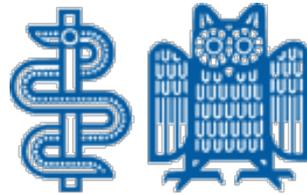


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Universität des Saarlandes

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



**Anwendung der MALDI-TOF-
Massenspektrometrie zur Diagnostik des
Bandwurms *Taenia saginata* unter
Berücksichtigung verschiedener
Probenlagerungsbedingungen**

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

2023

vorgelegt von Tabea Pauline Wendel
geboren am 15. November 1995 in Bielefeld

Tag der Promotion: 27.05.2024
Dekan: Univ. -Prof. Dr. med. Michael Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Sören L. Becker
Prof. Dr. Markus R. Meyer

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Zusammenfassung	1
1.1. Deutsche Fassung.....	1
1.2. Abstract	3
2. Einleitung.....	5
2.1. Helminthen-Infektionen als wichtige neglected tropical diseases (NTDs)	5
2.1.1. Neglected tropical diseases (NTDs).....	5
2.1.2. Einteilung der NTDs und Helminthen	6
2.2. <i>Taenia saginata</i>	8
2.2.1. Vorkommen und Verbreitung	8
2.2.2. Morphologie und Lebenszyklus.....	10
2.2.3. Klinische und wirtschaftliche Bedeutung	13
2.2.4. Diagnostik.....	14
2.2.4.1. Direkte Stuhlmikroskopie	14
2.2.4.2. Kato-Katz-Methode und weitere Konzentrationstechniken	15
2.2.4.3. Kopro-Antigen-ELISA.....	16
2.2.4.4. Immunoblots	16
2.2.4.5. Molekularer Erregernachweis	17
2.2.5. Therapie	18
2.3. Andere humanmedizinisch relevante Cestoden	19
2.3.1. <i>Diphyllobothrium</i> spp	19
2.3.2. <i>Echinococcus</i> spp.....	22
2.4. MALDI-TOF Massenspektrometrie	23
2.5. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden	28
3.1. Experimentelles Vorgehen zu Projektbeginn.....	28
3.2. Versuchsaufbau	28
3.2.1 Massenspektrometrische Identifikation von <i>T. saginata</i>	28
3.2.2. Einfluss verschiedener Lagerungsmedien auf die massenspektrometrische Analyse	31
3.3. Probenherkunft und Lagerung.....	33
3.4. Probenaufarbeitung.....	34
3.5. Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF MS	35

3.5.1. Protein-Extraktion.....	35
3.5.2. Target Plate Vorbereitung und Messung	35
3.5.3. MALDI-TOF MS Parameter	37
3.5.4. Spektrenaufarbeitung.....	37
3.5.5. Auswertung, statistische Analyse und Datenbank-Erstellung.....	38
3.5.5.1. Auswertung der Validierung der massenspektrometrischen Diagnostik von <i>T. saginata</i>	38
3.5.5.2. Auswertung und statistische Analyse von <i>T. saginata</i> in unterschiedlichen Lagerungsmedien .	41
3.6. <i>Molekulargenetische Analyse</i>	42
3.6.1. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	42
3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	43
3.6.3. Gel-Elektrophorese und Sequenzierung.....	44
2.6.4. Sequenzanalyse.....	46
3.7. <i>Geräte, Reagenzien und Software</i>	48
3.7.1. Massenspektrometrische Untersuchung.....	48
3.7.2. Molekulargenetische Untersuchung.....	49
4. Ergebnisse.....	51
4.1. <i>Validierung der MALDI-TOF MS basierten Diagnostik von T. saginata</i>	51
4.1.1. Massenspektrometrische Messung der Parasitenproben	51
4.1.1.1. Analytierte Helminthen-Proben.....	51
4.1.1.2. Visuelle Analyse der Proteinspektren	52
4.1.1.3. Validierung der in-house-Database.....	54
4.1.1.4. Erweiterte Validierung der in-house-Database	55
4.1.1.5. Statistische Analyse	57
4.1.2. Molekulargenetische Bestätigungsdiagnostik der untersuchten Parasiten	59
4.1.2.1. Sequenzierungsergebnisse.....	59
4.1.2.2. Statistische Analyse der Sequenzierungsergebnisse	60
4.2. <i>Vergleichende Analyse der proteinbasierten Clusterung und des phylogenetischen Sequenzstammbaues</i>	61
4.3. <i>Einfluss unterschiedlicher Lagerungsmedien auf die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik</i>	62
4.3.1. Analytierte Proben.....	62
4.3.2. Vergleichende Analyse der Zeitverlaufsmessungen von <i>T. saginata</i> Proglottiden in unterschiedlichen Lagerungsmedien.....	63
4.3.2.1. Visueller Vergleich der Proteinspektren	63
4.3.2.2 LSV-Analyse.....	66
4.3.2.3. Statistische Analyse	68
5. Diskussion	71
5.1. <i>MALDI-TOF MS als diagnostische Methode zur Identifikation von T. saginata</i>	71
5.2. <i>Einfluss des Lagerungsmediums und der Lagerungszeit auf die massenspektrometrische Diagnostik</i>	75
5.3. <i>Anwendbarkeit des MALDI-TOF MS für die Identifikation von T. saginata und Ausblick</i>	77

Literaturverzeichnis	X
Publikation	XXVI
Danksagung	XXVII
Lebenslauf	XXVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: WHOs Liste der 20 wichtigsten NTDs.....	7
Abbildung 2: Morphologie der drei humanpathogenen <i>Taenia</i>	10
Abbildung 3: Lebenszyklus <i>Taenia</i>	12
Abbildung 4: A) <i>T. saginata</i> Eier in Stuhlmikroskopie, B) <i>T. saginata</i> einzelne geschlechtsreife Proglottide nach Injektion von Tusche in die Genitalpore zur Visualisierung der seitlichen Uteruszweige aus	15
Abbildung 5: A) <i>D. nihonkaiense</i> adulter Bandwurm; B) <i>D. nihonkaiense</i> Ei unter mikroskopischer Vergrößerung.....	21
Abbildung 6: Wirkprinzip MALDI-TOF MS	25
Abbildung 7: Workflow Validierung massenspektrometrische Diagnostik von <i>T. saginata</i> .	30
Abbildung 8: Workflow Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerungsmedien auf die massenspektrometrische Diagnostik von <i>T. saginata</i>	32
Abbildung 9: <i>T. saginata</i> Aufarbeitung.....	34
Abbildung 10: Beispiel MALDI-TOF MS Target Plate Protokoll.	36
Abbildung 11: Visuelle Darstellung der Proteinspektren der Parasitenproben mit der FlexAnalysis Software.	54
Abbildung 12: Diagramm zur Visualisierung der Veränderung der Mittelwerte der LSVs und der Identifikationsrate nach Abgleich der Proteinspektren mit der Bruker Database + der in-house-Database sowie nach Hinzufügen von MSPs zu diesem Abgleich.....	57
Abbildung 13: Dendrogramm der summary spectra der technischen Replikate der Parasitenproben.	58
Abbildung 14: Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse der zusammengefassten Proteinspektren der Parasitenproben.....	59
Abbildung 15: Phylogenetischer Sequenzstammbaum der Sequenzen aller Parasitenproben.	61
Abbildung 16: Vergleich der phylogenetischen Sequenzanalyse mit der hierarchischen Clusteranalyse der Proteinspektren der Parasitenproben.	62
Abbildung 17: Proteinspektrumprofile von <i>T. saginata</i> Proglottiden im Zeitverlauf in den neuen Lagerungsmedien.....	66
Abbildung 18: Mittelwerte der log score values von <i>T. saginata</i> Proglottiden in den unterschiedlichen Lagerungsmedien im Zeitverlauf von 2-24 Wochen.	68
Abbildung 19: Dendrogramm der summary spectra.....	69

Abbildung 20: Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse (PCA) der *T. saginata* Proglottiden Proben in unterschiedlichen Lagerungsmedien nach zwei, zwölf und 24 Wochen Lagerungszeit. 70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenherkunft, Aufnahmedatum und Lagerungsmedium.	33
Tabelle 2: Offizieller log score value Bruker.	39
Tabelle 3: Proteinspektren der parasitologischen Proben in diesem Projekt.	51
Tabelle 4: Proteinpeaks der einzelnen Parasitenproben tabellarisch zusammengefasst.	53
Tabelle 5: Validierung der in-house-Database	55
Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Mittelwerte, der Identifikationsraten und LSVs nach Abgleich der Proteinspektren mit der Bruker Database in Kombination mit der in-house-Database und den jeweiligen MSPs der Parasitenproben.	56
Tabelle 7: Sequenzierungsergebnisse der Parasitenproben.....	60
Tabelle 8: Probeninhalt des Projekts.	63
Tabelle 9: Identifikationsrate, LSV-Mittelwerte und bester Identifikationsorganismus.....	67

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
a.u.	Arbitrary units
AICc	Akaike-Information-Criterion corrected
AL	Lysis Buffer
ATL	Atl Tissue Lysis
AW	Elution Buffer
AW1	Wash Buffer 1
AW2	Wash Buffer 2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BTS	Bacterial Test Standard
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxycarbonsäure
cm	Zentimeter
COB	Cytochrome-b
COX1	Cytochrome-c-suboxidase 1
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale DNA
E.-Value	Expected value
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
h	Stunde
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz

IMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
ITS	Internal transcribed spacer
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
LC-MS	Liquid-chromatography-mass spectrometry
LSV	Log Score Value
m/z	Mass-charge ratio
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight
ML	Maximum Likelihood
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m	Meter
MM	Master Mix
MS	Mass spectrometry
ms	Millisekunde
MSP	Main Spectra Profile
MTP	Magnetische Trennplatte
NaCl	Natriumchlorid
Nad5	NADH dehydrogenase subunit 5
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCC	Neurozystizerkose
ns	Nanosekunde
NTD	Neglected Tropical Diseases
PAIR	Punktion, Aspiration, Injektion und erneute Aspiration

PC	Principal components
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Per. Ident	Percent Identity
RPM	Rounds per minute
SLS	Sample loading solution
spp.	Subspezies
Swiss TPH	Swiss Tropical and Public Health Institute
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
V	Volt
μl	Mikroliter
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Fassung

Einleitung: Humane Infektionen mit dem Schweinebandwurm *Taenia saginata* können eine intestinale Taeniasis auslösen, die von asymptomatischer Trägerschaft bis zu schwerwiegenden gastrointestinalen Symptomen führen kann. Die Infektion mit *T. saginata* ist vor allem in Ländern des globalen Südens mit schlechten sanitären Verhältnissen von Bedeutung. Die Diagnostik erfolgt primär über den Nachweis von *Taenia*-Eiern in Stuhlproben. Problematisch bei der Taeniasis ist die speziesspezifische Diagnostik, insbesondere die Differenzierung zwischen den morphologisch identischen Eiern der beiden Arten *T. saginata* und *Taenia solium*, da die durch den Rinderbandwurm *T. solium* ausgelöste Erkrankung Zystizerkose lebensbedrohlich sein kann und spezifisch therapiert werden muss. In dieser Arbeit wurde die mögliche Identifizierung von *T. saginata* aus humanen Stuhlproben mittels matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS) untersucht. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem mittels Laserbeschuss Proteine aus einer zu untersuchenden Probe gelöst werden, um anschließend anhand ihrer Größe und Fluggeschwindigkeit aufgetrennt und mittels eines Organismus-spezifischen Proteinspektrumprofils identifiziert zu werden. Diese Technik wird im mikrobiologischen Labor standardmäßig zur Identifikation von Bakterien und Pilzen angewendet, hat jedoch bisher kaum Anwendung zur Diagnostik von Parasiten gefunden

Material und Methoden: Die Versuchsreihe wurde an acht in 0,45% Natriumchlorid gelagerten Proben durchgeführt, wobei es sich bei sechs Proben um *T. saginata* Proglottiden und bei zwei Proben um *T. saginata* Eier handelte. Es wurde ein *in domo* etabliertes Protokoll genutzt, die *T. saginata* Proben wurden umfangreich massenspektrometrisch analysiert und einer bestehenden in-house-database zur massenspektrometrischen Identifikation pathogenspezifischer Proteinspektren hinzugefügt. Es wurde eine externe Validierung durchgeführt, bei welcher die jeweils übrigen Proteinspektren der *T. saginata* Proben mit der in-house-database verglichen wurden. Die Genauigkeit der MALDI-TOF MS-basierten Identifizierung wurde mittels eines log score values (LSV) angegeben, der die Ähnlichkeit der Proteinspektren quantifiziert. Ein LSV zwischen 2,29-2,0 zeigt eine sichere Identifikation auf Speziesebene an, LSVs zwischen 1,7-1,9 hingegen zeigen eine sichere Identifikation auf Gattungsebene an. Ein LSV <1,7 spricht für eine unzureichend genaue Identifikation.

Die Spezieszugehörigkeit aller Proben wurde molekulargenetisch mittels Sequenzierung des *cox-1* Gens überprüft und phylogenetisch untersucht. Weiterführend wurde der Einfluss verschiedener Probenlagerungsmedien über einen Zeitraum von 24 Wochen auf die massenspektrometrische Identifikationsrate untersucht.

Ergebnisse: Alle acht Proben der Versuchsreihe wurden mittels Sequenzierung als *T. saginata* identifiziert, es wurde auch eine phylogenetische Clusterung beobachtet. Nach Einfügen aller Proben in die konzipierte in-house-database konnten insgesamt sechs der acht untersuchten *T. saginata* Proben (75%) mindestens auf Gattungsebene verlässlich identifiziert und so von anderen Organismen differenziert werden. In drei Fällen konnte dabei auch eine speziesspezifische Identifikation erreicht werden. Zwei Proben wiesen jedoch keine Ähnlichkeiten mit der Referenzdatenbank.

Die Identifikation von *T. saginata* konnte in den Probenlagerungsmedien 0,45% Natriumchlorid, 70% Ethanol sowie in Wasser von LC-MS Qualität gleichermaßen valide auch über einen Lagerungszeitraum von 24 Wochen durchgeführt werden. Lediglich für das Lagerungsmedium Formalin (37%) konnten keinerlei Proteinspektren generiert werden.

Diskussion: Mittels MALDI-TOF MS kann eine Identifizierung von *T. saginata* auf Gattungsebene durchgeführt werden, jedoch bedarf die Methodik noch weiterer Optimierung hinsichtlich einer Standardisierung der Arbeitsprotokolle und Lagerungsbedingungen sowie weiterführender Untersuchungen mit einem vergrößerten Probenpool inklusive weiterer *Taenia* Arten unterschiedlichen geographischen Ursprungs, insbesondere *T. solium*. Ein weiterer Fokus sollte auf die Erweiterung der Referenzdatenbank gelegt werden, deren Qualität einen maßgeblichen Einfluss auf die massenspektrometrische Identifikationsgenauigkeit zeigt. Als Lagerungsmedien können 0,45% Natriumchlorid, 70% Ethanol sowie Wasser in LC-MS-Qualität gleichermaßen erfolgreich genutzt werden.

1.2. Abstract

Introduction: Human infections with the tapeworm *Taenia saginata* can cause intestinal taeniasis, ranging from asymptomatic carriage to rare severe gastrointestinal symptoms. Taeniasis is mainly important in developing countries with poor sanitation standards but is increasingly becoming more significant to the Western world due to increasing globalization and migration. Diagnosis is primarily based on the detection of *Taenia* eggs in stool samples. Problematic with taeniasis is the species-specific diagnosis, especially the differentiation between the morphologically identical eggs of the two species *T. saginata* and *Taenia solium*, since cysticercosis caused by *T. solium* can be potentially life-threatening and accordingly requires increased attention including contact screening. In this work, we investigated the potential identification of *T. saginata* from human stool samples using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). This technique uses laser bombardment to dislodge proteins, which are separated based on their size and flight speed, allowing them to be identified using an organism-specific protein spectrum profile. The technique is standardly used in diagnostic laboratories for the identification of bacteria and fungi but has little application to the diagnosis of parasites.

Material and Methods: Six samples of *T. saginata* proglottids and two samples of *T. saginata* eggs, stored in sodium chloride 0,45%, were provided from our laboratory and from international partner laboratories. A before established protocol was used for sample processing. The *T. saginata* samples were analyzed by mass spectrometry and added to the existing in-house-database. An external validation was performed, in which the remaining protein spectra of the *T. saginata* samples were compared with the in-house-database.

The accuracy of MALDI-TOF MS-based identification is indicated by a log score value (LSV), which quantifies the similarity of protein spectra. An LSV between 2.29-2.0 indicates confident identification at the species level, LSVs between 1.7-1.9 indicate confident identification at the genus level, and an LSV <1.7 indicates no confident identification.

All samples were validated molecularly by sequencing of the *cox-1* gene and further statistically analyzed looking for similarity in protein spectrum profiles and phylogenetic similarity of sequencing results. Further, the influence of different sample storage media over a period of 24 weeks on mass spectrometric identification was investigated.

Results: All eight samples of the experimental series were correctly identified as *T. saginata* by sequencing, a phylogenetic clustering was also observed. After inserting all samples into the designed in-house database, six of the eight *T. saginata* samples could be reliably identified at least at the genus level and thus differentiated from other organisms. This corresponds to a

percentage of 75%. In three cases, a species-specific identification could also be achieved. However, two samples did not show similarities with the reference database.

No differences for the validation of *T. saginata* were detectable when the samples were stored in sodium chloride 0,45%, ethanol 70% or water with LC-MS quality for 24 weeks. For the storage media formalin 37% no protein spectra could be identified.

Discussion: The use of MALDI-TOF MS as an identification tool for *T. saginata* was successful but the methodology needs further optimization regarding standardization of the working protocols and storage conditions as well as further investigations with an enlarged sample set with larger geographic variety and different species such as *T. solium*. Another focus should be the extension of the reference database, whose size shows a significant influence on mass spectrometric identification quality. Sodium chloride 0.45%, ethanol 70% as well as water in LC-MS quality can be used equally for subsequent MALDI-TOF MS analysis.

2. Einleitung

2.1. Helminthen-Infektionen als wichtige neglected tropical diseases (NTDs)

2.1.1. Neglected tropical diseases (NTDs)

Neglected Tropical Diseases (NTDs; deutsch: vernachlässigte Tropenkrankheiten) bezeichnen eine Gruppe von meist chronisch verlaufenden Erkrankungen, von denen vor allem sehr arme Menschen aus abgelegenen ländlichen oder benachteiligten städtischen Gebieten tropischer und subtropischer Länder betroffen sind (Utzinger et al., 2012).

Die meisten Erkrankten leben in schlechten sanitären Verhältnissen, ernähren sich unzureichend und haben keinen Zugang zu den für die Behandlung notwendigen öffentlichen Gesundheits- und Pflegesystemen (Mackey et al., 2014). Der Begriff der NTDs entwickelte sich im Laufe der frühen 2000er Jahre und wurde erstmals 2005 international als Erkrankungskomplex angesehen. Seitdem wird kontinuierlich durch die WHO und internationale Gesundheitspolitik an den vernachlässigten Erkrankungen gearbeitet, 2007 wurde das open-access-Journal „PLOS Neglected Tropical Diseases“ gegründet, welches auch der Forschung in diesem Bereich ein zusätzliches Forum bietet (Hotez et al., 2020). Im Jahr 2020 zählte die WHO 20 Krankheiten zu den NTDs, hierzu zählen unter anderem parasitäre Erkrankungen wie die Filariose, die Onchozerkose oder die Bilharziose, bakterielle Krankheiten wie das Trachom, aber auch virale oder durch Pilze hervorgerufene Erkrankungen (Hotez et al., 2020). Es wird geschätzt, dass praktisch alle Personen, die unter der Armutsgrenze von ca. 2 US-Dollar pro Tag leben, an mindestens einer der 20 NTDs erkrankt sind. Dies entspricht ungefähr 10% der gesamten Weltbevölkerung (Hotez et al., 2020; *Worldbank*, n.d.). Es wird immer mehr hervorgehoben, dass die NTDs die Gesundheit der Armen nicht nur genauso bedrohen wie die drei großen Erkrankungen HIV/AIDS, Tuberkulose oder Malaria, sondern - was noch wichtiger ist - dass es wirksame Behandlungs- und Präventionsstrategien gibt, die für weniger als 1 US-Dollar pro Kopf und Jahr angeboten werden könnten (Hotez et al., 2006). Die Bemühungen der Gesellschaft zum Schutz vor NTDs waren bislang unzureichend (Mackey et al., 2014), es fehlt weiterhin an internationalem Interesse und Investitionen. Von der wissenschaftlichen Forschung sowie öffentlichen/privaten Finanzierung wird diese Erkrankungsgruppe im Vergleich zum Ausmaß des Gesundheitsproblems relativ vernachlässigt (Casulli, 2021).

NTDs werden mit negativen Auswirkungen auf den Verlauf und das Ergebnis von Schwangerschaften, einer verzögerten körperlichen und geistigen Entwicklung in der Kindheit, einer verminderten Arbeitsproduktivität im Alter sowie gesellschaftlicher Stigmatisierung in

Verbindung gebracht. Aufgrund dieser Auswirkungen auf das Leben der Erkrankten wird die Armut meist noch weiter gefördert (Utzinger et al., 2012).

Das klinische Bild der NTDs ist vielfältig und variabel. Es können praktisch alle Organe betroffen sein. Das Spektrum der möglichen klinischen Erscheinungen reicht von asymptomatischen Infektionen bis hin zu lebensbedrohlichen oder chronisch schwächenden Zuständen (Utzinger et al., 2012) und ist individuell vom jeweiligen Pathogen abhängig.

In den letzten Jahren wurden Aufklärungsprojekte über die einzelnen NTDs in den betroffenen Ländern zunehmend gefördert sowie einige Erkrankungen (z.B. Wurminfektionen) durch die regelmäßige Behandlung ganzer Bevölkerungsgruppen (vor allem Schulkinder) in Endemiegebieten hinsichtlich der Morbidität zunehmend gut kontrolliert.

Im Jahr 2021 zelebrierte die WHO ihren zweiten internationalen Tag der NTDs und formte hier einen Aktionsplan, der die globalen Ziele zur Kontrolle und Beseitigung verschiedener vernachlässigter Tropenkrankheiten und Krankheitsgruppen bis 2030 länderübergreifend bündelt (World-Health-Organization, 2022).

