Utzinger, J., von Müller, L. (2015). Combined stool-based multiplex PCR and microscopy for enhanced pathogen detection in patients with persistent diarrhoea and asymptomatic controls from Côte d'Ivoire. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *21*(6), 591.e1–10.
- Becker, S. L., Lohourignon, L. K., Speich, B., Rinaldi, L., Knopp, S., N'Goran, E. K., Cringoli, G., Utzinger, J. (2011). Comparison of the Flotac-400 dual technique and the formalin-ether concentration technique for diagnosis of human intestinal protozoan infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(6), 2183–90.
- Becker, S. L., Piraisoody, N., Kramme, S., Marti, H., Silué, K. D., Panning, M., Nickel, B., V.Kern, W., Herrmann, M., Hatz, C.F., N'Goran, E.K., Utzinger, J., von Müller, L. (2015). Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples

- from Côte d'Ivoire: Diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. *Acta Tropica*, *150*, 210–7.
- Becker, S. L., Sieto, B., Silué, K. D., Adjossan, L., Koné, S., Hatz, C., Kern, WV, N'Goran, E.K., Utzinger, J. (2011). Diagnosis, clinical features, and self-reported morbidity of *Strongyloides stercoralis* and hookworm infection in a co-endemic setting. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(8).
- Beknazarova, M., Whiley, H., & Ross, K. (2016). Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(5).
- Belhassen-García, M., Alonso-Sardón, M., Martínez-Perez, A., Soler, C., Carranza-Rodríguez, C., Pérez-Arellano, J. L., Muro, A., Salvador, F. (2017). Surveillance of strongyloidiasis in Spanish inpatients (1998–2014). *PLoS ONE*, *12*(12), 1–14.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, *367*(9521), 1521–1532.
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A. J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodoni, P.I., Anselmi, M., Moreira, J., Albonico, M. (2013). *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(5), 7–10.
- Brooker, S., Bethony, J., & Hotez, P. J. (2008). Europe PMC Funders Group Human Hookworm Infection in the 21 st Century, (04), 1–59.
- Buonfrate, D., Formenti, F., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2015). Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(6), 543–552.
- Buonfrate, D., Perandin, F., Formenti, F. & Bisoffi, Z. (2017). A retrospective study comparing agar plate culture , indirect immuno fluorescence and real-time PCR for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection, 1–5.
- Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Van Den Ende, J., & Bisoffi, Z. (2013). Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1), 78.
- Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R. O., Krolewiecki, A. J., Albonico, M., Degani,

- M., Tais, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Muñoz, J., Nutman, T.B., Bisoffi, Z. (2015). Accuracy of Five Serologic Tests for the Follow up of *Strongyloides stercoralis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–12.
- Countway, P. D., Gast, R. J., Savai, P., & Caron, D. A. (2005). Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubation in the Western North Atlantic. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(2), 95–106.
- Dacal, E., Saugar, J. M., Soler, T., Azcárate, J. M., & Jiménez, M. S., Merino, F.J., Rodríguez, E. (2017). Parasitological versus molecular diagnosis of strongyloidiasis in serial stool samples : how many ?, 1–5.
- Dorris, M., Viney, M. E., & Blaxter, M. L. (2002). Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology*, 32(12), 1507–17.
- Duvignaud, A., Pistone, T., & Malvy, D. (2016). Strongyloidiasis in a young French woman raises concern about possible ongoing autochthonous transmission in Spain. *International Journal of Infectious Diseases*, 42, 43–44.
- Freedman, D. O. Experimental infection of human subject with *Strongyloides* species. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(6), 1221–6.
- Glinz, D., N'Guessan, N. A., Utzinger, J., & N'Goran, E. K. (2010). High Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Among School Children in Rural Côte d'Ivoire. *The Journal of Parasitology*, 96, 431–433.
- Hasegawa, H., Hayashida, S., Ikeda, Y., & Sato, H. (2009). Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis. *Parasitology Research*, 104(4), 869–74.
- Hasegawa, H., Sato, H., Fujita, S., Nguema, P. P. M., Nobusue, K., Miyagi, K., Kooriyama, T., Takenoshita, Y., Noda, S., Sato, A., Morimoto, A., Ikeda, Y., Nishida, T. (2010). Molecular identification of the causative agent of human strongyloidiasis acquired in Tanzania: dispersal and diversity of *Strongyloides* spp. and their hosts. *Parasitology International*, 59(3), 407–13.
- Henriquez-Camacho, C., Gotuzzo, E., Echevarria, J., White, A. C., Terashima, A., Samalvides, F., Pérez-Molina, J.A., Plana, M. N. (2016). Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD007745.