2.1.2. Einteilung der NTDs und Helminthen

Aktuell bestehen die NTDs aus einer Vielzahl von Erkrankungen. Es lassen sich hauptsächlich virale, protozoische, helminthische und bakterielle Pathogene unterscheiden. Viele NTDs sind auch zoonotisch und/oder werden durch Vektoren übertragen (Mackey et al., 2014). Eine grobe Unterteilung der NTDs mitsamt der wichtigsten Erreger lassen sich der **Abbildung 1** entnehmen. Die WHO konzentriert sich derzeit auf eine Gruppe von 20 Erkrankungen. *PLOS Neglected Tropical Diseases* hat diese Liste erheblich erweitert, um zusätzliche Krankheiten oder Zustände mit chronischen und/oder schwächenden Merkmalen aufzunehmen (Casulli, 2021)

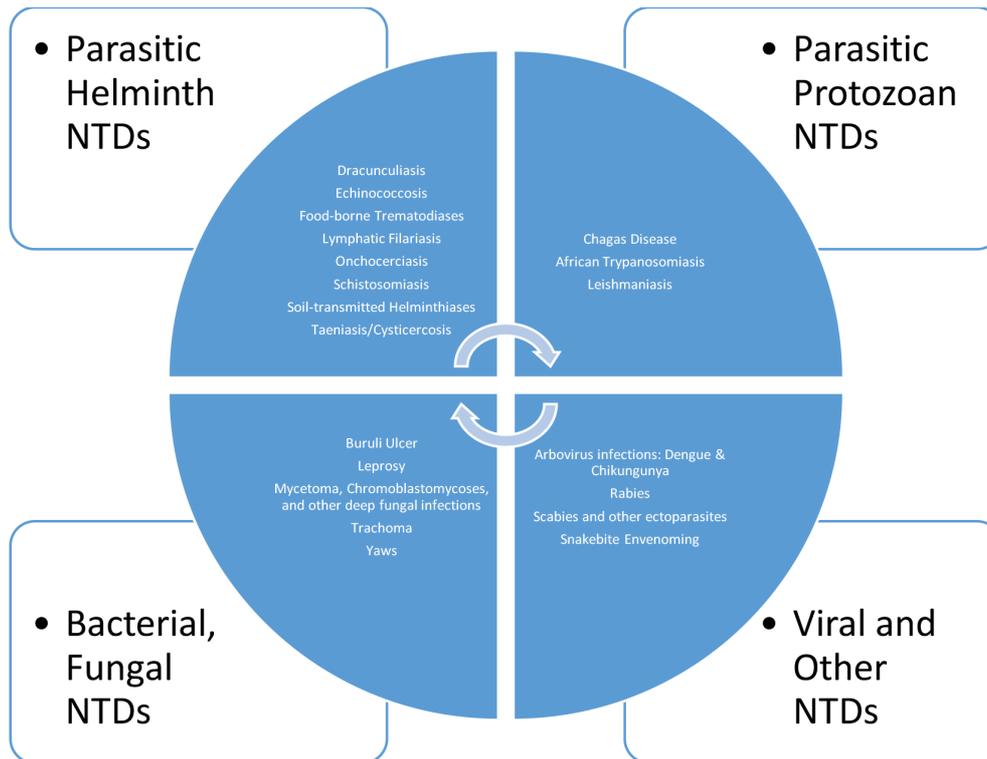


Abbildung 1: WHO's Liste der 20 wichtigsten NTDs. Die Pathogene der NTDs lassen sich in 4 Subgruppen unterteilen: Würmer, Protozoen, Bakterien/Pilze, Viren und Andere (*World-Health-Organization, assessed November 30, 2019*). Den Großteil der NTDs machen die Helminthen aus.

Helminthen gelten mit circa 2 Milliarden infizierten Menschen weltweit als die wichtigsten Erreger der NTDs. Studien zeigen, dass 85% der NTDs in Sub-Sahara-Afrika auf Helmintheninfektionen zurückführbar sind, dies entspricht ca. 550 Millionen erkrankten Menschen (Hotez & Kamath, 2009). Von diesen parasitären Wurminfektionen sind vor allem Kinder im Schulalter überproportional betroffen (Hotez & Kamath, 2009). Als wichtiger Erkrankungskomplex der humanpathogenen Würmer werden die bodenübertragenen Helminthen, die *soil-transmitted-helminths* (STH), angesehen. Bei den bodenübertragenen Helminthen handelt es sich um eine Gruppe von parasitären Fadenwürmern (Nematoden), die den Menschen durch Kontakt mit Parasiteneiern oder -larven aus warmen oder feuchten Böden der tropischen und subtropischen Ländern infizieren (Bethony et al., 2006). Als erwachsene Würmer leben die bodenübertragenen Helminthen jahrelang im menschlichen Magen-Darm-Trakt (Vercruyssen et al., 2012). Von besonderer weltweiter Bedeutung sind die Spulwürmer (*Ascaris lumbricoides*), Peitschenwürmer (*Trichuris trichiura*) und Hakenwürmer (*Necator americanus* oder *Ancylostoma duodenale*) (Bethony et al., 2006).

Die humanpathogenen Helminthen lassen sich weiterführend systematisch anhand ihrer Anheftungsstrukturen in die zwei Hauptstämme Nematoden (Fadenwürmer) und

Platyhelminthen (Plattwürmer, auch Neoderma genannt) unterscheiden. Letztere lassen sich weiter unterteilen in Trematoden (Saugwürmer) und Cestoden (Bandwürmer) (Brindley et al., 2009).

Die Nematoden werden wegen ihrer Größe und ihres zylindrischen Körpers auch als Rundwürmer bezeichnet. Die häufigsten Helminthen dieser Gruppe verursachen Darminfektionen, obwohl auch Infektionen von Gewebe und Blut auftreten können (Melter & Castelhana, 2019). Wichtige Erreger sind zum Beispiel *Ascaris* (Spulwürmer), *Oxyuren* (Madenwürmer), *Ancylostoma duodenale* (Hakenwürmer), *Strongyloides stercoralis* (Zwergfadenwurm) oder *Filarien*.

Trematoden sind mit Saugnäpfen ausgestattet, mit denen sie sich an der Oberfläche von Körpern oder inneren Organen des Wirtsorganismus festhalten. *Schistosoma (mansoni, haematobium, japonicum)* sowie Leberegel (*Fasciola hepaticum*) sind wichtige relevante humanpathogene Exemplare (Melter & Castelhana, 2019), die verschiedene Krankheitsbilder auslösen können.

Das Hauptmerkmal der Cestoden ist ein abgeflachter Körper, bestehend aus Kopf und Scolex sowie zahlreichen Proglottiden oder Segmenten (Garcia et al., 2015). Vier Arten von Bandwürmern bewohnen den menschlichen Darm und sind medizinisch als Erreger von chronischen Darminfektionen bedeutend: *Diphyllobothrium latum* (Fischbandwurm), *Taenia saginata* (Rinderbandwurm), *Taenia solium* (Schweinebandwurm) und *Hymenolepis nana* (Zwergbandwurm). Sie unterscheiden sich stark in Größe, Zwischenwirt und Pathogenität (Garcia et al., 2015; Melter & Castelhana, 2019).

Im Folgenden wird vor allem auf die in unserem Projekt untersuchten Bandwürmer, *Taenia saginata*, eingegangen.

2.2. *Taenia saginata*

2.2.1. Vorkommen und Verbreitung

Taenia saginata ist ein zoonotischer Parasit aus der Gruppe der Cestoden (Bandwürmer), der Taeniasis beim Menschen und Zystizerkose bei Rindern verursachen kann (Bucur et al., 2019). Neben *T. saginata*, auch Rinderbandwurm genannt, gehören *Taenia solium* (Schweinebandwurm) und *Taenia asiatica* (asiatischer Bandwurm) zu den humanpathogenen Mitgliedern der Familie *Taeniidae* (Murrell et al., 2005; Okello & Thomas, 2017). Der Mensch ist der einzige Endwirt von *T. saginata*, während Rinder dem Parasiten als Zwischenwirte

dienen. Endwirte definieren sich über die Möglichkeit der Geschlechtsreife des jeweiligen Parasiten, wohingegen Zwischenwirte nur einen bestimmten Zeitabschnitt besiedelt werden (Melter & Castelhana, 2019).

T. saginata zeigt eine globale Verbreitung und wird für erhebliche wirtschaftliche Verluste insbesondere im Fleischsektor verantwortlich gemacht (Symeonidou et al., 2018). Der Bandwurm ist sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern zu finden, wobei sich eine vermehrte Ausbreitung in Ländern zeigt, die keine angemessene sanitäre Infrastruktur aufweisen. Dementsprechend liegen die Gebiete mit der höchsten Prävalenz (bis zu 27%) in Zentralasien, im Nahen Osten sowie in Zentral- und Ostafrika. Gebiete mit geringerer Prävalenz (<1%) finden sich in Europa, Südostasien, Mittelamerika und Südamerika (King & Fairley, 2015). 2007 schätzten Craig und Ito die mit Taeniasis infizierte Bevölkerung auf bis zu 60-70 Millionen weltweit (Craig & Ito, 2007). Neuere Studien zeigen die Verbreitung von *T. saginata* Infektionen über alle Kontinente hinweg mit jeweils kleinen lokalen Unterschieden. Taeniasis Fälle sind gemeldet und untersucht worden im asiatischen Raum (Eichenberger et al., 2020; Torgerson et al., 2019), auf dem amerikanischen Kontinent (Braae et al., 2018), in Afrika (Dermauw et al., 2018; Saratsis et al., 2019) und im europäischen Raum (Laranjo González et al., 2017). Da die Taeniasis eine nicht meldepflichtige Erkrankung ist und häufig klinisch kein starkes Krankheitsbild auslöst, ist die Einschätzung der tatsächlichen Ausbreitung schwierig. Des Weiteren fehlen ausreichende Datensammlungen und hinreichende Studien zur aktuellen Taeniasis-Epidemiologie und die Forderung nach einer internationalen Strategie, um die Bevölkerung vor einer *Taenia* Infektion zu schützen, ist groß (Hendrickx et al., 2019).

T. solium Taeniasis und Zystizerkose zeigt sich vor allem in Entwicklungsländern endemisch, in denen Schweine als Nahrungsquelle gezüchtet werden. Hierzu gehören Lateinamerika, ein Großteil Asiens, Afrika südlich der Sahara und Teile Ozeaniens. Epidemiologische Studien schätzen die Verbreitung auf bis zu 5-6 Millionen Fälle weltweit (Flisser et al., 2011). Die Infektion wird nun auch zunehmend in Industrieländern aufgrund der Einwanderung der Bandwurmträger aus Endemiegebieten diagnostiziert (Flisser et al., 2004; Garcia et al., 2015; Héctor H. García et al., 2003).

T. asiatica findet sich vor allem im asiatischem Raum, die Epidemiologie ist allerdings nicht klar nachvollziehbar, da *T. asiatica* oft fälschlicherweise als *T. saginata* identifiziert wird (Flisser et al., 2011).

2.2.2. Morphologie und Lebenszyklus

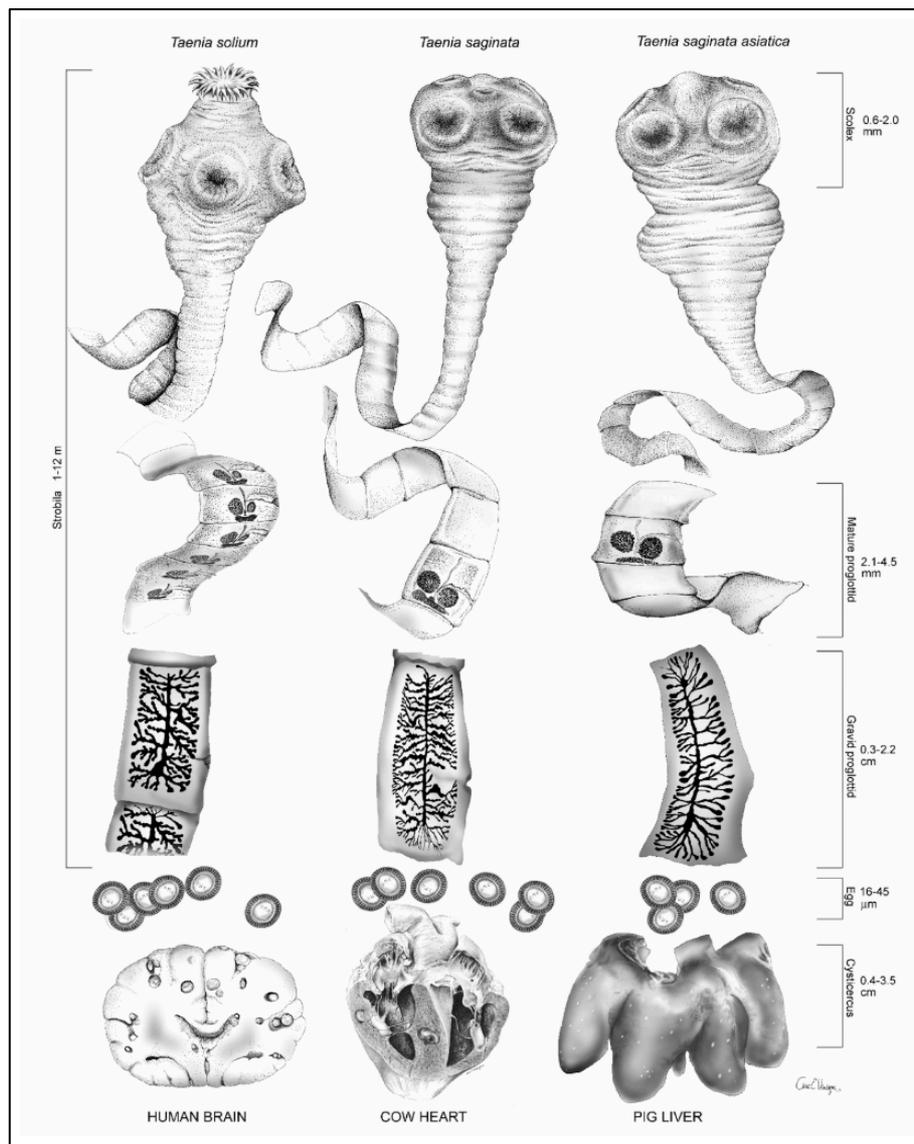


Abbildung 2: Morphologie der drei humanpathogenen *Taenia* (Flisser et al., 2004; Murrell et al., 2005). Die Unterschiede der Bandwürmer lassen sich vor allem an den unterschiedlich ausgeprägten Saugnäpfen der Scolex, sowie der Genitalporen bemerken.

T. saginata als der häufigste und am weitesten verbreitete humanpathogene Vertreter der *Taenia* Familie wird im Durchschnitt 2-5 m lang und kann bis zu 2000 Proglottiden beinhalten (Craig & Ito, 2007). *T. saginata* weist am Scolex, dem Vorderende des Bandwurmes, welches zum Anheften an die Darmwand dient, vier unbestückte Saugnäpfe auf. *T. solium* ist zusätzlich mit Haken an den Saugnäpfen und *T. asiatica* mit rudimentären Häkchen ausgestattet (Murrell et al., 2005). Bei näherer Betrachtung zeigt sich die Gliederung der Bandwürmer in einzelne, segmentähnliche Proglottiden. Die Proglottiden können, meist durch Selbstbefruchtung, bis zu 80 000 Eier enthalten und diese intermittierend ausscheiden (Dorny & Praet, 2007). Die Eier

der humanpathogenen *Taenia* sind kugelförmig und ungefähr 20 bis 50 µm groß. Licht- und elektronenmikroskopisch sind die Eier der verschiedenen *Taenia* Arten nicht auseinanderzuhalten (Murrell et al., 2005).

Die *Taenia* Eier und Proglottiden gelangen über menschliche Fäkalien in die Umwelt und können dort von Schweinen (*T. solium*) oder Rindern (*T. saginata*) über die Nahrung aufgenommen werden (vergleiche Lebenszyklus *Taenia* **Abbildung 3**). Die Eier können in der Umwelt mehrere Monate überleben. Im Darm der Tiere schlüpfen dann die *Onkosphären*, das erste Larvenstadium der *Taenia*. Als Larven können die *Taenien* in die Darmwand eindringen (U.S. Department of Health & Human Services, 2013). Vom Darm aus penetrieren die Larven die Muskulatur und entwickeln sich im Skelett- oder Herzmuskel, seltener im Fettgewebe oder Viszeralorganen zu Zystizerken, dem Finnenstadium der Bandwürmer. Die Zystizerken werden nach circa zehn Wochen infektiös für den Menschen. Ein Großteil der Finnen stirbt innerhalb von neun Monaten in der tierischen Muskulatur ab oder verkalkt (Murrell et al., 2005). Der Mensch kann sich dann durch Verzehr des kontaminierten Schweine- oder Rindfleischs mit Taeniasis infizieren. Dies passiert häufig durch Aufnahme von rohem oder nicht ausreichend gegartem Fleisch. Im Dünndarm des Menschen entwickeln sich die *Taenia* Larven innerhalb von ungefähr drei Monaten zu geschlechtsreifen Bandwürmern. Ein geschlechtsreifer Bandwurm kann gravide Proglottiden produzieren, die beweglich sind und entweder spontan aus dem Anus des Wirtes wandern oder mit dem Kot ausgeschieden werden. Im Endwirt (Mensch) können die Bandwürmer teilweise jahrelang überleben (Dorny & Praet, 2007).

Bei der Art *T. solium* kann der Mensch sich zusätzlich durch versehentliche Aufnahme der Eier dieses Parasiten (fäkal-oraler Weg) infizieren, welches dem Infektionsmodus der Zwischenwirte ähnlich ist. Dies kann zur Ausbildung von Zystizerken im Nervensystem, im Auge, im Herzmuskel oder auch im subkutanen Gewebe führen. Die Ausbildung von Zystizerken im zentralen Nervensystem stellt ein bedrohliches Krankheitsbild, die Neurozystizerkose, dar. Diese ist für etwa 50.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich und gilt derzeit als die häufigste Ursache für erworbene Epilepsie in Entwicklungsländern (Hoberg, 2006; Symeonidou et al., 2018).

T. asiatica entwickelt sich überwiegend in den viszeralen Organen von Schweinen, wobei auch Rinderlebern leicht infiziert werden können. Menschen infizieren sich ähnlich wie bei *T. saginata* durch den Verzehr von rohem Fleisch oder Eingeweiden, woraufhin sich das adulte Stadium des Parasiten im Menschen entwickelt (Murrell et al., 2005).

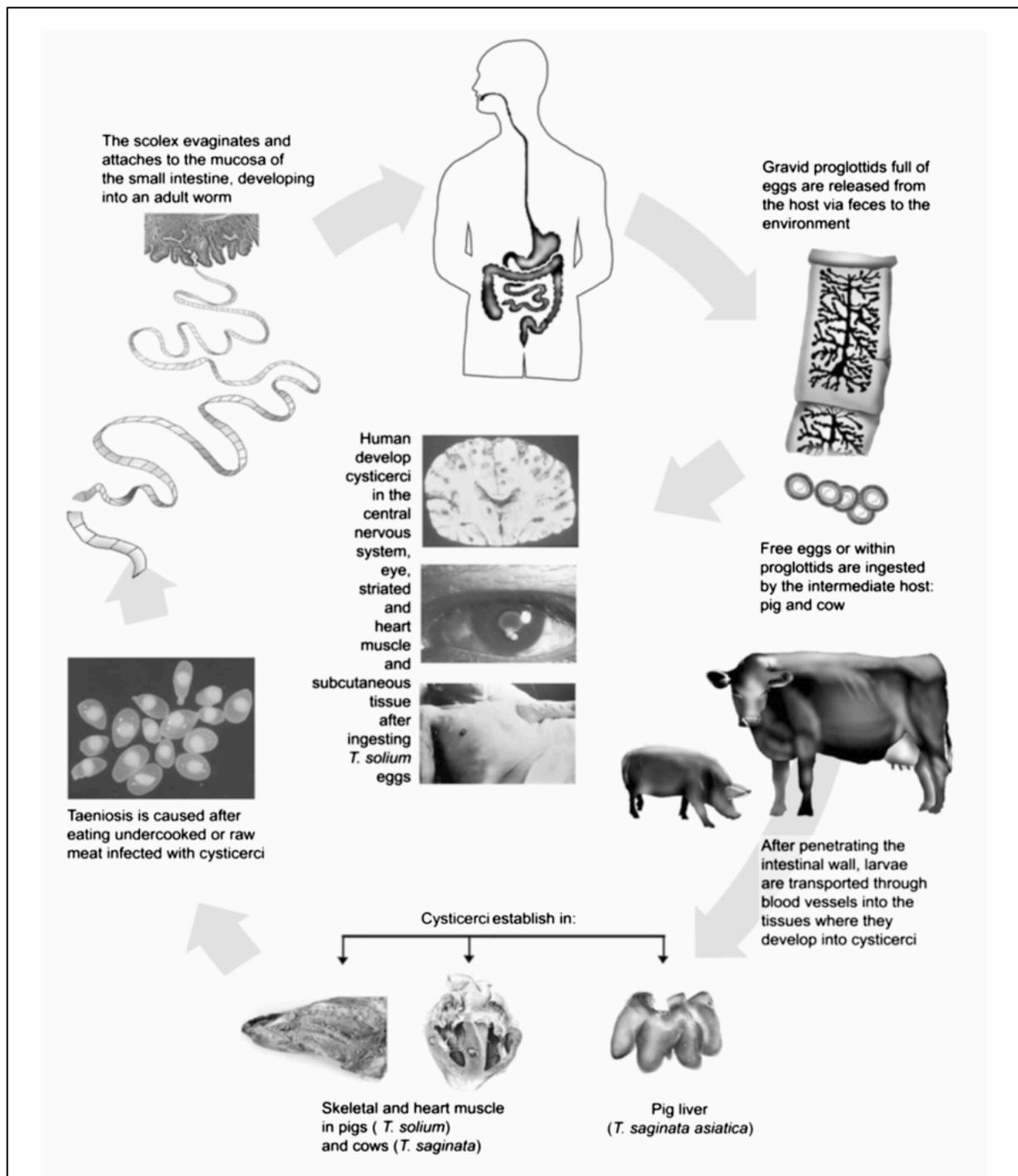


Abbildung 3: Lebenszyklus *Taenia* (Murrell et al., 2005). Menschen infizieren sich mit Taeniasis durch den Verzehr von nicht ausreichend gekochtem Fleisch. Im menschlichen Darm entwickeln sich die Parasiten zu reifen Bandwürmern, dessen infektiöse Eier über den Stuhl ausgeschieden werden. Zwischenwirte wie Rinder oder Kühe infizieren sich durch die Aufnahme von durch Eier kontaminiertem Futter. Im Skelettmuskel, seltener Leber oder Herz der Tiere, entwickeln sich die Eier zu infektiösen Zystizerken. Bei einer Infektion mit *T. solium* können sich im menschlichen Gehirn die Parasiten zu Zystizerken entwickeln und hier die potentiell lebensbedrohliche Neurozystizerkose auslösen.