- Hotez, P. J., Bethony, J., Bottazzi, M. E., Brooker, S., & Buss, P. (2005). Hookworm: “The great infection of mankind.” *PLoS Medicine*, 2(3), 0187–0191.
- Humphries, D., Mosites, E., Otchere, J., Twum, W. A., Woo, L., Jones-Sanpei, H., Harrison, L.M., Bungiro, E.D., Benham-Pyle, B., Bimi, L., Edoh, D., Bosompem, K., Wilson, M., Cappello, M. (2011). Epidemiology of hookworm infection in Kintampo North Municipality, Ghana: Patterns of malaria coinfection, anemia, and albendazole treatment failure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5), 792–800.
- Hunt, V. L., Tsai, I. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Tracey, A., Cotton, J.A., Stanley, E., Beasley, H., Brennet, H.M., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., Quail, M.A., Randle, N., Xia, D., Brattig, N.W., Berriman, M. (2016). The genomic basis of parasitism in the Strongyloides clade of nematodes. *Nature Genetics*, 48(3), 299–307.
- Inês, E. de J., Souza, J. N., Santos, R. C., Souza, E. S., Santos, F. L., Silva, M. L. S., Silva, M., Teixeira, M.C.A., Soares, N. M. (2011). Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Tropica*, 120(3), 206–210.
- Jonker, F. A. M., Calis, J. C. J., Phiri, K., Brienen, E. A. T., Khoffi, H., Brabin, B. J., Verweij, J.J., van Hensbroek M.B., van Lieshout, L. (2012). Real-time PCR demonstrates ancylostoma duodenale is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), 1–8.
- Keiser, P. B., Keiser, P. B., Nutman, T. B., & Nutman, T. B. (2004). *Strongyloides stercoralis*, 17(1), 208–217.
- Khieu, V., Srey, S., Schär, F., Muth, S., Marti, H., & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis* is a cause of abdominal pain, diarrhea and urticaria in rural Cambodia. *BMC Research Notes*, 6, 200.
- Kia, E. B., Rahimi, H. R., Mirhendi, H., Nilforoushan, M. R., Talebi, A., Zahabiun, F., Kazemzadeh, H., Meamar, A. R. (2008). A case of fatal strongyloidiasis in a patient with chronic lymphocytic leukemia and molecular characterization of the isolate. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(4), 261–3.
- Knopp, S., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Steinmann, P., Stothard, J. R., Rollinson, D., Marti, H., Utzinger, J. (2008). Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive

- chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11), e331.
- Knopp, S., Salim, N., Schindler, T., Voules, D. a K., Rothen, J., Lweno, O., Mohammed, A.S., Singo, R., Benninghoff, M., Nsojo,A., Genton, B.,Daubenberger, C. (2014). Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(3), 535–545.
- Koga, K., Kasuya, S., Khamboonruang, C., Sukhavat, K., Ieda, M., Takatsuka, N., Kita, K., Ohtomo, H. (1991). A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(4), 518–21.
- Kolmodin, L. A., & Birch, D. E. (2002). Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 192, 3–18.
- Koné, S., Baikoro, N., N'Guessan, Y., Jaeger, F. N., Silué, K. D., Fürst, T., Gonety, P., Hürlimann, E., Ouattara, M., Séka, M.C.Y., N'Guessan, N.A., Ezzo, E.L.J.C., Zouzou, F., Boti, L., Adiossan,L., Dao,D., Tschannen,A.B., von Stamm, T., Bonfroh,B., Tanner, M., Utzinger,J., N'Goran, E. K. (2015). Health & demographic surveillance system profile: The taabo health and demographic surveillance system, côte d'ivoire. *International Journal of Epidemiology*, 44(1), 87–97.
- Krolewiecki, A. J., Lammie, P., Jacobson, J., Gabrielli, A.-F., Levecke, B., Socias, E.,Arias, L.M., Sosa, N., Abraham, D., Cimino,R., Echazú,A., Crudo, F., Vercruysse,J., Albonico, M. (2013). A Public Health Response against *Strongyloides stercoralis*: Time to Look at Soil-Transmitted Helminthiasis in Full. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2165.
- Koosha, S., Kazemi,B., Bonyadi,F. (2009). The 18S Ribosomal DNA Sequence of *Strongyloides stercoralis* in Iran, 4(1), 53–58.
- Labes, E. M., Nurcahyo, W., Wijayanti, N., Deplazes, P., & Mathis, A. (2011). Genetic characterization of *Strongyloides* spp. from captive, semi-captive and wild Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*) in Central and East Kalimantan, Borneo, Indonesia. *Parasitology*, 138(11), 1417–22.
- Luvira, V., Watthanakulpanich, D., & Pittisuttithum, P. (2014). Management of *Strongyloides stercoralis*: a puzzling parasite. *International Health*, 6(4), 273–81.
- Marra, N. M., Chiuso-minicucci, F., Machado, G. C., Zorzella-pezavento, S. F. G., Graziela,

- T., França, D., Ishikawa, L.L.W., Amarante, A.F.T., Sartori, A., Amarante, M. R. V. (2010). Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats, *105*(February), 57–61.
- Marti, H., Haji, H. J., Savioli, L., Chwaya, H. M., Mgeni, A. F., Ameir, J. S., & Hatz, C. (1996). A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *55*(5), 477–81.
- Moghaddassani, H., Mirhendi, H., Hosseini, M., Rokni, M., Mowlavi, G., & Kia, E. (2011). Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples. *Iranian Journal of Parasitology*, *6*(2), 23–30.
- Navitsky, R. C., Dreyfuss, M. L., Shrestha, J., Khatry, S. K., Stoltzfus, R. J., & Albonico, M. (1998). *Ancylostoma duodenale* is responsible for hookworm infections among pregnant women in the rural plains of Nepal. *The Journal of Parasitology*, *84*(3), 647–51.
- Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J.J., Magnussen, P. (2009). Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(10), 967–72.
- Pocaterra, L. A., Ferrara, G., Peñaranda, R., Rojas, E., Hernán, A., Certad, G., Goldstein, C., Núñez, L. (2005). Improved Detection of *Strongyloides stercoralis* in Modified Agar Plate Cultures, (January 2000).
- Polanco, L. C., Gutiérrez, L. A., Arias, C., Pontificia, U., (2014). Infección por *Strongyloides stercoralis*: Metaanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales Meta-analysis on Evaluati, 581–600.(Octubre 14).
- Pontes, L. A., Oliveira, M. C., Katz, N., Dias-neto, E., & Rabello, A. N. A. (2003). Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*, *68*(6), 652–656.
- Putland, R. A., Thomas, S. M., Grove, D. I., & Johnson, A. M. (1993). Analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Strongyloides stercoralis*. *International Journal for Parasitology*, *23*(1), 149–51.
- Repetto, S. a., Soto, C. D. A., Cazorla, S. I., Tayeldin, M. L., Cuello, S., Lasala, M. B., Tekiel, V.S., González Cappa, S. M. (2013). An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Tropica*, *126*(2), 110–114.

- Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., & Muñoz, J. (2013). The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(1), e2002.
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Aban, J. L., Pérez-Arellano, J. L., Gárate, T., & Muro, A. (2006). *Schistosoma mansoni*: A diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Experimental Parasitology*, 114(2), 84–88.
- Saugar, J. M., Merino, F. J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Soto, P., Ortega, S., Gárate, T., & Rodríguez, E. (2015). Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides spp.* in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Tropica*, 142, 20–5.
- Schär, F., Guo, L., Streit, A., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., & Odermatt, P. (2014). *Strongyloides stercoralis* genotypes in humans in Cambodia. *Parasitology International*, 63(3), 533–6.
- Schär, F., Odermatt, P., Khieu, V., Panning, M., Duong, S., Muth, S., Marti, H., Kramme, S. (2013). Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Tropica*, 126(2), 89–92.
- Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7), e2288.
- Sharifdini, M., Mirhendi, H., Ashrafi, K., Hosseini, M., Mohebbi, M., Khodadadi, H., Kia, E.B., (2015). Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Parasitological Methods for Detection of *Strongyloides stercoralis* in Human Fecal Samples, 93(6), 1285–1291.
- Siddiqui, a a, & Berk, S. L. (2001). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(7), 1040–1047.
- Sitta, R.B., Malta, F.M., Pinho, J.R., Chieffi, P.P., Gryscek, R.C.B., & Paula, F.M. (2014). Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*, 141(05), 716–721.
- Speich, B., Ame, S. M., Ali, S. M., Alles, R., Huwyler, J., Hattendorf, J., Utzinger J., Alboncio, M., Keiser, J. (2014). Oxantel Pamoate–Albendazole for *Trichuris trichiura* Infection. *New England Journal of Medicine*, 370(7), 610–620.

- Staněk, L. (2013). Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology. *Ceskoslovenská Patologie*, 49(3), 119–21.
- Steinmann, P., Zhou, X.-N., Du, Z.-W., Jiang, J.-Y., Wang, L.-B., Wang, X.-Z., Li, L.-H., Marti, H., Utzinger, J. (2007). Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan Province, China, and Comparison of Diagnostic Methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(1), e75.
- Strunz, E. C., Addiss, D. G., Stocks, M. E., Ogden, S., Utzinger, J., & Freeman, M. C. (2014). Water, sanitation, hygiene, and soil-transmitted helminth infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, 11(3), e1001620.
- Sultana, Y., Jeffreys, N., Watts, M. R., Gilbert, G. L., & Lee, R. (2013). Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 88(6), 1048–51.
- Taranto, N. J., Cajal, S. P., De Marzi, M. C., Fernández, M. M., Frank, F. M., Brú, A. M., Minvielle, M.C, Basualdo, J.A, Malchiodi, E. L. (2003). Clinical status and parasitic infection in a Wichi Aboriginal community in Salta, Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 554–558.
- Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J.R., Young, J.R., Boeckh, M. A. (2009). Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 15(10), 1143–1238.
- Travis, E. R., Gaze, W. H., Pontiroli, A., Sweeney, F. P., Porter, D., Mason, S., Sawyer, J., Aranaz, A., Rizardos, E.C., Cork, J., Delahay, R.J., Wilson, G.J., Hewinson, R.G., Courtenay, O., Wellington, E. M. (2011). An Inter-Laboratory validation of a real time PCR assay to measure host excretion of bacterial pathogens, particularly of *Mycobacterium bovis*. *PLoS ONE*, 6(11).
- Utzinger, J., Becker, S. L., Knopp, S., Blum, J., Neumayr, A. L., Keiser, J., & Hatz, C. F. (2012). Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13727.
- Utzinger, J., Booth, M., N’Goran, E. K., Müller, I., Tanner, M., & Lengeler, C. (2001). Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology*, 122(Pt 5), 537–44.