2.2.3. Klinische und wirtschaftliche Bedeutung

Mit *T. saginata* infizierte Menschen sind für gewöhnlich asymptomatisch (Melter & Castelhana, 2019). Das häufigste klinische Symptom der Taeniasis ist der spürbare Abgang von bewegungsfähigen Proglottiden. Dies zeigt sich z.B. mit einem charakteristisch kribbelndem Gefühl im Rektum und der perianalen Region (Flisser et al., 2011). Außerdem können Proglottiden oder seltener auch ausgewachsene Bandwürmer in Unterwäsche oder im Stuhl gefunden werden (Garcia et al., 2015). Die ausgewachsenen Bandwürmer können zudem Abdominalbeschwerden, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme und Kopfschmerzen verursachen (Flisser et al., 2011). In selteneren Fällen können die *Taenia* Bandwürmer aufgrund ihrer Größe auch zu Darmverschlüssen (mechanischer Ileus) führen (Craig & Ito, 2007). Ferner wurde auch von *T. saginata* ausgelöster Gallenblasenperforation (Hakeem et al., 2012), akuter Cholangitis (Bayramiçli et al., 2012) und akuter Appendizitis (Sharifdini et al., 2021) berichtet. Zusammenfassend werden *T. saginata* Infektionen aufgrund ihrer vermeintlichen Harmlosigkeit häufig nicht erkannt und die Bandwürmer können mehrere Jahre unentdeckt im Darm ihres Endwirtes überleben.

Eine Aufnahme der Zystizerken von *T. solium* oder *T. asiatica* kann auch zur Ausbildung einer intestinalen Taeniasis führen und die oben genannten gastrointestinalen Symptome auslösen. Wenn allerdings Eier von *T. solium* mit der Nahrung aufgenommen werden, können diese sich im Gehirn und anderen Organen ablagern und zur Neurozystizerkose (NCC) führen. Die klinische Manifestation der NCC ist sehr heterogen und ist einerseits abhängig von der Lokalisation, Anzahl und dem Entwicklungsstadium der Zysten und andererseits von der Immunantwort des Wirts (Flisser et al., 2011). Die NCC manifestiert sich in den Endemiegebieten von *T. solium* am häufigsten als Epilepsie - bei circa einem Viertel aller epileptisch erkrankten Patienten in Endemiegebieten konnte eine Infektion mit *T. solium* nachgewiesen werden (Ndimubanzi et al., 2010). Zu den weiteren Krankheitssymptomen einer NCC zählen fokale-neurologische Defizite, erhöhter Hirndruck und kognitiver Abbau (Garcia et al., 2014). Der hohe Satz an Zystizerkose-bedingter neurologischer Erkrankungen wie beispielweise Epilepsie führt zu einer hohen globalen Belastung mit enormen wirtschaftlichen Ausgaben (Torgerson & Macpherson, 2011).

Abgesehen von der medizinischen Erkrankung, die durch *Taenia* ausgelöst wird, muss das Vorkommen von Zystizerken in den spezifischen Zwischenwirten außerdem aus wirtschaftlicher Sicht betrachtet werden: Für die Fleischindustrie ist *T. saginata* von großer Bedeutung, da es hier aufgrund infizierter Nutztiere wie Kühe oder Schweine und dessen notwendiger Verwerfung im Verarbeitungsprozess zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten

kommen kann (Symeonidou et al., 2018). Durch die Notwendigkeit von ausführlichen Fleischinspektionen mit der Suche nach infizierten Rindern steigen die jährlichen *T. saginata* bedingten Kosten stetig an. Mehrere Studien im veterinärmedizinischen Bereich untersuchten die jeweils nationale wirtschaftliche Belastung mit den Resultaten von Ausgaben in Höhe von beispielsweise 437.730 € im Jahr 2016 in Frankreich und 3.579.335 € pro Jahr in Belgien (Laranjo-González et al., 2018).

2.2.4. Diagnostik

Für die Diagnostik der Taeniasis steht aktuell kein ausreichend sensitiver Referenzstandard zur Verfügung. Im klinischen Alltag wird am häufigsten die direkte Stuhlmikroskopie zum Nachweis von *Taenia*-Eiern oder Proglottiden verwendet (Mwape & Gabriël, 2014). Zu den weiteren verfügbaren Diagnosemethoden gehören die Kato-Katz-Technik, Kopro-Antigen-ELISAs, Immunoblots sowie molekulare Tests wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Sequenzierung (Allan & Craig, 2006; González et al., 2000; Ito & Craig, 2003). Die molekularen Nachweismethoden zeigen eine hohe Spezifität und Sensitivität und haben außerdem den Vorteil, eine genaue Speziesidentifikation zu gewährleisten. So kann mithilfe der Multiplex-PCR im Gegensatz zu den mikroskopischen oder immunologischen Verfahren eine genaue Unterscheidung zwischen *T. saginata*, *T. asiatica* und *T. solium* durchgeführt werden (Ng-Nguyen et al., 2017). Aufgrund des sehr unterschiedlichen Krankheitspotentials der *Taenia* Spezies ist ihre genaue Identifikation essentiell für die Therapie und Eindämmung der Parasitose (Symeonidou et al., 2018). Die wichtigsten diagnostischen Methoden werden nachfolgend genauer dargestellt.

2.2.4.1. Direkte Stuhlmikroskopie

Die direkte Stuhlmikroskopie ist in der mikrobiologischen Routine weit verbreitet und einfach sowie kostengünstig durchzuführen. Die vorhandene Stuhlprobe wird auf einen Objektträger ausgestrichen und mit jeweils einem Tropfen Kochsalz und einem Tropfen Lugolscher Lösung versetzt. Dann wird der Tropfen mit einem Deckglas bedeckt und kann lichtmikroskopisch untersucht werden. Hier können bei infektiösen Patienten Wurmeier oder Proglottiden nachgewiesen werden.

Die diagnostische Sensitivität dieses Verfahrens ist jedoch eingeschränkt, da infizierte Patienten die Wurmeier und Proglottiden nur intermittierend ausscheiden (Mwape & Gabriël, 2014). Außerdem zeigt sich eine eingeschränkte Spezifität - eine morphologische

Unterscheidung der Wurmeier der unterschiedlichen *Taenia* Spezies ist nicht möglich. Theoretisch lassen sich die Proglottiden und adulten Würmer auf Spezieslevel anhand des Scolex und der Anzahl der Uteruszweige unterscheiden, allerdings ist diese Identifikation oft nach Therapiebeginn und therapiebedingtem Zerfall des Wurmkopfes nicht mehr möglich (Murrell et al., 2005). Des Weiteren fehlen standardisierte Protokolle zur direkten Mikroskopie und die Diagnose ist stark vom Untersucher und dessen Erfahrung abhängig (Okello & Thomas, 2017). In der klinischen Routine wird die direkte Stuhlmikroskopie meist in Kombination mit den klinischen Symptomen und einer ausführlichen Anamnese genutzt, um so anhand epidemiologischer Daten und Erfahrungen die Spezies abschätzen zu können.



Abbildung 4: A) *T. saginata* Eier in Stuhlmikroskopie (Craig & Ito, 2007), B) *T. saginata* einzelne geschlechtsreife Proglottide nach Injektion von Tusche in die Genitalpore zur Visualisierung der seitlichen Uteruszweige (Medical Care Development International & U.S. Health, 2010).

2.2.4.2. Kato-Katz-Methode und weitere Konzentrationstechniken

Eine weitere Diagnosemöglichkeit zur direkten Detektion von Parasiten ist die Kato-Katz-Technik, welche vor allem in der Diagnostik der durch Bodenkontakt übertragbaren Helminthen eine große Rolle spielt (Glinz et al., 2010; Knopp et al., 2008). Die Kato-Katz-Methode wird in der Diagnostik der Taeniasis aufgrund der leichten Durchführbarkeit jedoch ebenfalls genutzt. Hierbei wird eine definierte, geringe Menge der zu untersuchenden Stuhlprobe auf einen Objektträger gegeben und mit einem Farbstoff versetzt. Nach 40-60 Minuten Wartezeit kann die Probe lichtmikroskopisch untersucht werden. Diese Methode ist bei niedriger Wurmlast wenig sensitiv, kann aber als Screening-Test vor allen in den ärmeren Endemiegebieten eingesetzt werden (World-Health-Organization & National Centre for Parasitology (CNM), 2020).

Es gibt zusätzlich noch weitere Verfahren, um die Stuhlproben für eine nachfolgende lichtmikroskopische Untersuchung aufzuarbeiten. Hierzu zählen unter anderem die Ether-

Sedimentation und die Formalin-Ether-Konzentrations-Methode, bei welchen in vergleichenden Studien eine vergleichsweise hohe Sensitivität zum Nachweis einer Taeniasis besteht (Raoul et al., 2013).

2.2.4.3. Kopro-Antigen-ELISA

Um eine intestinale Taeniasis zu diagnostizieren, kann man sich auch das Vorkommen spezifischer Parasiten-Antigene im Stuhl zu Nutze machen. Man misst hier Stoffwechselprodukte der *Taenia* Bandwürmer, die als Antigene im Stuhl auch ohne die Anwesenheit von Eiern oder Proglottiden nachweisbar sind (Allan & Craig, 2006). Diese Kopro-Antigene sind frühestens zwei Wochen nach Infektion nachweisbar und verschwinden bei erfolgreicher Therapie mit Anthelminthika (Mwape & Gabriël, 2014). Man verwendet polyklonale Antikörper, die aus hyperimmunen Kaninchenseren gewonnen werden und kann so einen Sandwich-ELISA durchführen. Bei einem Sandwich-ELISA werden sogenannte *Capture-Antikörper* an die Mikroplatte gebunden und die zu untersuchende Probe mit den enthaltenen Antigenen wird hinzugegeben. Das zu messende Antigen bindet an den spezifischen *Capture-Antikörper*. Nach einem Auswaschschritt, um nicht gebundene Antigene zu entfernen, wird ein zweiter Detektionsantikörper hinzugegeben, an dem ein Enzym, welches einen Farbstoff spalten und somit aktivieren kann, gekoppelt ist. Der zweite Antikörper bindet an die bereits gebundenen Antigene und die Menge der gebundenen Teilchen kann photometrisch gemessen werden, indem der Farbstoff hinzugegeben wird.

Verglichen mit der direkten Stuhlmikroskopie zeigt die Kopro-Antigen-ELISA-Methode eine doppelt so hohe Sensitivität für die Diagnostik der Taeniasis, allerdings ist dieser Test nicht kommerziell verfügbar und wird daher in der Routine-Diagnostik außerhalb weniger Zentren nicht eingesetzt (Raoul et al., 2013). Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt darin, dass sie nur gattungsspezifisch ist, also eine Differenzierung zwischen *T. solium*, *T. saginata* und *T. asiatica* Infektionen nicht gewährleisten kann (Murrell et al., 2005) (Ng-Nguyen et al., 2017).

2.2.4.4. Immunoblots

Vor allem für die Diagnostik von *T. solium* und *T. asiatica* Infektionen werden auch immunologische Verfahren genutzt. Hier können *Taenia* Antikörper im Serum unter Verwendung exkretorisch-sekretorischer oder rekombinanter Antigene mit einer hohen Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden (Murrell et al., 2005; Wilkins et al., 1999). Mithilfe der Immunoblots, auch Immunassays genannt, werden Proteine aus dem Serum

infizierter Patienten, durch Übertragung (*Blotting*) auf eine Trägermembran nachgewiesen. Das Prinzip der Immunassays beruht auf einer räumlich getrennten Fixierung definierter Antigene (Trennung meist nach der Proteingröße), welche anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Für die Diagnostik der *T. saginata* Taeniasis spielen die Sero-Immunoblots eher eine untergeordnete Rolle, da hier häufig Kreuzreaktionen mit *Echinokokkus*-Antigenen anzutreffen sind. Aktuell wird an der Entwicklung spezifischer *T. saginata* Immunassays geforscht (Abuseir et al., 2013).

Die immunologischen Verfahren reizen mit dem Vorteil, dass vor allem zur Diagnose von *T. solium* Infektionen keine potenziellen Biogefährdung durch die Sammlung und Handhabung von Fäkalproben besteht und außerdem eine speziesspezifische Diagnostik ermöglicht wird (Ito & Craig, 2003; Mwape & Gabriël, 2014). Allerdings sind diese Verfahren relativ teuer und häufig vor allem in den endemischen Gebieten nicht verfügbar.

2.2.4.5. Molekularer Erregernachweis

In der Diagnostik parasitärer Infektionen nimmt die Bedeutung molekularer Nachweismethoden deutlich zu. Der am häufigsten verwendete Ansatz zur Identifizierung von *Taenia* Infektionen besteht darin, die Nukleotidsequenzen von Fragmenten ausgewählter Gene mit Hilfe von Primern in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Die erhaltenen Sequenzen können dann direkt mit bereits publizierten Sequenzen für *T. saginata*, *T. solium* und *T. asiatica* verglichen und so die Identität einer bestimmten Probe bestimmt werden (McManus, 2006). Die DNA für die PCR wird normalerweise aus *Taenia* Eiern oder Proglottiden aus dem Stuhl infizierter Patienten extrahiert (Mwape & Gabriël, 2014). Als Primer haben sich die mitochondrialen *cox1*-, *nad1*-, *cob*- und *12S rDNA*-Gene sowie die nukleären *28S rDNA*- und *ITS1/ITS2 rDNA*-Gene als besonders wertvolle Marker erwiesen (McManus, 2006). Neuere Untersuchungen fokussieren sich auf die Etablierung einer Multiplex-PCR, eine einfache und zeitsparende Technik, bei der durch Kombination verschiedener Primerpaare im gleichen Amplifikationszyklus verschiedene PCR-Produkte erzeugt werden. Diese unterschiedlich amplifizierte DNA kann anschließend mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel getrennt werden (González et al., 2000; Yamasaki et al., 2004). Als weitere vielversprechende Methode für den Nachweis von *Taenia* Infektionen und weiterführend für die Unterscheidung der verschiedenen *Taenia* Spezies, sogar bei Mischinfektionen, erwies sich eine quantitative Multiplex-PCR (Ng-Nguyen et al., 2017). Hier zeigt sich eine Überlegenheit der molekularen Nachweismethode gegenüber der direkten Erregermikroskopie mittels Kato-Katz-Abstrich und gegenüber der Kopro-Antigen-ELISA-

Methode. Die Multiplex-Realtime-PCR zeigt sich als hochspezifisch für die Diagnostik und Unterscheidung aller drei humanpathogenen *Taenia* Spezies und zeigt außerdem keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen intestinalen Parasiten (Ng-Nguyen et al., 2017). Die hohe Sensitivität des speziesspezifischen Nachweises von *Taenia* spp. ist ein großer Vorteil der molekularen Methoden. Allerdings sind PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung verhältnismäßig teure diagnostische Tools, die in den ärmeren Endemiegebieten häufig nicht vorhanden sind, was einem Einsatz in den Praxisbedingungen vor Ort im Wege steht (Murrell et al., 2005; Mwape & Gabriël, 2014). Außerdem gibt es bisher keine kommerziell verfügbaren PCR-Kits zum Nachweis einer Taeniasis.

2.2.5. Therapie

Bei einer intestinalen Taeniasis ist das Mittel der Wahl Praziquantel, ein Pyrazino-Isochinolin-Derivat. Praziquantel wird vom adulten Wurm im menschlichen Darm absorbiert und führt durch die Auslösung von Spasmen und Lähmungen zu einem Absterben des Bandwurms (Hamid et al., 2005). Mehrere Studien zeigten, dass eine einzelne Gabe von 5-10 mg/kg/KG Praziquantel eine Heilungsrate von 85-95% herbeiführt. Weitere Möglichkeiten, eine *Taenia* Infektion zu behandeln, sind die Gabe von Niclosamid 2 g als Einzeldosis oder die Gabe von Albendazol 3 x 400 g für drei aufeinanderfolgende Tage (Okello & Thomas, 2017). In einer vergleichenden Studie lag die Heilungsrate bei Niclosamid bei etwa 90%, während eine dreitägige Therapie mit Albendazol 100% der Infektionen erfolgreich behandelte (Steinmann et al., 2011). Da Praziquantel mit 0,05-0,1 \$ die kostengünstigste Alternative ist, hat sich die Therapie mit diesem Medikament etabliert (Alexander et al., 2011). Die häufigsten Nebenwirkungen nach Einnahme von Praziquantel sind leichte Bauchschmerzen, Schwindel und Diarrhöe. Bei höherer Dosierung können gegebenenfalls vermehrte Schläfrigkeit und eine kurzzeitig verminderte Konzentrationsfähigkeit auftreten (Hamid et al., 2005; Okello & Thomas, 2017).

Bei einer durch *T. solium* ausgelöste Zystizerkose ist die Therapie anspruchsvoller und muss meist von einem multidisziplinären Team von Fall zu Fall unterschiedlich behandelt werden (Hector H García et al., 2002). Bevorzugt wird mit Albendazol in einer Dosierung von 15 mg/kg/KG/Tag aufgeteilt in zwei Tagesdosen für 10-14 Tage therapiert. Alternativ oder additiv steht die Gabe von Praziquantel 50 mg/kg/KG/Tag für 10-14 Tage zur Verfügung (White et al., 2018). Lagern sich die *Taenia* Zysten als Neurozystizerkose im Gehirn ab, wird der Patient zusätzlich mit Prednisolon oder Dexamethason behandelt, um einem Hirnödem durch absterbende Zysten entgegenzuwirken (Hamid et al., 2005). Des Weiteren sollten

Patienten mit Neurozystizerkose-bedingter Epilepsie für mindestens zwei Jahre leitlinienkonform antikonvulsiv behandelt werden (Garcia et al., 2014). Eine chirurgische Zystenentfernung zeigt meist eine eher schlechte Prognose und ist Einzelfällen vorbehalten (Gebrie & Engdaw, 2015).

Es wird weiterhin nach Ansätzen gesucht, die intestinale Taeniasis und vor allem die Zystizerkose in ihrer Übertragung zu hindern und so im besten Fall zu einer Eradikation dieser humanpathogenen Parasiten zu führen. Hierzu zählen unter anderem eine Verbesserung der Lebensumstände in den Endemiegebieten, Gesundheitsaufklärung, Schlachthaus- und Fleischkontrollen, antiparasitäre Massenbehandlung der Menschen in den Endemiegebieten und Massentherapie der Zwischenwirte. Außerdem wird weiterhin an Impfungen gegen Zystizerken für die tierischen Zwischenwirte geforscht (Héctor H. García et al., 2007; Gebrie & Engdaw, 2015; Okello & Thomas, 2017).

2.3. Andere humanmedizinisch relevante Cestoden

2.3.1. *Diphyllobothrium* spp.

Diphyllobothrium ist eine Gattung von Bandwürmern, beim Menschen können diese Bandwürmer durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend gekochtem Fisch eine Diphyllobothriasis verursachen. Bis heute sind etwa 18 humanpathogene *Diphyllobothrium* Arten beschrieben worden, wobei *Diphyllobothrium latum* und *Diphyllobothrium nihonkaiense* zu den häufigsten zählen (Kim et al., 2014; Zhang et al., 2015). Weitere eher seltener den Menschen befallene Repräsentanten sind *Diphyllobothrium cordatum*, *Diphyllobothrium ursi*, *Diphyllobothrium lanceolatum*, *Diphyllobothrium calliae* und *Diphyllobothrium yonagoensi* (Ash & Orihel, 2007).

Weltweit werden die mit Diphyllobothriasis infizierten Menschen auf bis zu 20 Millionen geschätzt (Scholz et al., 2009). Epidemiologisch findet man Infektionen mit *Diphyllobothrium* über alle Kontinente verteilt. Da die Diphyllobothriasis allerdings im Allgemeinen als milde Erkrankung angesehen wird und nicht systematisch gemeldet wird, ist die Datenbasis zur globalen Verbreitung teils lückenhaft und basiert auf einer begrenzten Anzahl von Erhebungen oder klinischen Fallberichten (Scholz et al., 2009).

Im Folgenden werden die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit genutzten Vertreter *D. latum* und *D. nihonkaiense* genauer beschrieben.

Diphyllobothrium latum

D. latum ist mit bis zu 15 m Länge der längste intestinale humanpathogene Parasit. In der Morphologie unterscheidet *D. latum* sich vor allem durch seine zentral gelegene Genitalpore von den anderen Bandwurmarten (Garcia et al., 2015). Der restliche Aufbau ist mit dem Scolex ohne Haken und aneinanderhängenden Proglottiden ähnlich der weiteren humanpathogenen Bandwürmer. Eine Infektion mit *D. latum* tritt in Gebieten auf, in denen Menschen rohen oder nicht ausreichend gekochten Fisch aus nahe gelegenen Seen, Flüssen oder Meeren verzehren (Guo et al., 2012). Betroffen sind vor allem Regionen in Nordeuropa, der ehemaligen Sowjetunion, Nordamerika – hier vor allem Alaska und Kanada – und die Südwestküste Südamerikas (Garcia et al., 2015). Obwohl die Diphyllobothriasis früher eine häufige Infektion in Skandinavien war, ist die Inzidenz dort aufgrund verbesserter hygienischer Verhältnisse deutlich zurückgegangen, sodass nun die meisten Fälle in Russland, Brasilien und Japan gemeldet werden (Diemert, 2017).

Der Lebenszyklus von *Diphyllobothrium* ist komplex und beinhaltet drei verschiedene Wirte (Krustentier, Fisch und fischverzehrende Säugetiere). Kurz dargestellt, gelangen die Eier der Parasiten über den Kot der Säugetiere in das Wasser und entwickeln sich dort zum ersten infektiösen Larvenstadium, welche dann vom ersten Zwischenwirt, kleinen Schalentieren, als Nahrung aufgenommen werden. Die kleinen Schalentiere wiederum werden von Süßwasser- oder marinen Fischen verzehrt, in denen die Larven infektiös werden (Richard D. Pearson, 2018). Menschen oder andere fischfressende Säugetiere wie Robben, Bären oder Hunde infizieren sich dann durch den Verzehr des infektiösen Fisches (Craig & Ito, 2007).

Die Diphyllobothriasis ist meist asymptomatisch, kann aber auch mit ausgeprägten Symptomen wie Bauchschmerzen, Durchfall, Müdigkeit, Kopfschmerzen oder in seltenen Fällen mit subakuter Appendizitis, mechanischem Darmverschluss oder Cholangitis einhergehen (Durrani et al., 2021; Scholz et al., 2009). Da der Bandwurm etwa 80% des mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin B12 absorbiert, kann eine anhaltende Infektion mit *D. latum* zu einem Vitamin-B12-Mangel führen, was wiederum eine megaloblastäre Anämie bedingen kann (Sharma et al., 2018). Die megaloblastäre Anämie kann sich sehr heterogen manifestieren. Typisch sind im stark fortgeschrittenen Stadium Beeinträchtigungen des Zentralnervensystems mit Parästhesien und demyelinisierenden Symptomen, eine okuläre Manifestation wie eine Optikusneuritis oder hämatologische Manifestationen wie Panzytopenie und Eosinophilie (Durrani et al., 2021).

Die Diagnostik der Diphyllobothriasis basiert weitestgehend auf morphologischer Untersuchung des Stuhls infizierter Patienten, seltener wird auch auf molekulargenetische Methoden zurückgegriffen (Scholz et al., 2009).

Therapeutisch behandelt man die infizierten Patienten mit einer einmaligen Gabe von Praziquantel in der Dosis 15 mg/kg/KG. Alternativ steht Niclosamid zur Verfügung (Choi et al., 2012).

Diphyllobothrium nihonkaiense

D. nihonkaiense findet sich vor allem im japanischen Raum und ist hier der wichtigste Vertreter der durch Fische übertragenen parasitären Zoonosen (Chai et al., 2005).

Morphologisch unterscheidet sich *D. nihonkaiense* von *D. latum* kaum, was eine rein mikroskopisch-basierte Trennung der Arten erschwert (Zhang et al., 2015). Zuletzt wurde vermehrt an der Diagnostik und Ausbreitung von *D. nihonkaiense* geforscht. Mithilfe molekulargenetischer Methoden wurde festgestellt, dass im asiatischen Raum viele Patientenfälle fälschlicherweise als *D. latum* identifiziert wurden (Kim et al., 2014). Es wird vermutet, dass der Lebenszyklus von *D. nihonkaiense* ähnlich dem *D. latum*-Zyklus aus zwei Zwischenwirten besteht. Nachweislich finden sich vor allem in pazifischen Salmonidenfischen (Lachs, Forelle, Felchen) Larvenstadien von *D. nihonkaiense* (Kim et al., 2014). Neben den endemischen Gebieten im asiatischen Raum vor allem in Japan, Korea und Russland wird immer wieder über Fälle von *D. nihonkaiense*-Infektionen in nicht typischen Gebieten wie Frankreich, Kanada oder der Schweiz berichtet. Teils ist dies auf importierten rohen Fisch zurückzuführen, es wird aber auch weiterhin über die Möglichkeit einer lokal erworbenen Infektion diskutiert (Wicht et al., 2007). Als Therapie eignet sich eine einmalige Praziquantel-Dosis von 10-15 mg/kg/KG.

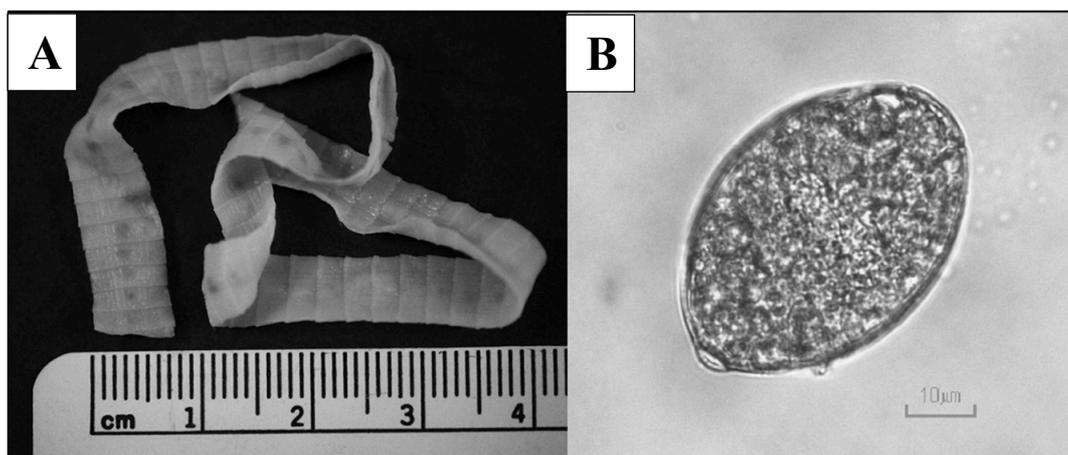


Abbildung 5: A) *D. nihonkaiense* adulter Bandwurm; B) *D. nihonkaiense* Ei unter mikroskopischer Vergrößerung; (Fang et al., 2015)

2.3.2. *Echinococcus* spp.

Echinococcus spp., als Vertreter der Cestoden, löst die zoonotische Erkrankung Echinokokkose aus. Von den drei beim Menschen vorkommenden Formen der Echinokokkose sind die zystische Echinokokkose (CE) und die alveoläre Echinokokkose (AE) aufgrund ihrer weiten geografischen Verbreitung und ihrer medizinischen und wirtschaftlichen Auswirkungen von besonderer Bedeutung (Eckert & Deplazes, 2004). Diese Formen werden durch die Erreger *Echinococcus multilocularis* (Fuchsbandwurm) und *Echinococcus granulosus* (Hundebandwurm) ausgelöst (Hemphill & Lundstroem-Stadelmann, 2021).

Echinokokken kommen weltweit vor, gehäuft finden man Übertragungen von *E. granulosus* in China und Zentralasien, Südamerika, Nord- und Ostafrika sowie Australien. In Europa kommt eine Übertragung von *E. granulosus* vor allem im Mittelmeerraum und im Osten des Kontinents vor (Tamarozzi et al., 2020).

Die alveoläre Echinokokkose, die durch das Larvenstadium von *E. multilocularis* verursacht wird, gilt als eine der schwerwiegendsten parasitären Zoonosen in Mittel- und Osteuropa und ist auch in weiten Teilen Asiens und in Nordamerika im Kommen. In Europa findet man *E. multilocularis* vor allem im Mittelmeerraum und in den östlichen Regionen. Die Infektion kommt aber auch z.B. in der Schweiz und in Süddeutschland vor (Conraths & Deplazes, 2015). Wie alle weiteren Bandwürmer benötigen Echinokokken für ihre Entwicklung zwei Wirte. Als Zwischenwirt dient den ca. 7 mm kleinen Parasiten ein breites Spektrum an Säugetieren (unter anderem auch der Mensch), die sich über eine versehentliche Digestion von *Echinococcus*-Eiern infizieren (Thomas Romig, 2003). Die in den Eiern enthaltenen Larven dringen über verschiedene Schritte in die Leber der befallenen Zwischenwirte ein und entwickeln sich dort innerhalb einiger Jahre zu zystischen Strukturen, in denen sich Metazestoden ausbilden (T Romig et al., 2017). Da eine solche Metazestode vom Endwirt aufgenommen werden muss, um die Entwicklung des Parasiten abzuschließen, sind epidemiologisch wichtige Zwischenwirte immer häufige Beutetiere der fleischfressenden Endwirte. Die Endwirte sind artspezifisch. Für die relevanten humanpathogenen Vertreter sind Füchse (*E. multilocularis*) und Hunde (*E. multilocularis* und *E. granulosus*) von besonderer Bedeutung (Eckert & Deplazes, 2004). Menschen können erkranken, wenn sie als Fehlwirt (*dead-end host*) Eier von Endwirten aufnehmen, z.B. durch engen Kontakt mit einem infizierten Hund. Dann können sich auch im Menschen Larvenstadien entwickeln. Eine weitere Transmission ausgehend vom Menschen kommt jedoch nicht vor (Thomas Romig, 2003).

Die durch Echinokokken ausgelösten Krankheitsbilder sind speziesspezifisch. Eine Infektion mit *E. granulosus* führt zur zystischen Echinokokkose (CE). Hier bilden sich einige Monate nach Primärinfektion unterschiedliche große Zysten in der Leber der infizierten Patienten, selten sind andere Organe wie beispielsweise die Lunge oder noch seltener die Niere oder die Milz betroffen. Klinische Anzeichen können nach einer sehr unterschiedlichen Inkubationszeit von mehreren Monaten oder Jahren auftreten und äußern sich häufig mit Schmerzen im Oberbauchbereich, Hepatomegalie, Cholestase, biliäre Zirrhose, portaler Hypertension oder auch Aszites. Chronischer Husten, Auswurf, Dyspnoe, Hämoptysen, Pleuritis oder Lungenabszess sind ausgewählte Symptome, die durch Lungenzysten entstehen können (Eckert & Deplazes, 2004). Therapeutisch wird hier häufig die Zystenpunktion mit Injektion und Drainage (PAIR) sowie die medikamentöse Chemotherapie auf Benzimidazolbasis mit kurativer Zielsetzung gewählt (Hemphill & Lundstroem-Stadelmann, 2021). Ab einer bestimmten Größe kann es auch sinnvoll sein einzelnen Zysten chirurgisch zu reseziieren.

Die durch *E. multilocularis* ausgelöste alveoläre Echinokokkose (AE) kennzeichnet sich durch eine alveoläre Struktur, die aus zahlreichen kleinen Bläschen (1 mm bis 3 cm Durchmesser) besteht und eine exogene, tumorähnliche Proliferation zeigt, die zur Infiltration der betroffenen Organe und in fortgeschrittenen Fällen zu einer schweren Erkrankung und sogar zum Tod führen kann (Eckert & Deplazes, 2004). Betroffene Organe sind hier meist auch die Leber oder die Lunge, häufig auch eine Kombination aus mehreren Organen. Die Behandlung der AE beruht weitgehend auf chirurgischen Eingriffen (wenn hierdurch eine R0-Resektion erzielt werden kann) oder einer medikamentösen Therapie mit Albendazol, die bei nicht kurativ operablen Patienten häufig lebenslang durchgeführt werden muss (Hemphill & Lundstroem-Stadelmann, 2021).

2.4. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die sogenannte Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) hat sich in vielen Laboratorien als Goldstandard für die Diagnostik von Bakterien und Pilzen durchgesetzt. Das Prinzip dieser Methode ist in **Abbildung 6** dargestellt. Es beruht auf einer Desorption und Ionisation von Proteinen aus der zu untersuchenden Probe durch einen Laser. Die Proben werden zuvor nach einem standardisierten Protokoll vorbereitet und auf das MALDI-Target, eine kleine Metallplatte mit einzelnen Vertiefungen, gegeben. Zu der Probe wird ein Tropfen einer Matrix hinzugefügt, welche die Probenmoleküle vor der Zerstörung durch den direkten Fokus der Laserstrahlen schützt und die Verdampfung und Ionisierung der Proben erleichtert (Clark et al., 2013). In der mikrobiologischen Routine hat

sich als Matrix die *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid* (HCCA), eine Lösung bestehend aus Zimtsäure, durchgesetzt (A. L. Rettinger, 2013). Das Proben-Matrix-Paar wird mit Photonen des Lasers bestrahlt. Diese Bestrahlung bewirkt eine Ionisation von Molekülen der Probe und der Matrix (Lavigne et al., 2013). Die ionisierten Proteine werden durch eine Hochspannungsquelle in einem elektrischen Feld stark beschleunigt und trennen sich anhand ihrer Masse und ihres Ionisierungsgrades auf. So werden charakteristische Proteinspektren erzeugt, die durch einen Datenbankabgleich eine Erregeridentifikation zulassen (Schubert S. & Wieser A., 2010).

Die Proteinspektren bestehen aus einzelnen Proteinpeaks und werden visuell in einem Diagramm wiedergegeben. Die X-Achse spiegelt die Driftstrecke der Ionen nach Beschleunigung wider und wird als m/z (*mass-charge-ratio*) in Dalton angegeben. Sie beschreibt, wie schnell sich die geladenen Ionen aus dem klinischen Probenmaterial durch die Flugzeitröhre (TOF) bewegen und den Detektor erreichen (Clark et al., 2013). Die Flugzeit der Ionen ist abhängig von ihrer Masse und ihrer Ladung. Da die Ladung meist $z = 1$ beträgt, ist vor allem die Masse der Ionen für die Flugzeit ausschlaggebend. Die Y-Achse des Diagramms bezeichnet die Häufigkeit eines Ions in der gemessenen Probe und spiegelt somit die Intensität wider (Albrethsen, 2007).

Die meisten Proteine, die mit MALDI-TOF MS detektiert werden befinden sich zwischen 2-20 kDa und entsprechen strukturellen Proteinen und Polymeren. Für die Diagnostik ist vor allem der Bereich zwischen 2 und 12 kDa als Erfassung der ribosomalen Proteine wichtig (Schubert S. & Wieser A., 2010; Tsuchida et al., 2020).

Durch die unterschiedlichen Zeiten und Intensitäten ergeben sich für die einzelnen Bakterien spezifische „Fingerabdrücke“, die sich anhand eines charakteristischen Proteinspektrums darstellen lassen (Carbonnelle et al., 2011).

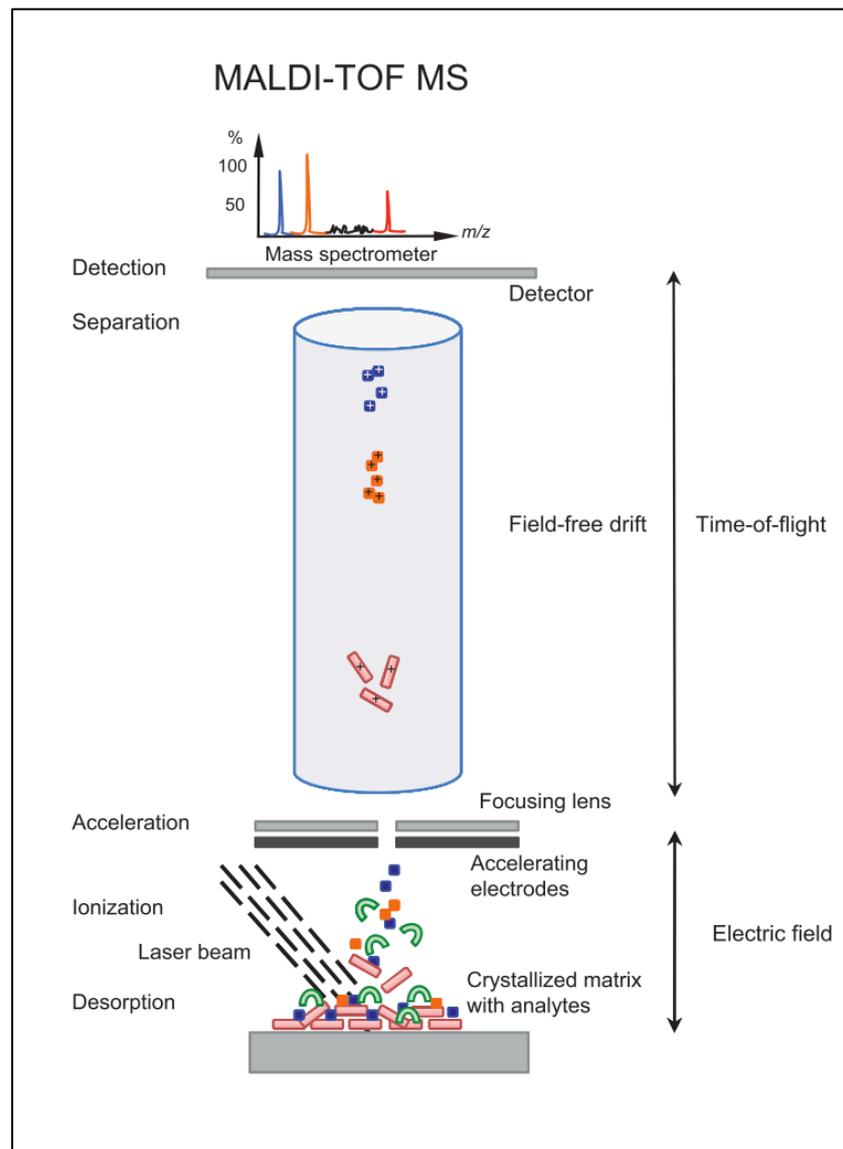


Abbildung 6: Wirkprinzip MALDI-TOF MS (Lavigne et al., 2013). Der Laserbeschuss bewirkt eine thermische Desorption der im Matrixmaterial eingebetteten Proteine. In einem elektrischen Feld werden die Ionen entsprechend ihrer Masse und elektrischen Ladung beschleunigt. Die zurückgelegte Driftstrecke der Ionen ermöglicht eine Auftrennung anhand ihrer Masse und Ladung, die an der Oberseite der Vakuumröhre detektiert werden kann. Aus der Flugzeit kann die genaue Masse der Polypeptide berechnet werden und es wird ein spezifisches Proteinspektrum erstellt (Lavigne et al., 2013). Das Proteinspektrum wird dann computerbasiert visuell in einem Diagramm wiedergegeben: x-Achse = *mass-charge-ratio* in Dalton y-Achse = Intensität in %

MALDI-TOF MS wird vor allem für die bakterielle Erregerdiagnostik aus klinischen Proben wie Sputum, Eiter, Abstrichen, aber auch Urin oder Stuhl genutzt. Nach einer kulturellen Anzucht aus dem jeweiligen Material wird die Kultur zuerst in Hinblick auf Anzahl der Organismen, Mikroskopie mittels Gramfärbung und klinischer Information des Patienten bewertet. Anschließend wird ein kleiner Teil einer bakteriellen Kolonie manuell auf das

MALDI-Target gebracht, um anschließend eine massenspektrometrische MALDI-TOF-Diagnostik zur Speziesidentifikation durchzuführen (Tsuchida et al., 2020). Es ist allerdings inzwischen auch möglich, die MALDI-TOF-Technik nicht nur bei auf Agarplatten gewachsenen bakteriellen Kulturen zur Anwendung zu bringen, sondern sie auch bei positiven Blutkulturflaschen aus der Flüssigkultur durchzuführen oder – bei ausgewählten klinischen Materialien wie Urin – direkt eine Erregeridentifikation aus dem Primärmaterial durchzuführen, was mit einer erheblichen zeitlichen Beschleunigung in der Erregerdiagnostik einhergeht (Dubourg et al., 2019). Die MALDI-TOF Massenspektrometrie gilt damit inzwischen als Standardtechnik in mikrobiologischen Laboren, da sie zu einer genauen und vor allem schnellen Identifizierung von Organismen im klinischen Alltag und so zu einem verbesserten Einsatz von Antibiotika, einer Verringerung von multiresistenten Bakterien und einer Reduzierung der Dauer und der Kosten von Krankenhausaufenthalten führen kann (Lavigne et al., 2013). Neben der Identifizierung von Mikroorganismen ist die Typisierung einzelner Stämme sowie die Antibiotika- und Antimykotika-Resistenzprüfung durch das massenspektrometrische Verfahren vermehrt in den Fokus gerückt (Sören Schubert & Kostrzewa, 2017).

Aktuelle Studien zeigen außerdem eine erfolgreiche massenspektrometrische Identifikation von Läusen, Mücken sowie Zecken und Flöhe (Lafri et al., 2016; A. Nebbak et al., 2017; Amira Nebbak & Almeras, 2020). Im Bereich der Parasitologie, speziell der Helminthologie, wird seit einigen Jahren in mehreren Arbeitsgruppen an der MALDI-TOF MS -basierten Diagnostik geforscht (Feucherolles et al., 2019). Hier zeigen sich vielversprechende Ergebnisse für die Identifikation von Nematoden und Trematoden, unter anderem wurden Studien zur Diagnostik von *Anisakis* spp., *Dirofilaria* spp., *Ascaris* spp. und *Fasciola* spp. veröffentlicht (Marzano et al., 2020a; Nagorny et al., 2019; Sy et al., 2021).

2.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, die massenspektrometrische speziesspezifische Diagnostik von *T. saginata* zu etablieren und verschiedene Einflussgrößen auf die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik zu überprüfen. Hierzu wurde ein zuvor *in domo* entwickeltes Arbeitsprotokoll (Sy et al., 2021) für die massenspektrometrische Untersuchung von Parasiten genutzt und untersucht, ob hiermit eine speziesspezifische Identifikation von *T. saginata* durchgeführt werden kann. Hierzu wurden die folgenden Arbeitspakete durchgeführt:

- 1) Erstellung von *Taenia*-Referenzspektren, Bearbeitung derselben und anschließende Integration in die bestehende in-house-MALDI-Datenbank für Helminthen
- 2) Weitergehende Standardisierung des Helminthen-spezifischen MALDI-TOF-Arbeitsprotokolls und Untersuchung des Einflusses verschiedener Probenlagerungsmedien (Formalin, Natriumchlorid, Alkohol, Wasser) auf die Qualität der massenspektrometrischen Diagnostik

3. Material und Methoden

3.1. Experimentelles Vorgehen zu Projektbeginn

Als Ausgangspunkt für die Projektentwicklung dienten am Institut durchgeführte Vorversuche zur massenspektrometrischen Diagnostik verschiedener Parasiten. Ziel war es, eine in-house-Database mit den Proteinspektren verschiedener humanpathogener Parasiten herzustellen, die als Ergänzung der kommerziell verfügbaren Datenbank des Herstellers Bruker Daltonics für Bakterien und Pilze dienen sollte, um auch Helminthen-Proteinspektren in diagnostischen Proben zweifelsfrei identifizieren zu können (Feucherolles 2019; Sy et al., 2020, 2021).

In diesen Versuchen wurde das von Bruker Daltonics empfohlene Protokoll zur Analyse von Mikroorganismen aus Bakterienkulturen verwendet. Im Verlauf des Projekts konnte dies vereinfacht und angepasst werden, sodass ein etabliertes in-house-Verfahren für die massenspektrometrische Untersuchung von Parasiten entstand. Dieses Protokoll wurde für alle Messungen verwendet und wird im Folgenden genauer erläutert.

3.2. Versuchsaufbau

3.2.1 Massenspektrometrische Identifikation von *T. saginata*

Um die massenspektrometrische Diagnostik von *T. saginata* zu untersuchen und zu etablieren, wurden insgesamt sechs verschiedene *T. saginata* Proglottiden und zwei unterschiedliche Proben, welche *T. saginata* Eier enthielten, herangezogen. Der Workflow für dieses Projekt ist in **Abbildung 7** dargestellt. Zur Abgrenzung von *T. saginata* zu anderen Helminthen wurden verschiedene Proben des verwandten Cestoden *Diphyllobothrium* spp. eingesetzt. Diese Parasitenproben durchliefen das angepasste Arbeitsprotokoll zur Proteinextraktion und wurden massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF MS untersucht (1). Für jede Probe fanden am gleichen Tag zwei Messungen à jeweils 32 Spektren sowie nach mindestens 24 Stunden eine weitere Replikationsmessung statt, sodass insgesamt pro Probe 96 Proteinspektren erstellt wurden. Durch diese Triplikat-Messung kann die Wiederholbarkeit (repeatability) und Reproduzierbarkeit (reproducibility) der Ergebnisse demonstriert werden.