- Verweij, J. J., Brienen, E. A. T., Ziem, J., Yelifari, L., Polderman, A. M., & Van Lieshout, L. (2007). Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 685–690.
- Verweij, J. J., Canales, M., Polman, K., Ziem, J., Brienen, E. A. T., Polderman, A. M., & van Lieshout, L. (2009). Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 342–346.
- Verweij, J. J., Pit, D. S. S., Van Lieshout, L., Baeta, S. M., Dery, G. D., Gasser, R. B., & Polderman, A. M. (2001). Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Tropical Medicine and International Health*, 6(9), 726–731.
- Verweij, J. J., & Rune Stensvold, C. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 371–418.
- Wang, L., Xu, L., Luo, S., Xie, H., Chen, W., & Wu, Z. (2017). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* by morphological characteristics combine with molecular biological methods. *Parasitology Research*.
- Williamson, A. L., Brindley, P. J., Knox, D. P., Hotez, P. J., & Loukas, A. (2003). Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology*, 19(9), 417–23.
- Wong, T. Y., Szeto, C. C., Lai, F. F., Mak, C. K., & Li, P. K. (1998). Nephrotic syndrome in strongyloidiasis: remission after eradication with anthelmintic agents. *Nephron*, 79(3), 333–6.
- Wurtz, R., Mirot, M., Fronda, G., Peters, C., & Kocka, F. (1994). Short report: gastric infection by *Strongyloides stercoralis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(3), 339–40.
- Yap, P., Fürst, T., Müller, I., Kriemler, S., Utzinger, J., & Steinmann, P. (2012). Determining Soil-transmitted Helminth Infection Status and Physical Fitness of School-aged Children. *Journal of Visualized Experiments*, (August), 1–7.
- Zaha, O., Hirata, T., Kinjo, F., & Saito, A. (2000). Strongyloidiasis--progress in diagnosis and treatment. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 39(9), 695–700.

- Lit.: Müller, H.-J.: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Das Methodenbuch. Heidelberg 2001.
Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (eds.): The polymerase chain reaction. Basel 1994.
Newton, C.R., Graham, A.: PCR. Heidelberg 21997. Rabinow, P.: Making PCR: A Story of Biotechnology. Chicago IL 1996.
- WHO. Diarrhoeal disease. Fact sheet no. 330. August 2009. Geneva: World Health Organization; 2009.

7 Publikationen

Abstract und Poster:

VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM
Dresden, 05.- 08. Oktober 2014

„Diagnostic accuracy and inter-laboratory comparison of microscopy and real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis*“

Nivetha Piraisoody, Stefanie Kramme, Hanspeter Marti, Kigbafori D. Silué, Marcus Panning, Mathias Herrmann, Christoph F. Hatz, Eliézer K. N’Goran, Jürg Utzinger, Lutz von Müller, Sören L. Becker

Manuskript:

Fachzeitschrift *Acta Tropica* 2015, Verlag Elsevier
online verfügbar seit dem 26.07.2015
Acta Tropica 150:210-217

“Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Côte d’Ivoire: Diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection”

Sören L. Becker, Nivetha Piraisoody, Stefanie Kramme, Hanspeter Marti, Kigbafori D. Silué, Marcus Panning, Beatrice Nickel, Winfried V. Kern, Mathias Herrmann, Christoph F. Hatz, Eliézer K. N’Goran, Jürg Utzinger, Lutz von Müller

8 Danksagung

Mit den folgenden abschließenden Worten möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich mit Worten und Taten auf dem Weg zum Abschluss dieser Dissertation begleitet, unterstützt und ermutigt haben.

Hervorzuheben sind hierbei:

Herrn Prof. Dr. Lutz von Müller, für die Aufnahme als Doktorandin und meinem Betreuer Prof. Dr. med. Dr. phil. Sören Becker für die zahlreichen Austausche, fachliche Anregung sowie stets zuverlässige Betreuung während der letzten Jahre.

Allen Laborkräften des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, die mich von Anfang an herzlich aufgenommen, intensiv eingearbeitet und mir jederzeit bei Seite standen.

Allen Studienteilnehmer in der Elfenbeinküste und Tansania, dem Swiss Tropical and Public Health Institute in Basel, dem Centre Suisse de Recherches Scientifiques in Abidjan sowie Dr. Benjamin Speich aus Basel für die Bereitstellung der aufgereinigten Proben aus Tansania.

Den liebevollsten Dank möchte ich meiner Familie aussprechen. Allen voran meinem Mann, weil er von ganzem Herzen hinter mir stand und mich die letzten Jahre begleitete und in allen Belangen unterstützte. Auch gebührt ein großer Dank meinen Eltern und meiner Tante, die mich lehrten nicht aufzugeben und den Glauben an mich nie verloren. Durch die bedingungslose Unterstützung meiner Familie und Freunde konnte ich mein Studium sowie diese Promotion erfolgreich beenden. Dafür danke ich von Herzen.

9 Curriculum vitae

Aus datenrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.