Die Wiederholbarkeit von Messungen bezieht sich auf die Variation bei Wiederholungsmessungen, die am gleichen Probanden unter identischen Bedingungen in einem kurzen Zeitintervall durchgeführt wurden und hier als Ziel die Konstanz haben. Die Reproduzierbarkeit hingegen beschreibt die Konstanz unter wechselnden Bedingungen

vorgenommener Messungen. Die veränderten Bedingungen können auf unterschiedliche Messmethoden oder -instrumente, Messungen durch verschiedene Beobachter oder Messungen über einen vergrößerten Zeitraum hinweg zurückgeführt werden (Bartlett & Frost, 2008).

Die resultierenden Proteinspektren wurden in einem nächsten Schritt mittels einer speziellen Software auf unterschiedliche Art und Weise bearbeitet. Zuerst wurden die gemessenen Spektren mit der kommerziell verfügbaren Standarddatenbank für Bakterien und Pilze verglichen, um eine Verunreinigung der Proben z.B. mit Bakterien auszuschließen. Außerdem wurden verschiedene Software-basierte Reinigungsschritte durchgeführt (2). Von der ersten gemessenen Probe von *T. saginata* Proglottiden wurde mithilfe der MALDI Biotyper Compass Explorer Software ein sogenanntes main spectra profile (MSP) erstellt, also eine Zusammenfassung aller gemessenen Proteinspektren. Hierfür wurde eine automatisierte statistische Auswertung herangezogen (Waldenmaier, 2013). Dieses MSP wurde der bestehenden in-house-Datenbank hinzugefügt. Anschließend wurden alle gemessenen Parasitenproben mit den Spektren dieser Probe von *T. saginata* Proglottiden aus Basel verglichen, um zu überprüfen, ob eine Identifikation der neuen Proben anhand der Datenbank möglich ist (3). Im Folgenden wurde eine Clusteranalyse der Proteinspektren durchgeführt, um die Ähnlichkeit der Spektren zueinander aufzuzeigen. Als weitere statistische Auswertung wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt (4).

Die massenspektrometrische Diagnostik der *T. saginata* Proben wurde überprüft, indem eine molekulargenetische Untersuchung der verwendeten Parasiten angeschlossen wurde. Mit allen Exemplaren wurde eine DNA-Extraktion, gefolgt von einer spezifischen Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung mithilfe bereits etablierter Primer und Protokolle, vollzogen (5). Anschließend konnten die Sequenzen der Parasitenproben hinsichtlich ihrer genetischen Ähnlichkeit in einem phylogenetischen Sequenzstammbaum verglichen werden (6). Dieser molekulargenetische Stammbaum kann in Relation zur Clusteranalyse der massenspektrometrischen Messung gesetzt werden (7). Hierdurch können Genauigkeit und Präzision des neuen massenspektrometrischen Verfahrens aufgezeigt werden.

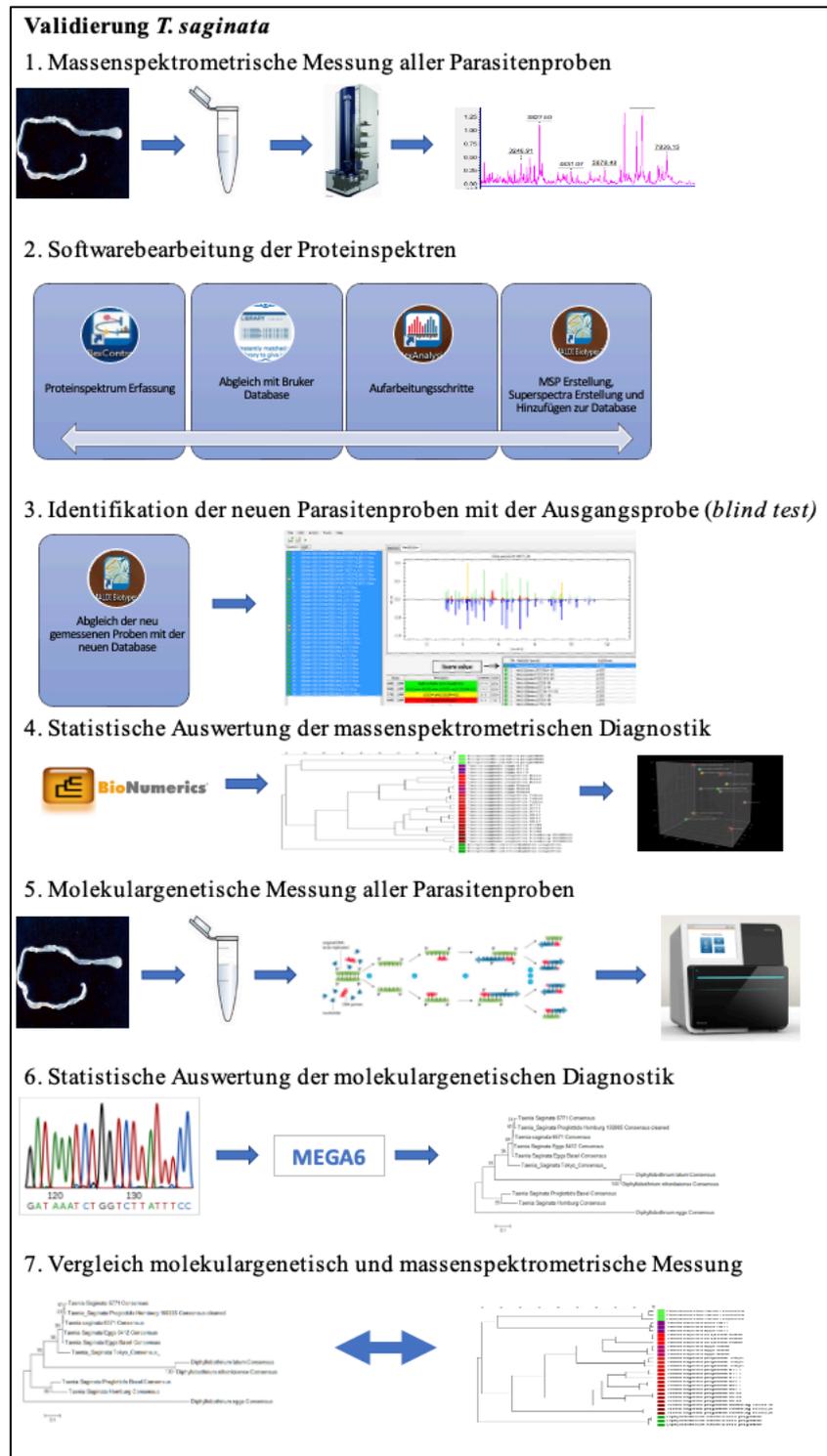


Abbildung 7: Workflow Validierung massenspektrometrische Diagnostik von *T. saginata*. Zuerst wurden alle vorhandenen Proben von *T. saginata* und *Diphyllobothrium* spp. massenspektrometrisch gemessen (1). Die Proteinspektren der Messungen wurden darauffolgend mit verschiedenen Softwareprogrammen bearbeitet - die Proteinspektren wurden mithilfe von FlexControl erfasst, mit dem MBT Compass Explorer auf Verunreinigung überprüft, mit FlexAnalysis aufgearbeitet und visuell analysiert und zuletzt wurden mit der automatisierten Funktion des MBT Compass Explorers MSPs erstellt (2). Von der Ausgangsprobe *T. saginata* Proglottiden aus Basel wurde ein *main spectra profile* (MSP) erstellt und der in-house-Database hinzugefügt. Die kommenden Messungen konnten dann im Verlauf mit diesem

Ausgangsspektrum verglichen werden, um zu überprüfen, ob eine Identifikation möglich ist als sogenannter *blind test*(3). Darauffolgend wurde die statistische Analyse der Proteinspektren mit BioNumerics durchgeführt und ein Dendrogramm sowie eine PCA entwickelt (4). Zur Überprüfung der Parasitenproben wurden alle Parasiten molekulargenetisch mittels PCR und Sequenzierung analysiert (5). Die Sequenzen der Proben wurden statistisch mit der BioEdit-Software und der MEGA6 Software bearbeitet und in einem phylogenetischen Stammbaum betrachtet (5). Zuletzt wurden die statistischen Analysen aus massenspektrometrischer und molekulargenetischer Identifikation miteinander verglichen (6).

3.2.2. Einfluss verschiedener Lagerungsmedien auf die massenspektrometrische Analyse

Weiterführend wurde der Einfluss verschiedener Lagerungsmedien auf die massenspektrometrische Analyse von *T. saginata* Proben untersucht. Der Workflow dieses Projektteils ist in **Abbildung 8** dargestellt.

Hierfür wurde eine Ausgangsprobe des Exemplars zum Nachweis des Probeninhalts zuerst molekulargenetisch identifiziert (1). Anschließend wurden insgesamt drei massenspektrometrische Messungen der Ausgangsprobe durchgeführt, zwei Messungen an einem Tag und eine Messung mindestens 24 Stunden später, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit anzuzeigen (2). Diese Proteinspektren wurden als Ausgangsprobe genutzt und als „*Taenia saginata proglottids 0 weeks*“ nach Abgleich mit der Bruker Database und verschiedenen Reinigungsschritten via MSP-Erstellung unserer in-house-Database hinzugefügt (3). Im Folgenden wurde das Ausgangsexemplar *T. saginata* zerkleinert, in die verschiedenen Aufbewahrungslösungen Natriumchlorid 0,45%, Ethanol 70%, Wasser in LC-MS-Qualität (destilliertes Reinstwasser, geeignet für LC-MS durch ein hohes Maß an UV-Durchlässigkeit und einer geringer Partikelanzahl) sowie Formalin 37% gegeben und im Gefrierschrank bei - 20°C gelagert (4). Die Proben wurden nach jeweils zwei, vier, sechs, acht, 12 und 24 Wochen aufgetaut und die Proteinspektren mittels MALDI-TOF MS gemessen (5). Die neu gemessenen Proteinspektren wurden nach mehreren softwarebasierten Aufarbeitungsprozessen (6) mit unserer Ausgangsmessung verglichen, um die Identifikation zu überprüfen (7). Anschließend wurde eine statistische Auswertung durchgeführt, indem eine hierarchische Clusteranalyse erstellt wurde (8).

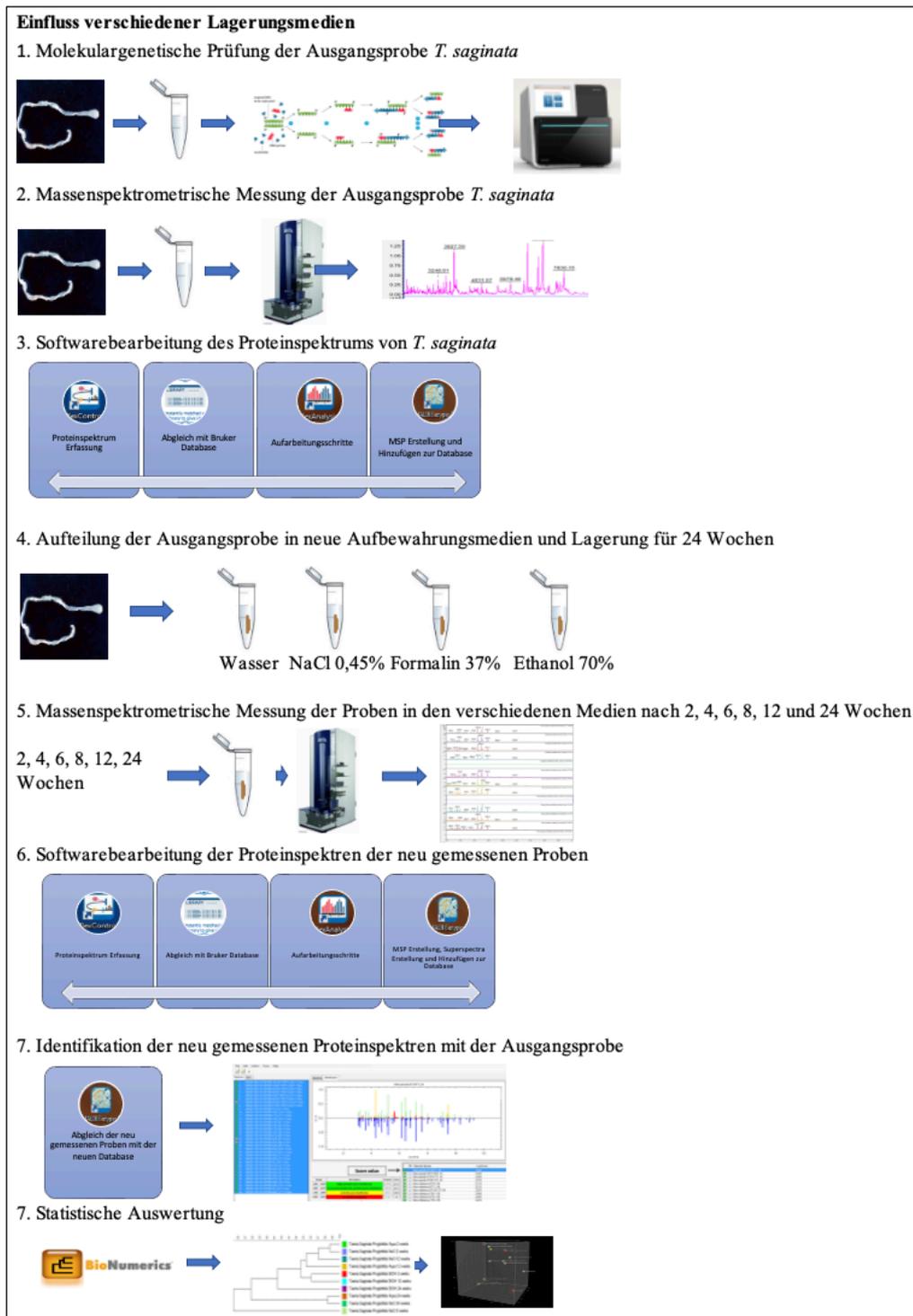


Abbildung 8: Workflow Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerungsmedien auf die massenspektrometrische Diagnostik von *T. saginata*.

Zuerst wurde die Ausgangsprobe *T. saginata proglottidis* molekulargenetisch analysiert, um die Identifikation zu gewährleisten (1). Anschließend wurde die Probe massenspektrometrisch gemessen, um ein Ausgangsproteinenspektrum herzustellen (2). Nach Abgleich auf Kontamination und Bearbeitung der Proteinspektren wurde ein MSP hergestellt (3). Die Ausgangsprobe wurde in die neuen Lagerungsmedien Wasser in LC-MS Qualität, Natriumchlorid 0,45%, Ethanol 70% und Formalin 37% gegeben und gekühlt gelagert (4). Nach zwei, vier, sechs, acht, 12 und 24 Wochen wurden MALDI-TOF MS basierte Messungen der neu gelagerten

T. saginata Proben durchgeführt (5). Diese neuen Proteinspektren sind mit der FlexAnalysis Software aufgearbeitet worden und es wurden jeweils MSPs erstellt (6). Anschließend wurden mithilfe der MALDI Biotyper Compass Explorer Software die Proteinspektren der Taenien in neuen Lagerungsmedien mit dem Ausgangsspektrum verglichen, um die Identifikationsrate zu überprüfen (7). Zuletzt wurde eine statistische Analyse mittels BioNumerics Software durchgeführt, bei der die MSPs in einer Clusteranalyse und eine Hauptkomponentenanalyse miteinander verglichen wurden (8).

3.3. Probenherkunft und Lagerung

Die hier untersuchten Proben stammen aus der Routinediagnostik von Patienten am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (IMMH) in Homburg (Deutschland), dem Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) in Basel (Schweiz) sowie dem Department of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University (Japan) und wurden in den jeweiligen Instituten aus Stuhlproben extrahiert.

In den vorgenannten Laboren wurde im Rahmen der Routine-Patientendiagnostik jeweils eine direkte mikroskopische Erregerdiagnostik durchgeführt. Nach Identifikation und Lagerung der Proben wurden diese gekühlt zum IMMH nach Homburg transportiert. Vor Ort wurden die Proben aus ihren Transportlösungen entnommen und in 0,45% Natriumchlorid (NaCl) bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Eine Auflistung der Probenherkunft, Aufnahmedatum und Lagerungsmedium ist der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Probenname	Genus	Spezies	Typ	Ankunftsdatum	Herkunft der Probe	Lagerungsmedium
Taenia saginata proglottids Basel	Taenia	saginata	Proglottiden	21.08.18	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,9% NaCl
Taenia saginata proglottids 6517	Taenia	saginata	Proglottiden	01.10.19	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,45% NaCl
Taenia saginata proglottids 6771	Taenia	saginata	Proglottiden	01.10.19	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,45% NaCl
Taenia saginata proglottids Homburg	Taenia	saginata	Proglottiden	01.08.19	IMMH, Homburg, DE	0,45% NaCl
Taenia saginata proglottids Homburg 1508828	Taenia	saginata	Proglottiden	01.03.20	IMMH, Homburg, DE	0,45% NaCl
Taenia saginata proglottids Tokyo	Taenia	saginata	Proglottiden	19.12.18	Dokkyo University DMU, Tochigi, Japan	0,45% NaCl
Taenia saginata eggs Basel	Taenia	saginata	Eier	03.10.18	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,45% NaCl
Taenia saginata eggs 8412	Taenia	saginata	Eier	01.10.19	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,45% NaCl
Diphyllobothrium latum proglottids	Diphyllobothrium	latum	Proglottiden	03.10.18	Basel Swiss TPH, Schweiz	0,45% NaCl
Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids	Diphyllobothrium	nihonkaiense	Proglottiden	19.12.18	Dokkyo University DMU, Tochigi, Japan	0,45% NaCl

Tabelle 1: Probenherkunft, Aufnahmedatum und Lagerungsmedium.

3.4. Probenaufarbeitung

Für den ersten Teil des Projekts, die Validierung der MALDI-TOF MS basierten Identifikation von *T. saginata*, wurden die zu untersuchenden Proben kurz vor Versuchsbeginn dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut. Für den zweiten Teil, die Überprüfung des Einflusses der unterschiedlichen Lagerungsmedien auf die Proteinspektren, wurde die Referenzprobe (*Taenia saginata* Proglottiden aus Basel vom 21.08.2018) dem Gefrierschrank entnommen, zerkleinert und in die verschiedenen Lagerungsmedien gebracht. Hierfür wurde dem Probeninhalt ein großes Exemplar des adulten *Taenia* Bandwurms entnommen, welches mittels eines sterilen Skalpell auf einer Petrischale in ca. 0,5-1 cm große Stücke zerteilt wurde. Die zerkleinerten Proben wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, für ca. fünf Minuten unter der Abzugshaube getrocknet und 1 ml der neuen Aufbewahrungslösung wurde vorsichtig hinzugefügt. Als Konservierungsmedien wurden die in der klinischen Routine gebräuchlichsten Aufbewahrungslösungen für Helminthen ausgewählt: Natriumchlorid 0,45% (NaCl) (Merck KG; Darmstadt, Deutschland), Ethanol 70% (Merck KG; Darmstadt, Deutschland), Wasser in LC-MS-Qualität (Merck KG; Darmstadt, Deutschland) und Formalin 37% (Merck KG; Darmstadt, Deutschland). Es wurden 32 x 1,5 ml Eppendorfgefäße mit den zerkleinerten *Taenia* Proglottiden und den jeweiligen neuen Lagerungsmedien befüllt. Pro Aufbewahrungsmedium konnten dementsprechend acht *Taenia* Proben gelagert werden, sodass wir nach mindestens sechs verschiedenen Zeitpunkten eine Messung durchführen konnten. Alle Proben in ihrer neuen Aufbewahrungslösung wurden im Gefrierschrank bei -20°C konserviert und vor Versuchsbeginn jeweils bei Raumtemperatur aufgetaut.

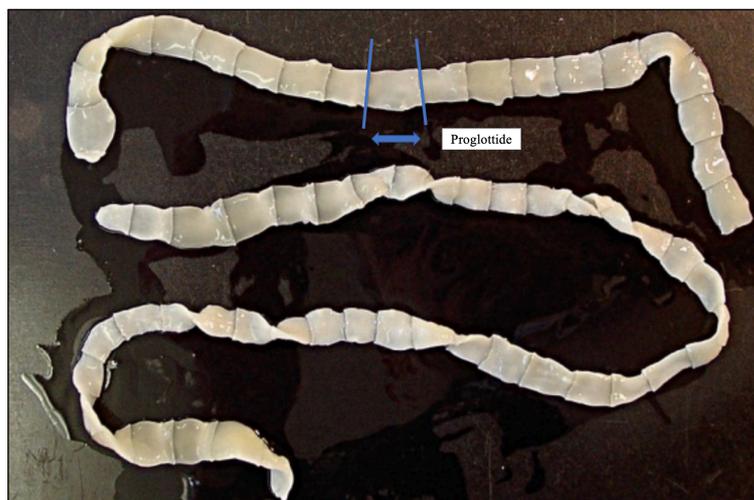


Abbildung 9: *T. saginata* Aufarbeitung: Zu sehen ist ein vollständiger konservierter *T. saginata* Bandwurm, eingezeichnet ist eine Proglottide. Für die massenspektrometrische Analyse wurde jeweils eine Proglottide genutzt und weiterführend zerkleinert. **Foto-Quelle:** <http://tierdoku.de/index.php?title=Rinderbandwurm>

3.5. Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF MS

3.5.1. Protein-Extraktion

Für jede Messung wurden die jeweiligen Helminthen Proben aus dem Gefrierschrank aufgetaut. Nach Erreichen der Raumtemperatur wurden die Proglottiden den Aufbewahrungslösungen entnommen und auf sterile Petrischalen gegeben. Mit einem sterilen Skalpell wurden die Proben in drei gleiche Teile aus jeweils 0,5-1 cm Größe zerteilt. Die zerkleinerten Proglottiden wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß für die anschließende MALDI-TOF MS Analyse gegeben. Für die Proteinextraktion verwendeten wir das empfohlene Protokoll für Bakterienproben, das vom Hersteller Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) veröffentlicht wurde. Wie im Protokoll beschrieben, wurden zunächst 300 µl Wasser in LC-MS-Qualität (Merck KG; Darmstadt, Deutschland) und 900 µl Ethanol absolut 100% (Merck KG) zu den einzelnen Proben hinzugefügt. Die Mischung wurde 10 Sekunden lang gevortext und dann 2 Minuten lang bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz bei Raumtemperatur getrocknet. Nach etwa fünf Minuten wurde der Bodensatz mit 50 µl 70% Ameisensäure und 50 µl Acetonitril gelöst und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde die Suspension erneut bei 1300 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. In der so gewonnenen Lösung finden sich die gelösten Proteine, die für die massenspektrometrische Messung genutzt werden.

In der hier dargestellten Arbeit wurden neben adulten Würmern auch zwei Exemplare von *T. saginata* Eiern analysiert. Hierfür wurden 100 µl der *Taenia* Eier-Suspension in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend wurde das oben beschriebene Protokoll umgesetzt.

3.5.2. Target Plate Vorbereitung und Messung

Das MALDI-Target ist eine von Bruker Daltonics vertriebene Metallplatte, welche die Proben in einzelne Vertiefungen zur Analyse trennt (Payne & Grayson, 2018). Für alle Versuche wurden die in der mikrobiologischen Routine verwendeten MALDI-Targets *MSP 96 Polished Steel MALDI Target Plate* genutzt.

Von der zuvor gewonnenen Suspension wurde 1 µl des klaren Überstandes auf jeden Spot des MALDI-Targets pipettiert. Für jede Probe wurden acht Spots verwendet, die in einer bestimmten von Bruker empfohlenen Reihenfolge organisiert sind (vergleiche **Abbildung 10**).

Nach einer Trockenzeit von ca. fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde 1 μl der α -Cyano-4-Hydroxycarbonsäure (CHCA)-Matrixlösung (Bruker Daltonics) hinzugegeben, die aus gesättigtem CHCA, Acetonitril 50%, Trifluoressigsäure 2,5% und Wasser 47,5% in LC-MS-Qualität besteht. Zur Kalibrierung des Geräts wurde der Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker Daltonics) verwendet, ein *Escherichia coli*-Extrakt in Verbindung mit zwei hochmolekularen Proteinen. Für jede Messung wurde ein spezifischer Kalibrierungsspot der Target Plate hinzugefügt, welcher in der Mitte der Zielplatte angeordnet war. Jede Messung wurde mit sechs unspezifischen BTS-Spots kalibriert. Nach einer weiteren Trockenzeit von ca. fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde das MALDI Target im Microflex LT Massenspektrometer (Bruker Daltonics) für MALDI-TOF MS platziert und die Messung der Proteinspektren wurde gestartet.

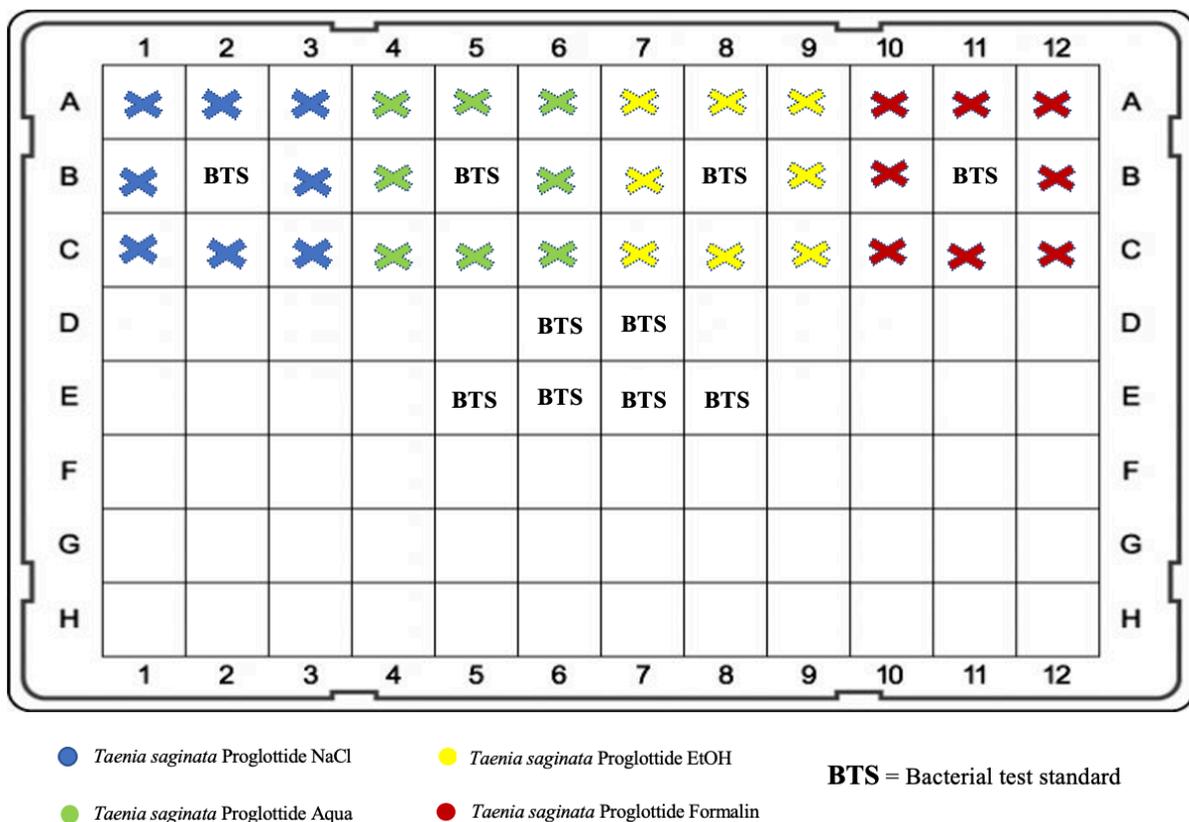


Abbildung 10: Beispiel MALDI-TOF MS Target Plate Protokoll: Von Bruker Daltonics empfohlene Anordnung der Bakterienproben mit den BTS-Kalibrierungsspots. Jede extrahierte Proteinlösung einer Probe wurde auf insgesamt acht Spots zirkulär auf das MALDI-Target verteilt mit einem zentral gelegenen spezifischen BTS-Spot. Zusätzlich wurden sechs unspezifische BTS-Spots zur Kalibrierung des Geräts herangezogen.

3.5.3. MALDI-TOF MS Parameter

Alle Messungen wurden mit dem AutoXecute-Algorithmus in der FlexControl-Software Version 3.4 durchgeführt (Bruker Daltonics). Es erfolgten standardgemäß vier Messungen pro Target-Spot. Für jeden Spot wurden 240 Laserschüsse in zufälligen Positionen verwendet, um Proteinmassenprofile im linearen positiven Ionenmodus zu erstellen. Die Laserfrequenz der Messungen lag bei ca. 60 Hz, die Hochspannung bei 20 kV und die gepulste Ionenextraktion bei 180 ns. Der Bereich der Massenladungsverhältnisse (m/z) wurde zwischen 2 k und 20 k Da gemessen. Die Intensität der Laserschüsse wurde mit 20-26 % gewählt.

3.5.4. Spektrenaufarbeitung

Zur Aufarbeitung der Proteinspektren wurde die FlexAnalysis Software Version 3.4 (Bruker Daltonics) herangezogen. Hiermit konnten die einzelnen Proteinspektren der jeweiligen Messungen betrachtet und bearbeitet werden. Pro gemessener Probe wurden jeweils acht Target Spots mit der Proteinlösung befüllt. Da vier Messungen pro Spot automatisiert von der Software durchgeführt wurden, haben sich insgesamt für jede bearbeitete Probe 32 Proteinspektren ergeben. Mithilfe der FlexAnalysis Software konnten alle 32 Proteinspektren einer Probe zusammen betrachtet und aufgearbeitet werden. Die zunächst erstellten unbearbeiteten Proteinspektren wurden als Rohspektren (*raw spectra*) bezeichnet. Im Folgenden wurden mehrere Reinigungsschritte durchgeführt. Zuerst wurden alle *flat-* und *outlines*, also Messung ohne Proteinspektren oder verfälschte Proteinspektren, die zu hohe oder falsche Proteinpeaks anzeigen, entfernt. Daraufaufgehend wurden die Intensitäten der Proteinspektren geglättet und die Basislinie wurde korrigiert. Diese Schritte sind wichtig, um die Auflösung zu erhöhen und Hintergrundgeräusche, die beispielsweise durch die verwendete Matrix verursacht werden, zu entfernen. Für die Bearbeitung der Proteinspektren wurde eine automatisierte Excel-Tabelle herangezogen. Jedes genutzte Proteinspektrum musste mindestens über drei Proteinpeaks im Bereich von 3 000-10 000 Dalton verfügen, der *maximum peak error* wurde mit <300 ppm angegeben und die Differenz zwischen *before last fit* und *in last fit* musste <300 ppm betragen. Durch den Vergleich der Proteinpeaks der 32 Proteinspektren untereinander konnten *outlines* festgestellt und entfernt werden.

Nach diesen Reinigungsschritten wurden Replikate der Proben mit mindestens 22 verbleibenden bereinigten Proteinspektren erstellt. Wenn weitere *flat-* oder *outlines* gefunden

wurden und die Anzahl von 22 verbleibenden Rohspektren nicht erreicht wurde, wurde die Messung inklusive Proteinextraktion wiederholt.

3.5.5. Auswertung, statistische Analyse und Datenbank-Erstellung

3.5.5.1. Auswertung der Validierung der massenspektrometrischen Diagnostik von *T. saginata*

Für die Validierung der MALDI-TOF MS basierten Diagnostik von *T. saginata* standen insgesamt acht verschiedene Proben zur Verfügung, sechs Proben *T. saginata* Proglottiden und zwei Proben *T. saginata* Eier. Um die Abgrenzung zu anderen Parasiten zu überprüfen, wurden dem Versuch zwei Proben *Diphyllobothrium* spp. als weiterer Vertreter der Cestoden hinzugefügt. Darunter befanden sich eine Probe *D. latum* Proglottiden und ein Exemplar *D. nihonkaiense* Proglottiden.

Insgesamt wurden zehn unterschiedliche Parasitenproben gemessen. Jede Probe wurde dreimal untersucht, zwei Messungen wurden an einem Tag und eine weitere Messung wurde mindestens 24 Stunden später durchgeführt. Bei jeder Messung wurden 32 Proteinspektren erzeugt, sodass wir insgesamt für jede eigenständige Parasitenprobe 96 Proteinspektren erhielten.

Die Auswertung der Proteinspektren wurden zunächst mit der FlexAnalysis Software Version 3.4 (Bruker Daltonics) durchgeführt, mit welcher ein erster optischer Vergleich der Proteinspektren stattfinden konnte. Hierfür wurden repräsentativ von jeder Messung ein bereinigtes Proteinspektrum in das Programm geladen, sodass die Spektren übereinandergelegt und verglichen werden konnten. Darauf folgend wurde mithilfe der MALDI Biotyper Compass Explorer Software Version 3 (Bruker Daltonics) ein Abgleich der gewonnenen Rohspektren mit der offiziellen Bruker Standarddatenbank für Bakterien und Pilze durchgeführt. Die Biotyper Software berechnet automatisch einen sogenannten Log Score Value (LSV), welcher die Übereinstimmung der Signalintensitäten der zu vergleichenden Proteinspektren angibt (Lafri et al., 2016). Der LSV wird als Produkt aus drei Faktoren berechnet: die Übereinstimmung des zu vergleichenden Spektrums mit dem Referenzspektrum der Datenbank, die Übereinstimmungen des Referenzspektrums mit dem zu vergleichenden Spektrum und die Korrelation der relativen Intensitäten des zu vergleichenden Spektrums mit dem Referenzspektrum (Lartigue et al., 2009). Der LSV-Bereich liegt zwischen 0.0-3.0 (vergleiche **Tabelle 2**). LSVs ≤ 1.69 zeigen keine sichere Identifizierung, LSV ≥ 1.70 zeigt eine wahrscheinliche Gattungsidentifizierung an, ein LSV zwischen 1.70 und 1.99 gilt als sichere Gattungs- und wahrscheinliche Artidentifizierung und LSVs ≥ 2.0 beschreiben eine sichere Gattungs- und Artidentifizierung (**Tabelle 2**).

Die kommerziell verfügbare Datenbank, welche ausschließlich von der Firma Bruker Daltonics vertrieben wird, beinhaltet >4000 Referenzspektren von mehr als 3000 Arten aus 540 Gattungen (Torres-Sangiao et al., 2021). Diese klinisch validierten Referenzspektren decken mehr als 98% des typischen mikrobiologischen Keimspektrums in der Routinediagnostik ab (Bruker Daltonics Inc., 2021). Proteinspektren von Parasiten sind in der zugrundeliegenden Datenbank jedoch bisher noch nicht vorhanden.

LSV-Bereich	Beschreibung	Farbmarkierung im Projekt
2.3 - 3.0	sichere Gattungs- und Artidentifizierung	grün
2.0 - 2.29	sichere Gattungs- und wahrscheinliche Artidentifizierung	grün
1.7 - 1.99	zeigt eine wahrscheinliche Gattungsidentifizierung	gelb
0.0 - 1.69	keine sichere Identifizierung	rot

Tabelle 2: Offizieller Log Score Value Bruker: Log score values (LSV) und ihre Interpretation für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Diagnostik infektiöser Mikroorganismen. Die Range des LSVs angegeben von 0.00-3.00 ist mit der zugehörigen Identifikation und der farblichen Markierung beschrieben.

Die neu gemessenen Proteinspektren der *Taenia* und *Diphyllobothrium* Proben wurden unserer in-house-Datenbank hinzugefügt. Hierfür wurde die automatisierte Funktion der MALDI Biotyper Compass Explorer Software Version 3 (Bruker Daltonics) verwendet und ein veröffentlichtes Protokoll zur MSP-Erstellung genutzt.

Durch das Hinzufügen der bearbeiteten Proteinspektren zu unserer Datenbank ist es möglich, spätere Messungen anhand ihrer Proteinpeaks und dessen Übereinstimmungen mit den abgespeicherten Proteinspektren in der Datenbank zu identifizieren. Zu Versuchsbeginn bestand unsere in-house-Datenbank aus einigen Cestoden, Trematoden und Nematoden (Feucherolles et al., 2019). Als Ausgangsprobe für die *T. saginata* Analyse wurde das MSP der ersten Probe *T. saginata proglottids* aus Basel genutzt. Die drei Messungen der Ausgangsprobe (*T. saginata proglottids_Basel_1*, *T. saginata proglottids_Basel_2* und *T. saginata proglottids_Basel_3*) wurden automatisiert anhand Organismen-spezifischer Signale der Einzelspektren zu einem Proteinspektrum zusammengefasst (Waldenmaier, 2013) und unserer in-house-Datenbank hinzugefügt. Alle weiteren Parasitenproben wurden dann mit der neu erarbeiteten in-house-Datenbank verglichen, um die Identifikation zu überprüfen. Dies wird im Folgenden als blind test bezeichnet und soll die neu erarbeitete in-house-Datenbank auf mögliche Identifikation prüfen.

In einem weiteren Schritt wurden die unbearbeiteten Proteinspektren aller gemessenen Parasitenproben erneut mit der Kombination aus der Bruker Standarddatenbank zur Bakterienidentifikation und der in-house-Datenbank verglichen mit dem Unterschied, dass nun der zur Identifikation genutzten Datenbank jeweils ein MSP der bisher gemessenen Proben

hinzugefügt wurde. Mit dieser erweiterten Validierung der in-house-Datenbank soll getestet werden, inwiefern sich die MALDI-TOF MS basierte Identifikation verbessert, wenn die Datenbank um zusätzliche Organismen erweitert wird. Hier wurden insgesamt sechs Tests durchgeführt. Bei jedem Test wurde der in-house-Datenbank jeweils ein MSP der gemessenen *T. saginata* Proben hinzugefügt. Es wurden nur MSPs dem Abgleich hinzugefügt, die im vorangegangenen Abschnitt als *T. saginata* identifiziert werden konnten. Zu erwähnen ist, dass jeweils die Probe, dessen MSP der Datenbank dem jeweiligen Vergleich hinzugefügt wurde, aus der Berechnung ausgeklammert wurde.

Als statistische Auswertungsmöglichkeit wurde die BioNumerics Software Version 7.6. (AppliedMaths) genutzt, mit welcher eine Clusteranalyse und eine Hauptkomponentenanalyse der gemessenen Proben durchgeführt wurde. Für die folgenden statistischen Auswertungen müssen die Replikate der *T. saginata* Proben zu sogenannten summary spectra zusammengefasst werden. Hierfür wurde die automatisierte Funktion der BioNumerics Software Version 7.6. (AppliedMaths) genutzt. Als Clustermethode wurde hier die UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, eine Variante der hierarchischen Clusteranalyse genutzt. Als Vergleichseinstellungen wurde die Pearson-Korrelation gewählt. Für die Clusteranalyse wurde automatisiert von der Software ein peak-matching durchgeführt, die Einstellungen hier sind Folgende: constant toleranc $e = 1$; linear tolerance = 500; max. horizontal shift = 1 und peak direction rate = 10%. Bei der Clusteranalyse wird ein phylogenetischer Baum aus einer Distanzmatrix konstruiert. Hierfür wird die Hypothese der molekularen Uhr genutzt und die Daten werden in terminale Taxa anhand ihres genetischen Abstandes geclustert (Weiß & Göker, 2011). Die Ähnlichkeit der Proteinspektren kann mithilfe der Clustermethode durch die Erstellung eines Dendrogramms betrachtet werden.

Des Weiteren wurde mithilfe der BioNumerics Software Version 7.6. eine Hauptkomponentenanalyse, die principal component analysis (PCA), der summary spectra der *T. saginata* Proben durchgeführt und die Ergebnisse zwei- und dreidimensional visualisiert. Die PCA reduziert die Variablen eines komplexen Datensatzes auf der Basis verschiedener statistischer Tests und kann die Einträge anhand ihrer Verwandtschaft gruppieren. Die reduzierten Datensätze, die sogenannten PCs (principal components), können in einer Scoreplot-Darstellung visualisiert werden (A. Rettinger et al., 2012).

3.5.5.2. Auswertung und statistische Analyse von *T. saginata* in unterschiedlichen Lagerungsmedien

Die *T. saginata* Proben in den neuen Lagerungsmedien wurden sechsmal nach unterschiedlichen Einwirkzeiten gemessen (Einwirkzeit: zwei, vier, sechs, acht 12 und 24 Wochen). Zu jedem Messzeitpunkt wurden alle in den verschiedenen Aufbewahrungslösungen konservierten Proben zusammen auf ein MALDI-Target pipettiert. Jede neue Probe wurde auf jeweils acht Spots des Targets mit jeweils einem spezifischen Kalibrierungs-BTS verteilt. Alle Spots wurden viermal gemessen, um 32 Rohspektren pro Probe zu erzeugen. Für jede Probe in der neuen Aufbewahrungslösung wurde das Verfahren an zwei Replikaten am selben Tag und an einem Replikat, das mindestens 24 Stunden später gemessen wurde, durchgeführt. Dies soll erstens die Wiederholbarkeit und zweitens die Reproduzierbarkeit demonstrieren. Zusammengefasst erhielten wir insgesamt 96 Rohspektren für jede neue Probe zu jedem Messzeitpunkt.

Diese Rohspektren wurden mit der FlexAnalysis Software Version 3.4 (Bruker Daltonics) analysiert und aufbereitet. Die bereinigten Proteinspektren, die an den jeweiligen Messzeitpunkten gemessen wurden, wurden mit unserer in-house-Database verglichen, welche auch die Ausgangsprobe der Messreihe enthielt. Hierfür wurde die automatische Funktion des MALDI Biotyper Compass Explorer Software Version 3 (Bruker Daltonics) genutzt. Die Biotyper Software errechnet den oben beschriebenen LSV, sodass die Ähnlichkeit der Proteinspektren angegeben werden kann. So kann untersucht werden, ob sich die Intensität oder die Proteinpeaks der Proteinspektren durch eine unterschiedliche Lagerung über die Zeit verändern.

Die Proteinspektren wurden im weiteren Verlauf mithilfe der BioNumerics Software Version 7.6 (AppliedMaths) hierarchisch geclustert und eine Hauptkomponentenanalyse wurde durchgeführt. Die einzelnen Proteinspektren der Proben in den neuen Lagerungsmedien konnten mithilfe der BioNumerics Software in einem Dendrogramm visualisiert werden. In die BioNumerics Software wurden die Proteinspektren der Ausgangsmessung *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* und die Messungen von *T. saginata* Proglottiden nach zwei, 12 und 24 Wochen in den unterschiedlichen Lagerungsmedien aufgenommen. Aufgrund der Datengröße konnten nicht alle Messungen zu jedem Messzeitpunkt verwendet werden, sodass ein Vergleich der Proteinspektren zu Beginn, zur Halbzeit und zum Ende des Lagerungszeitraumes durchgeführt wurde. Für jede Probe wurden die 96 Proteinspektren in die Software geladen. Diese wurden einem automatisierten Bearbeitungsprozess unterzogen und die jeweils 32 Proteinspektren einer Messung wurden anschließend auf Isolate-Ebene

zusammengefasst. Um eine bessere Veranschaulichung zu gewährleisten, wurden die drei technischen Replikate der Ausgangsprobe *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* sowie die outgroup-Referenzprobe *D. latum proglottids* jeweils zu einem weiteren summary spectra auf species-Ebene zusammengefasst.

Diese zusammengefassten Proteinspektren wurden wie oben beschrieben mit der UPGMA-Methode geclustert und ein Dendrogramm wurde visualisiert.

3.6. Molekulargenetische Analyse

3.6.1. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Für die molekulare Analyse der Parasitenproben musste zuerst die DNA extrahiert werden. Hierfür wurden die in Natriumchlorid (NaCl) konservierten Proben aus dem Gefrierschrank aufgetaut. Nach Erreichen der Raumtemperatur wurde die DNA der Proben unter Verwendung des DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) extrahiert. Für die DNA-Extraktion wurde das Herstellerprotokoll (QIAGEN, 2020) genutzt, welches im Folgenden kurz erläutert wird. Die ca. 1 cm großen Gewebeproben, die zuvor den Proben entnommen wurden, wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit einem Stampfer in kleine Stücke zerkleinert. Für die DNA-Extraktion aus Parasiteneiern wurde 300 µl der jeweiligen Ei-Suspension in ein frisches Eppendorfgefäß gefüllt und direkt verwendet. Es wurden 180 µl des ATL-Puffers hinzugefügt, mittels Vortexens wurde die Probe gemischt und anschließend wurde 20 µl der Proteinkinase K hinzugefügt. Die Mischung wurde erneut gevortext und bei 56°C im Thermomixer (Eppendorf; Hamburg, Deutschland) für ca. eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mischung erneut gevortext und 200 µl des AL-Puffers und 200 µl Ethanol absolut 100% wurden hinzugegeben. Anschließend wurde die Mischung in den DNeasy Mini Spin pipettiert, welche in ein 2 ml Sammelröhrchen (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) eingesetzt wurde. Mit dem DNeasy Mini Spin, einer Säule mit einer Silica-Membran, wurden zwei Waschschriffe durchgeführt. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur und einer Minute Zentrifugation bei 800 rpm wurde die Flüssigkeit im Sammelröhrchen verworfen und die DNeasy Mini Spin in ein neues Sammelröhrchen platziert. Es wurden 500 µl des AW1 Buffers zugegeben und das Gemisch wurde erneut für eine Minute bei 800 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschriff wurde mit 500 µl des AW2 Buffers wiederholt. Die Probe wurde anschließend mit 200 µl AE Buffer eluiert, auf die Membran gegeben und erneut für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 800 rpm

zentrifugiert. Nach diesen Wasch- und Elutionsschritten befand sich die Parasiten - DNA im Zentrifugationsröhrchen und wurde für die folgenden Analysen bei - 20°C gelagert.

3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die gewonnene DNA der Parasitenproben wurde jeweils mittels PCR vervielfältigt, um anschließend weitere Analysen der Amplifikate durchführen zu können. Für die PCR wurden bereits etablierte Protokolle genutzt, welche im Folgenden für die jeweiligen Parasiten beschrieben werden.

***T. saginata* Proglottiden und *T. saginata* Eier**

Für die PCR-Amplifikation der *Taenia* Proben wurde das partielle mitochondriale Cytochromoxidase 1-Gen (*cox-1*) verwendet und eine Polymerase-Kettenreaktion nach einem zuvor von *Ng-Nguyen et al.* beschriebenen Protokoll durchgeführt (Ng-Nguyen et al., 2017). Dieses Protokoll wurde für alle *T. saginata* Proglottiden Proben sowie für die *T. saginata* Eier Proben genutzt. Es wurden der Vorwärtsprimer 5'-CATCATATGTTTACGGTTGG-3' und der Rückwärtsprimer 5'-GACCCTAATGACATAACATAAT-3' verwendet, die ein Gen von 350 bp amplifizieren. Der Assay besteht aus 12,5 µl Hotstart Mix (Qiagen, Deutschland), 0,5 µl des Vorwärtsprimers, 0,5 µl des Rückwärtsprimers, 9,5 µl Wasser und 2 µl der *Taenia* DNA. Die Zyklusbedingungen bestehen aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten, um die DNA-Stränge aufzutrennen, gefolgt von 56°C für eine Minute und 72°C für zwei Minuten. Danach wurden 45 Amplifikationszyklen durchgeführt jeder bestehend aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 Sekunden, einem Annealingschritt bei 56°C für 30 Sekunden und einem Extensionschritt bei 72°C für 30 Sekunden. Anschließend wurde ein finaler Extensionschritt bei 72°C für vier Minuten durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde dann im Thermocycler auf 7°C gekühlt und konnte danach für die weiteren Untersuchungen gelagert werden.

***D. latum* Proglottiden**

Für die molekulargenetische Analyse der *D. latum* Proben wurde nach der DNA-Extraktion das Gen der NADH dehydrogenase subunit 5 (*nad5*) genutzt, mit welchem in aktuellen Studien eine gute Unterscheidung der unterschiedlichen *Diphyllobothrium* Arten gezeigt wurde (Guo et al., 2012; Zhang et al., 2015). Es wurde der Vorwärtsprimer 5'-ATGCTTTTTATGTCAGTTTGTTTAATTAGA-3' und der Rückwärtsprimer 3'-

TACTCCTATAAATGGTGCACCCG-‘5 verwendet, die ein Gen von 1208 bp amplifizieren (Guo et al., 2012). Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die Zyklusbedingungen auf einen initialen Denaturierungsschritt von 94°C für drei Minuten geändert. Darauf folgten 35 Zyklen bestehend aus jeweils einer Minute bei 95°, 30 Sekunden bei 55°C und 1.30 Minuten bei 72°C. Der finale Extensionsschritt bestand aus zehn Minuten bei 72°C. Anschließend wurde das Amplifikationsprodukt bei 8°C gelagert.

***D. nihonkaiense* Proglottiden**

Die Polymerase-Kettenreaktion für *D. nihonkaiense* wurde ebenfalls nach DNA-Extraktion mit dem Gen der NADH dehydrogenase subunit 5 (*nad5*) durchgeführt und das oben beschriebene Protokoll genutzt.

3.6.3. Gel-Elektrophorese und Sequenzierung

Nach PCR-Amplifikation aller Proben wurde eine Gel-Elektrophorese der Analyse durchgeführt, um das Vorhandensein von parasitärer DNA zu überprüfen. Bei Nachweis von DNA wurde anschließend eine Aufreinigung der Probe angeschlossen. Bei diesem Aufreinigungsprozess wurden störende Bestandteile wie zum Beispiel zuvor hinzugefügte Primer entfernt, sodass am Ende die reine DNA zurückblieb. Diese reine DNA wurde in einer Sequenzierungs-PCR in einen Vorwärts- und einen Rückwärtsstrang amplifiziert. Die so amplifizierte DNA wurde in einem weiteren Verfahren erneut aufgereinigt und nach getrennter Zugabe der Primer wurde die finale Sequenzierung der Proben gestartet. Nachfolgend werden diese Schritte kurz erläutert.

Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde für alle Parasitenproben nach hausinternen Standards mit 1%-Agarosegel, bei 150 V für 50 min durchgeführt. Bei Vorhandensein von DNA konnte sich die Wanderung der geladenen DNA-Teilchen zur Anode mittels eines fluoreszierenden Ladepuffers anfärben lassen und die typische Bandenstruktur im jeweiligen Basenpaarbereich konnte festgestellt werden. Das Agarosegel wurde nach hausinternen Standards mit 2g Agarose und einem TBE-Puffer hergestellt, während der Ladepuffer aus einer verdünnten Sybr-Gold-Lösung besteht. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das automatisierte Dokumentationssystem Gel Doc XR+ (Bio-Rad) mit der Image Lab 4.0.1 Software verwendet und die Bilder digital abgespeichert.

Nach Überprüfung des Amplifizierungserfolges mittels Gelelektrophorese wurde eine Sequenzierung der Parasiten-DNA durchgeführt.

Aufreinigung und Sequenzierungs-PCR

Die Probenaufreinigung für die Sequenzierungs-PCR erfolgte nach hausinternen Standards mit AMPure XP Magnetbeads (Beckmann Coulter). Hierfür wurde 10 µl des PCR-Amplifikats auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 18 µl AMPure XP Magnetbeads vermischt. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probenplatte wurde dann für zwei Minuten auf einer magnetischen Trennplatte (MTP) zum Isolieren der magnetischen Anteile im Bodensatz gelagert. Anschließend wurde das komplette Volumen bis auf den Bodensatz der Probe pipettiert und verworfen. Der Bodensatz wurde mit zwei Waschschritten mit jeweils 200 µl 70% Ethanol Lösung für 30 Sekunden ausgewaschen und darauffolgend wurden 40 µl Wasser hinzugegeben und in der Probe gelöst.

Die Platte wurde erneut für einen Auftrennungsmechanismus für eine Minute auf die Magnetplatte gestellt, anschließend wurde das Eluat in ein 5 ml Röhrchen übergeben. 5 µl der so aufgereinigten DNA wurden mit jeweils 1 µl der jeweiligen probenspezifischen Primer vermischt. Die Zyklusbedingungen der Sequenzierungs-PCR bestanden aus 30 Zyklen mit jeweils 96°C für 20 Sekunden, 50°C für 20 Sekunden und 60°C für vier Minuten.

Aufreinigung und Sequenzierung

Nach der Sequenzierungs-PCR wurde eine erneute Aufreinigung durchgeführt, um unverbrauchte Puffersubstanzen zu entfernen. Von dem neu amplifizierten Probenvolumen wurden jeweils 10 µl mit 10 µl Magnetbeads und 42 µl 85% Ethanol-Lösung vermischt. Nach einem erneuten Auftrennungsprozess von drei Minuten auf der magnetischen Trennplatte wurde anschließend der Überstand verworfen und der verbliebene Bodensatz mit 100 µl 85% Ethanol gewaschen. Nach 30 Sekunden wurden die Proben von der Magnetplatte entfernt und es wurde 40 µl der SLS Lösung (sample loading solution, Beckman Coulter; Brea, USA) hinzugegeben. Nach erneuten fünf Minuten auf der Magnetplatte wurde in einem letzten Schritt zum Schutz vor Verdunstung zu jeder Probe ein Tropfen Mineralöl hinzugefügt.

3.6.4. Sequenzanalyse

Zur Bestätigung einer erfolgreichen Sequenzierung wurden die Nukleotidsequenzen der Parasitenproben in einem ersten Schritt mit der FinchTV Softwareversion 1.4 (Geospiza, Inc.; Seattle, Washington, USA) betrachtet. Sequenzen, die keine oder zu wenige Peaks darstellten, wurden wiederholt. Anschließend wurde eine ausführliche Sequenzanalyse durchgeführt, die sich in zwei Abschnitte gliederte: zuerst wurde ein Editierungs- und ein Bearbeitungsprozess der Sequenzen mit der BioEdit[®] Software Version 7.2.5 (Tom Hall; Carlsbad, USA) durchgeführt. Anschließend wurden die bearbeiteten Sequenzen in einer phylogenetischen Stammbaumanalyse miteinander verglichen (BioEdit[®] Software und MEGA Software Version 6 (Pennsylvania, USA)).

Die Nukleotidsequenzen wurden in der BioEdit-Software geöffnet und bearbeitet. Es wurden fehlerhafte Basenpeaks anhand des Chromatogramms ersetzt und der ungenaue Anfang und das ungenaue Ende der Sequenzen wurde getrimmt. Weiterführend wurde die Vorwärts- und die Rückwärtssequenz mit einem pairwise alignment zusammengeführt, sodass aus den beiden Einzelsequenzen eine gemeinsame sogenannte consensus sequence entstand. Die jeweiligen Consensus Sequenzen wurden dann mit der Online-Datenbank BLAST des US-amerikanischen National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen und eine Sequenzähnlichkeitssuche wurde durchgeführt. Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) findet Regionen mit lokaler Ähnlichkeit zwischen Protein- oder auch Nukleotidsequenzen und berechnet die statistische Bedeutung der Übereinstimmungen (Wheeler & Bhagwat, 2007). Hierfür durchsucht BLAST die Datenbank nach Übereinstimmungen zwischen den in der Abfragesequenz indizierten Abfolgen und den in den Datenbanksequenzen gefundenen Zeichenfolgen und führt ein lokales alignment, also eine Gegenüberstellung von Abschnitten der gesuchten Sequenz mit ähnlichen Abschnitten aus der Datenbank, durch. Die von BLAST bei einer Suche gefundenen Ähnlichkeiten werden bewertet und mit einem statistischen Wert, dem expected value (E.-Value), versehen. Dieser E.-Value beschreibt, wie oft man eine Übereinstimmung in einer Datenbank dieser Größe zufällig erwarten würde. Es ist ein Maß für die Signifikanz der Treffer. Je niedriger der E-Wert ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung und desto unwahrscheinlicher ist der Treffer eine zufällige Übereinstimmung (Local & Search, 2007). Ein weiterer wichtiger statistischer Wert ist die percent identity. Die percent identity gibt Aufschluss darüber, wie ähnlich die Abfragesequenz zur Zielsequenz ist und beschreibt somit die Signifikanz der Übereinstimmung des Abgleichs. Query cover beschreibt, wie viel der Abfragesequenz von der Zielsequenz abgedeckt wird und gibt somit an, wie lang die Sequenzen im Verhältnis zueinander sind.

In einem weiteren Schritt wurden die Nukleotidsequenzen der Parasitenproben miteinander verglichen, indem ein phylogenetischer Baum (Sequenzstammbaum) erstellt wurde. Hierfür wurde die MEGA Software Version 6 (Pennsylvania, USA) verwendet. Ein phylogenetischer Baum gibt eine Schätzung der Relation verschiedener Sequenzen untereinander an und stellt diese anschaulich in einem Baumdiagramm dar. Mit dieser Analysemethode ist es möglich, die Verwandtschaft von Proben und ihre Beziehung zueinander einzuordnen. Die Erstellung des phylogenetischen Baumes wurde nach international gültigen Protokollen durchgeführt (Hall, 2013). Hierfür wurden alle zuvor erstellten Consensus Sequenzen gemeinsam in die BioEdit Software geladen. Diese zusammengefassten Nukleotidsequenzen wurden mit dem clustalW multiple alignment aligniert, um eine möglichst identische Ausrichtung der Sequenzen zu gewährleisten. Um die entstandene Basenlücken zu entfernen, wurde anschließend ein minimize alignment durchgeführt. Danach wurde erneut ein trimming der Enden der Sequenzen durchgeführt, sodass alle Nukleotidsequenzen über die gleiche Anzahl an Basenpaaren verfügten.

Die bearbeiteten Sequenzen wurden zusammen in die MEGA6-Software geladen und ein phylogenetischer Stammbaum wurde erstellt. Hierfür wurde zuerst das beste DNA-Modell für die Erstellung des Baumes ermittelt. Dieses lässt sich mithilfe des AICc-Wertes entscheiden. AICc (Akaike-Information-Criterion corrected) dient dem Vergleich verschiedener Modellmöglichkeiten, das Modell mit dem niedrigsten AICc Wert wird für die Sequenzstammbaumanalyse favorisiert. Als bestes Modell wurde anhand des AICc-Werts das GTR + G Model gewählt. Anschließend wurde der Sequenzstammbaum nach der Neighbour-Joining-Methode erstellt, indem mit der Maximum Likelihood (ML)-Methode die phylogenetische Ähnlichkeit berechnet wurde (Saitou & Nei, 1987). Dies sind automatisierten Funktionen der MEGA6 Software, welche eine Vielzahl von Substitutionsmodellen verwenden.

Die acht Nukleotidsequenzen der *T. saginata* Proben wurden an insgesamt 248 Positionen der Nukleotidabfolge untersucht worden; Positionen, die keine Übereinstimmung oder gaps (Lücken in der Basenabfolge) zeigten, wurden entfernt. Der erstellte phylogenetische Stammbaum zeigt die evolutionären Beziehungen der untersuchten Proben an (Tamura et al., 2013).

3.7. Geräte, Reagenzien und Software

3.7.1. Massenspektrometrische Untersuchung

Target Reinigung

80 % Trifluoressigsäure	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
70 % Ethanol	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
HPLC-Reinstwasser	Sigma-Aldrich
KimWipe-Präzisionswischtuch	Kimberly-Clark

Matrix Aufarbeitung

2,5mg HCCA portioned	Bruker Daltonics
Acetonitril	Sigma-Aldrich
HPLC-Reinstwasser	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich
Vortexer	Scientific Industries

Lagerungsmedien und Probenaufarbeitung

70 % Ethanol	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
0,45% Natriumchlorid (NaCl)	CareFusion, USA
37% Formalin	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
HPLC-Reinstwasser	Sigma-Aldrich

Messung und Auswertung

HCCA-Matrix (aufbereitet)	
Bacterial Test Standart (BTS)	Bruker Daltonics; Bremen, Germany
MALDI-TOF Microflex MS	Bruker Daltonics; Bremen, Germany
MicroScout Target (MSP 96 target polished steel)	Bruker Daltonics; Bremen, Germany
FlexAnalysis (Software)	Bruker Daltonics; Bremen, Germany
MALDI Biotyper Compass Explorer (Software)	Bruker Daltonics; Bremen, Germany
Bionumerics (Software)	AppliedMaths, N.V.; Sint-Martens-Latem, Belgium
Excel (Software)	Microsoft
Word (Software)	Microsoft

3.7.2. Molekulargenetische Untersuchung

DNA-Extraktion

DNeasy Blood and Tissue Kits	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Sammelröhrchen	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland

Polymerase-Kettenreaktion

Hotstart Mix	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland
Primer Taenia cox-1	Biometer; Ulm, Deutschland
Primer Diphylobothrium nad-5	Biometer; Ulm, Deutschland
TopTaq Master Mix	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland
Thermocycler PeqSTAR 2X	PeqStar; VWR International GmbH, Darmstadt

Gelelektrophorese

Dokumentationssystem Gel Doc XR+	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Kammer (Sub - Cell GT)	Bio-Rad, München
1% Agarosegel (aufbereitet)	
Sybr-Gold-Lösung	Invitrogen, Oregon, USA
Ladepuffer	VWR International GmbH, Darmstadt

Aufreinigungs-PCR und Sequenzierung

Magnetische Trennplatte	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Mikrotitrierplatte	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
85% Ethanol	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
70 % Ethanol	Merck KG; Darmstadt, Deutschland
AMPure XP	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Magnetbeads	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
TBE-Buffer	AppliChem GmbH, Darmstadt
SLS Lösung	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Mineralöl	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Gerät Genome Lab GeXP	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
peqSTAR Thermocycler	VWR; Radnor, USA
FinchTV Geospiza (Software)	Seattle, Washington, USA

BioEdit© (Software)

Tom Hall; Carlsbad, Kalifornien, USA

BLAST-Datenbank

US-amerikanischen National Center for
Biotechnology Information (NCBI)

MEGA6 (Software)

Pennsylvania, USA

4. Ergebnisse

4.1. Validierung der MALDI-TOF MS basierten Diagnostik von *T. saginata*

4.1.1. Massenspektrometrische Messung der Parasitenproben

4.1.1.1. Analyisierte Helminthen-Proben

Wie **Tabelle 3** zeigt, konnte keine der acht analysierten *Taenia* Proben mit der alleinigen Bruker Database für Bakterien und Pilze identifiziert werden (0% Identifikationsrate). Es wurde für jede Probe repräsentativ der am häufigsten identifizierte Organismus angegeben, wobei sich dabei durchweg LSVs < 1,69 zeigten, die keiner hinreichend genauen Art- oder Speziesidentifizierung entsprachen. Eine bakterielle oder mykotische Kontamination der Proben bestand damit nicht. Insgesamt mussten 30 der insgesamt 384 gemessenen Proteinspektren aufgrund von Flat- oder Outlines verworfen werden.

Abgleich mit der Bruker Database					
Probenname	Verworfenne Proteinspektren	Genutzt Proteinspektren	Identifikations - rate	Bester Identifikationsorganismus	LSV - Mittelwert
<i>Taenia saginata proglottids_Basel_1</i>	0	n = 32	0%	Nocardia sp MB_9090_05 THL	1,31
<i>Taenia saginata proglottids_Basel_2</i>	3	n = 29	0%	Nocardia sp MB_9090_05 THL	1,28
<i>Taenia saginata proglottids_Basel_3</i>	1	n = 31	0%	Arthrobacter monumenti DSM 16405T DSM	1,36
<i>Taenia saginata proglottids_6771_1</i>	0	n = 32	0%	Serratia marcescens 13103_1 CHB	1,39
<i>Taenia saginata proglottids_6771_2</i>	0	n = 32	0%	Serratia marcescens 13103_1 CHB	1,35
<i>Taenia saginata proglottids_6771_3</i>	0	n = 32	0%	Proteus mirabilis 13210_1 CHB	1,41
<i>Taenia saginata proglottids_6517_1</i>	4	n = 28	0%	Lactobacillus malefermentans DSM 20570 DSM	1,35
<i>Taenia saginata proglottids_6517_2</i>	4	n = 28	0%	Lactobacillus paraplantarum DSM 10641 DSM	1,31
<i>Taenia saginata proglottids_6517_3</i>	0	n = 32	0%	Lactobacillus paraplantarum DSM 10641 DSM	1,28
<i>Taenia saginata proglottids_HOM1</i>	5	n = 27	0%	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	1,29
<i>Taenia saginata proglottids_HOM2</i>	6	n = 26	0%	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	1,36
<i>Taenia saginata proglottids_HOM3</i>	5	n = 27	0%	Clostridium difficile MB_1562_05 THL	1,42
<i>Taenia saginata proglottids_Homburg_1508828_1</i>	4	n = 28	0%	Lactobacillus bifermens DSM 20003T DSM	1,32
<i>Taenia saginata proglottids_Homburg_1508828_2</i>	0	n = 32	0%	Burkholderia thailandensis DSM 13276T HAM	1,28
<i>Taenia saginata proglottids_Homburg_1508828_3</i>	0	n = 32	0%	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1,34
<i>Taenia saginata proglottids_Tokyo_1</i>	2	n = 30	0%	Lactobacillus coryniformis ssp coryniformis DSM 20007 DSM	1,36
<i>Taenia saginata proglottids_Tokyo_2</i>	4	n = 28	0%	Arthrobacter globiformis DSM 20124T DSM	1,41
<i>Taenia saginata proglottids_Tokyo_3</i>	0	n = 32	0%	Arthrobacter globiformis DSM 20124T DSM	1,4
<i>Taenia saginata eggs_1</i>	0	n = 32	0%	Methylobacterium mesophilicum MBI62 UFL	1,36
<i>Taenia saginata eggs_2</i>	0	n = 32	0%	Clostridium difficile MB_7476_05 THL	1,35
<i>Taenia saginata eggs_3</i>	0	n = 32	0%	Methylobacterium mesophilicum MBI62 UFL	1,38
<i>Taenia saginata eggs_8412_1</i>	0	n = 32	0%	Lactobacillus acidipiscis DSM 15353 DSM	1,35
<i>Taenia saginata eggs_8412_2</i>	3	n = 29	0%	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1,32
<i>Taenia saginata eggs_8412_3</i>	2	n = 30	0%	Lactobacillus plantarum DSM 20205 DSM	1,36
<i>Diphyllobothrium latum proglottids_1</i>	0	n = 32	0%	Pseudomonas migulae CIP 105470T HAM	1,39
<i>Diphyllobothrium latum proglottids_2</i>	7	n = 25	0%	Pseudomonas migulae CIP 105470T HAM	1,46
<i>Diphyllobothrium latum proglottids_3</i>	5	n = 27	0%	Pseudomonas migulae CIP 105470T HAM	1,42
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids_1</i>	6	n = 26	0%	Pseudomonas alcaligenes DSM 50342T HAM	1,35
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids_2</i>	4	n = 28	0%	Aeromonas schubertii CECT 4240T DSM	1,42
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids_3</i>	4	n = 28	0%	Aeromonas schubertii CECT 4240T DSM	1,37

Tabelle 3: Proteinspektren der parasitologischen Proben in diesem Projekt.

Die Proteinspektren aller gemessenen Parasitenproben wurden mithilfe der MBT Compass Explorer Software gegen die Bruker Database für Bakterien und Pilze getestet. Dargestellt sind die Anzahl an verworfenen Proteinspektren, die Anzahl *n* der genutzten Proteinspektren sowie die Identifikationsrate mit der Bruker Database mit dem besten Identifikationsorganismus und dem Durchschnitt des Log Score Values (LSV). Der Durchschnitt der LSV wird stets mit < 1,69 angegeben, was keine sichere Identifikation zulässt.

4.1.1.2. Visuelle Analyse der Proteinspektren

Die Proteinspektren der Parasitenproben wurden visuell mit der FlexAnalysis Software betrachtet und sind exemplarisch in **Abbildung 11** wiedergegeben. Betrachtet man die Ausgangsprobe *T. saginata proglottids Basel* (1) genauer, lassen sich charakteristische Proteinpeaks bei 3964.90 m/z, 6502.52 m/z, 6896 m/z, 7066 m/z, 7289.14 m/z und 7837.81 m/z erkennen. Die Intensität ist mit ca. 6000 a.u. angegeben.

Die Probe *T. saginata proglottids 6771* (2) zeigt ein ähnliches Proteinspektrum mit Proteinpeaks bei 3968.33 m/z, 6502.32. m/z, 7289.24m/z und 7937.74 m/z. Die Intensität des gewählten Proteinspektrums ist hier deutlich höher mit $>1 \times 10^4$ a.u.. *T. saginata proglottids 6517* (3) zeigt Proteinpeaks bei 3968.15 m/z, 4872.12 m/z, 6502.03 m/z, 7288.92 m/z und 7937.15 m/z, welche mit einer Intensität von ca. 2×10^4 a.u. ähnlich der Proteinspektren zuvor sind.

Bei der Probe *T. saginata proglottids HOM* lassen sich Proteinpeaks bei 3969.30 m/z, 5430.30 m/z, 6503.80 m/z, 7289.96 m/z und 7938.48 m/z feststellen. Die Intensität hier ist leicht erniedrigt mit ca. 6000 a.u..

Die Proteinspektren von *T. saginata proglottids Homburg 1508828* zeigen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Proben unterschiedliche Proteinpeaks. Charakteristische Peaks finden sich hier bei 5435.25 m/z, 7288 m/z und 7938.48 m/z.

Die Intensität beträgt ca. 6000 a.u.. *T. saginata proglottids Tokyo* zeigt bei < 4000 a.u. eine deutlich herabgesetzte Intensität der Proteinspektren. Proteinpeaks lassen sich bei 2623.42 m/z, 3528.17 m/z, 6503.19 m/z, 6896 m/z und 7066 m/z detektieren.

T. saginata eggs zeigt charakterisitsche Proteinpeaks bei 6501.54 m/z, ca. 6896 m/z und 7936.92 m/z bei einer Intensität von $>1 \times 10^4$ a.u..

Bei der Probe *T. saginata eggs 8412* lassen sich Proteinpeaks bei 2379.65 m/z, 3199.08 m/z, 3580.26 m/z, 4371.08 m/z, 5169.49 m/z, 6528.94 m/z, 7063.29 m/z und 14121.70 m/z finden. Die Intensität wird mit $>1.0 \times 10^4$ a.u. angegeben.

Proteinspektren von *D. nihonkaiense proglottids* sind mit sehr hoher Intensität von ca. 4×10^4 a.u. gemessen worden. Charakteristische Peaks finden sich hier bei 3956.13 m/z, 6065.07 m/z, 6675.67 m/z und 7913.15 m/z.

D. latum proglottids zeigt Proteinpeaks bei 3346.15 m/z, 4047.16 m/z, 5049.73 m/z, 6692.44 m/z und 8094.51 m/z, die Intensität der Messung ist mit 0.5×10^4 a.u. angegeben.

Die charakteristischen Proteinpeaks aller gemessenen Parasitenproben wurden tabellarisch zusammengefasst (vergleiche **Tabelle 4**).

Sichtbar ist, dass *T. saginata proglottids Basel* sowie *T. saginata proglottids 6771*, *T. saginata proglottids 6517*, *T. saginata proglottids HOM* und *T. saginata eggs* sehr ähnliche Proteinspektren zeigen. Vor allem die Proteinpeaks bei 6502 m/z, 7289 m/z und 7937 m/z lassen sich bei allen genannten Proben mit zumeist hoher Intensität finden. Die Proteinspektren von *T. saginata proglottids Homburg 1508828* und *T. saginata proglottids Tokyo* zeigen deutliche Unterschiede zu den zuvor genannten Proteinspektren, ähneln sich allerdings in einzelnen Peaks (vergleiche **Tabelle 4**). Das Proteinspektrum der Probe *T. saginata eggs 8412* ist hiervon deutlich zu unterscheiden, eine Ähnlichkeit zu den zuvor genannten *T. saginata* Proteinspektren lässt sich nicht erkennen. Alle gemessenen *Diphyllobothrium* Proben unterscheiden sich anhand der vorhandenen Proteinpeaks deutlich von den *Taenia* Proteinspektren.

Probenname	Proteinpeaks in m/z (Proteingröße) von 2379 - 6065 m/z														
	2379	2623	3346	3528	3580	3907	3956	3965	4047	4371	4872	5169	5432	5672	6065
<i>Taenia saginata proglottids Basel</i>								+							
<i>Taenia saginata proglottids 6771</i>								++							
<i>Taenia saginata proglottids 6517</i>								++			++				
<i>Taenia saginata proglottids HOM</i>								+					+		
<i>Taenia saginata proglottids Homburg 1508828</i>													++		
<i>Taenia saginata proglottids Tokyo</i>		++		+											
<i>Taenia saginata eggs</i>								+					+		
<i>Taenia saginata eggs 8412</i>	+				++					+		+			
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids</i>							++								++
<i>Diphyllobothrium latum proglottids</i>			+						+						

Probenname	Proteinpeaks in m/z (Proteingröße) von 6502 - 1412 m/z														
	6502	6528	6692	6813	6896	7066	7288	7299	7699	7817	7837	7913	7937	8094	14121
<i>Taenia saginata proglottids Basel</i>	++				++		++				+		+		
<i>Taenia saginata proglottids 6771</i>	+						++						++		
<i>Taenia saginata proglottids 6517</i>	++				+		++						++		
<i>Taenia saginata proglottids HOM</i>	+						++						++		
<i>Taenia saginata proglottids Homburg 1508828</i>							++		++				+		
<i>Taenia saginata proglottids Tokyo</i>	++				++	++									
<i>Taenia saginata eggs</i>	++				++								+		
<i>Taenia saginata eggs 8412</i>		+				++									+
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids</i>												++			
<i>Diphyllobothrium latum proglottids</i>			++											++	

Tabelle 4: Proteinpeaks der einzelnen Parasitenproben tabellarisch zusammengefasst.

Visuelle Analyse der Proteinspektren in der FlexAnalysis Software. Für jede Probe sind repräsentativ die Proteinpeaks mit der höchsten Intensität ausgewählt worden. Die Proteinpeaks der verschiedenen Proteinspektren wurden manuell mit einer Toleranz von +/- 5 m/z einem Bereich zugeordnet. + = Proteinpeak vorhanden ++ = Proteinpeak in hoher Intensität vorhanden

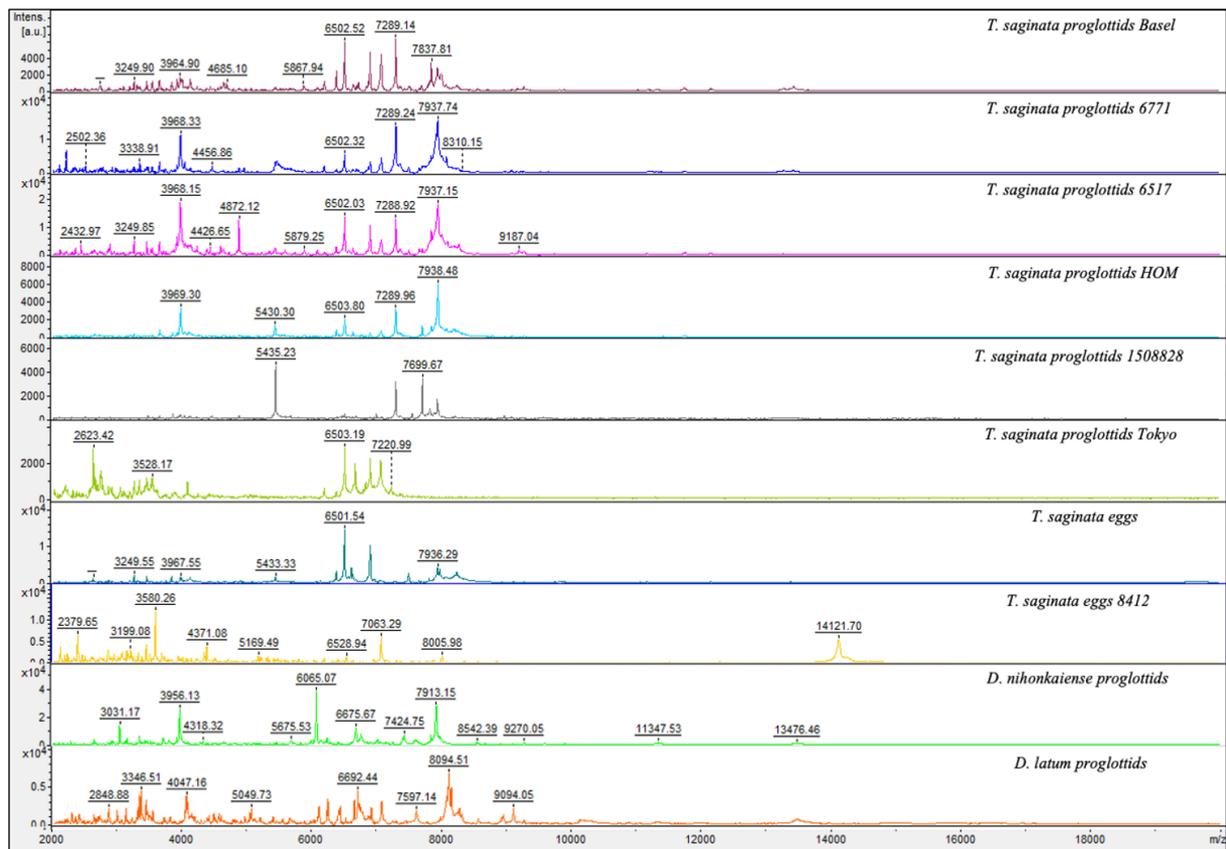


Abbildung 11: Visuelle Darstellung der Proteinspektren der Parasitenproben mit der FlexAnalysis Software. Für jede gemessene Parasitenprobe wurde nach Bearbeitung der Proteinspektren repräsentativ ein Proteinspektrum mit hoher Intensität ausgewählt und dient als Vergleichsspektrum. Die X-Achse beschreibt die mass-charge-ratio (m/z) und die Y-Achse beschreibt die Intensität (a.u.) der Proteinspektren.

4.1.1.3. Validierung der in-house-Database

Um die vorhandene in-house-Database zu testen, wurde ein blind test durchgeführt (s. Methoden-Kapitel). Alle gemessenen Parasitenproben wurden mithilfe der MALDI BioTyper Compass Explorer Software mit der Bruker Standarddatenbank für Bakterien und Pilze in Kombination mit der entwickelten in-house-Database verglichen. Die Ausgangsprobe *T. saginata proglottids* aus Basel diente der in-house-Database als *T. saginata* Referenzprobe. Nach Abgleich der Proteinspektren zeigte sich (**Tabelle 5**), dass sechs der insgesamt sieben neuen Proben *T. saginata* korrekt identifiziert werden konnten. Diese Identifikation konnte bei zwei der sechs neuen Proben mit einem LSV $>2,0$ sicher auf Gattungs- und wahrscheinlich auf Spezies-/Art-Ebene erfolgen (in der Tabelle grün hinterlegt). Eine Probe (*T. saginata* Eier) konnte mit einem LSV $>1,7$ wahrscheinlich auf Gattungsebene identifiziert werden (in der Tabelle gelb hinterlegt). Bei drei weiteren Proben (*T. saginata* Proglottiden) konnte die Software zwar Ähnlichkeiten mit dem Referenzspektrum *T. saginata proglottids* erkennen, die

Identifikation zeigte mit einem LSV $<1,7$ jedoch keine sichere Identifizierung an (rote Hinterlegung in Tabelle). Zwei dieser Proben (*T. saginata proglottids HOM* und *T. saginata proglottids Homburg 1508828*) zeigen mit einer Identifikationsrate zwischen 70-96% sowie LSVs $>1,66$ eine nahezu gattungsspezifische Identifizierung an. Die Probe *T. saginata proglottids* aus Tokyo wurde in wiederholten Messungen falsch identifiziert (LSV $<1,4$). Ebenso konnte eine Probe mit *T. saginata* Eiern (Ursprung: Basel) nicht identifiziert werden.

Bei den als *outgroup*-Referenzen genutzten Parasitenproben *D. latum proglottids* und *D. nihonkaiense proglottids* konnte die Software erwartungsgemäß keine Ähnlichkeiten im Proteinspektrum mit der in-house-Database finden.

Abgleich mit der Bruker Database & der in-house-Database						
Probenname	Flatline Spektre	Falsch identifizierte Spektren	Identifikationsrate	Identifikationsorganismus	LSV - Score Mittelwert	
<i>Taenia saginata proglottids Basel</i>	4	0	94%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	2,4	
<i>Taenia saginata proglottids 6771</i>	0	0	100%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	2,1	
<i>Taenia saginata proglottids 6517</i>	8	0	92%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	2,05	
<i>Taenia saginata proglottids HOM</i>	16	14	70%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	1,66	
<i>Taenia saginata proglottids Homburg 1508828</i>	4	0	96%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	1,69	
<i>Taenia saginata proglottids Tokyo</i>	6	76	15%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	1,37	
<i>Taenia saginata eggs</i>	0	1	95%	<i>Taenia saginata proglottids</i>	1,7	
<i>Taenia saginata eggs 8412</i>	5	91	0%	keine Identifikation	-	
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids</i>	12	84	0%	keine Identifikation	-	
<i>Diphyllobothrium latum proglottids</i>	14	82	0%	keine Identifikation	-	

Tabelle 5: Validierung der in-house-Database. Alle gemessenen Proteinspektren wurden mithilfe der MALDI Biotyper Compass Explorer Software mit der Bruker Standarddatenbank für Bakterien und Pilze sowie der bestehenden in-house-Database verglichen. Ein Exemplar der Ausgangsprobe *T. saginata proglottids Basel* wurde zur MSP-Überprüfung dem Abgleich hinzugefügt und dient der in-house-database als Referenzprobe für *T. saginata* (blau hinterlegt). Die Mittelwerte der LSVs wurden entsprechend der gültigen Kriterien farblich markiert:

2,3-3,0	grün	=	sehr wahrscheinliche gattungs- und artspezifische Identifikation
2,0-2,29	grün	=	sichere gattungs- und wahrscheinliche artspezifische Identifikation
1,7-1,99	gelb	=	wahrscheinliche gattungs- und unsichere artspezifische Identifikation
0,0-1,69	rot	=	keine zuverlässige Identifikation

4.1.1.4. Erweiterte Validierung der in-house-Database

Bei der erweiterten Validierung der in-house-Database wurden die unbearbeiteten Proteinspektren aller Parasitenproben erneut mit der Kombination aus der Bruker Standarddatenbank zur Bakterienidentifikation und der in-house-Database verglichen. Hier wurden zusätzlich MSPs der neu gemessenen

Parasitenproben unserer in-house-Datenbank hinzugefügt, wodurch sich eine Verbesserung der Identifikation zeigte.

Es lässt sich feststellen, dass die durchschnittlichen Identifikationsraten und LSV-Mittelwerte ansteigen, je größer die Anzahl an *Taenia* Proteinspektren in der zu vergleichenden Datenbank ist (vergleiche **Tabelle 6**). Im Mittel ist eine Zunahme des LSVs von 0,05 und der Identifikationsrate von 1% bei den identifizierbaren *Taenien* zu beobachten. Nach Hinzufügen der verschiedenen MSPs zu der vergleichenden Datenbank lässt sich die Probe *T. saginata proglottids HOM* mit einem LSV von 1,72 mit 72% identifizieren. Daraus resultiert eine wahrscheinliche gattungs- und unsichere artspezifische Identifikation. Ebenso kann die Probe *T. saginata proglottids Homburg 1508828* nach der erweiterten Validierung der Datenbank mit einem LSV von 1,73 und 96% wahrscheinlich auf Gattungsebene und unsicher auf Artebene identifiziert werden. Zudem sieht man eine verbesserte Identifikation der Proben *T. saginata eggs*, *T. saginata proglottids Tokyo*, *T. saginata proglottids 6517* und *T. saginata proglottids 6771*. Die als outgroup-Proben gewählten Vertreter *D. latum proglottids* und *D. nihonkaiense proglottids* zeigten auch nach erweiterter Diagnostik keine zulässige Identifikation.

Die Veränderung der LSV-Mittelwerte sowie der Identifikationsrate wurden in einem Diagramm visualisiert (vergleiche **Abbildung 12**). Insgesamt konnten nach Erweiterung der in-house-Datenbank fünf von sieben *T. saginata* Proben (71%) wahrscheinlich auf Gattungsebene identifiziert werden.

Probenname	LSV - Mittelwerte		Identifikationsrate	
	Bruker Database & in-house-database	Bruker Database & in-house-database & MSPs der Proben	Bruker Database & in-house-database	Bruker Database & in-house-database & MSPs der Proben
<i>T. saginata proglottids Basel</i>	2,4	2,4	99%	99%
<i>T. saginata proglottids 6771</i>	2,1	2,2	100%	100%
<i>T. saginata proglottids 6517</i>	2,05	2,1	92%	92%
<i>T. saginata proglottids HOM</i>	1,66	1,72	70%	72%
<i>T. saginata proglottids Homburg 1508828</i>	1,69	1,73	96%	96%
<i>T. saginata proglottids Tokyo</i>	1,37	1,38	15%	18%
<i>T. saginata eggs</i>	1,7	1,72	95%	98%
<i>T. saginata eggs 8412</i>	0	0	0%	0%
<i>D. latum proglottids</i>	0	0	0%	0%
<i>D. nihonkaiense proglottids</i>	0	0	0%	0%

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Mittelwerte, der Identifikationsraten und LSVs nach Abgleich der Proteinspektren mit der Bruker Database in Kombination mit der in-house-Datenbase und den jeweiligen MSPs der Parasitenproben. Es wurden die Mittelwerte der log score values sowie der Identifikationsraten berechnet, nachdem der in-house-Datenbase jeweils ein MSP der zuvor gemessenen Proteinspektren hinzugefügt wurde. Es lässt sich eine Zunahme der LSVs und Identifikationsrate nach Hinzufügen der MSPs zur vergleichenden Datenbank feststellen.

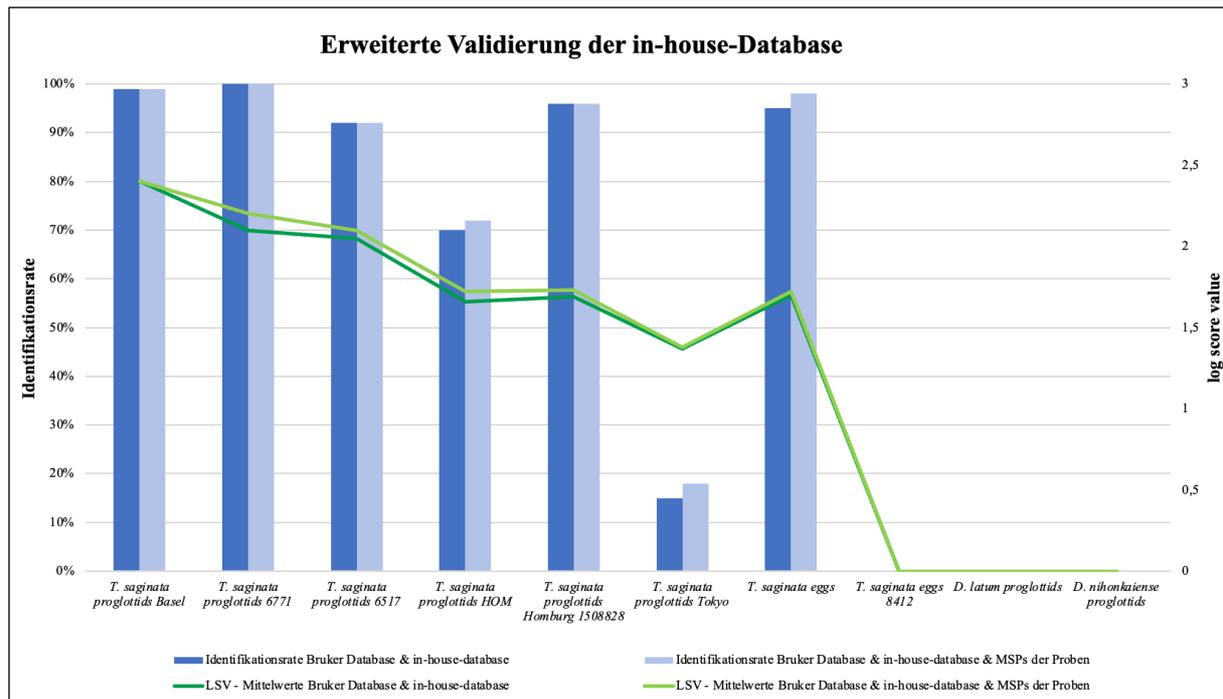


Abbildung 12: Diagramm zur Visualisierung der Veränderung der Mittelwerte der LSVs und der Identifikationsrate nach Abgleich der Proteinspektren mit der Bruker Database + der in-house-Database sowie nach Hinzufügen von MSPs zu diesem Abgleich. Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der Identifikationsrate in % angegeben, die Y-Achse beschreibt die Mittelwerte des log score values. Insgesamt lässt sich eine Zunahme beider Werte nach Vergleich der Proteinspektren mit der Datenbank plus den neuen MSPs feststellen.

4.1.1.5. Statistische Analyse

Clusteranalyse

Es wurde mit der BioNumerics Software ein Dendrogramm (vergleiche **Abbildung 13**) aus den jeweils drei technischen Replikaten der Parasitenproben erstellt. Das Dendrogramm basiert auf den massenspektrometrisch erzeugten artspezifischen Profilen, die mithilfe einer Clustermethode anhand ihrer Ähnlichkeit gruppiert werden können. Im Dendrogramm lassen sich beträchtliche Unterschiede zwischen den Proben *T. saginata* und den Proben *Diphyllobothrium* spp. erkennen. Insgesamt zeigt sich, dass die erzeugten Proteinspektren aller *Taenia* Proben - mit Ausnahme der Probe *T. saginata* 8412 eggs - im weitesten Sinne gemeinsam gruppiert werden. Eine gewisse Heterogenität innerhalb der gruppierten Proben *T. saginata* lässt sich erkennen. Die Organismen *D. latum proglottids* und *D. nihonkaiense proglottids* können deutlich von den *Taenien* unterschieden werden, werden allerdings auch nicht gemeinsam geclustert. Weiterhin ist zu erkennen, dass die jeweiligen technischen Replikate stets mit einer hohen Ähnlichkeit gruppiert werden. So kann auf die

Grafiken steht jeder Punkt für ein zusammengefasstes Proteinspektrum eines technischen Replikates. Die einzelnen Parasitenproben sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. In den Analysen werden die zusammengefassten Proteinspektren der technischen Replikate zu vier Clustern gruppiert.

Die Vergleichshelminthen der Gattung *Diphyllobothrium* zeigen eine deutlich unterschiedliche Clusterung mit zwei der Art entsprechenden eigenständigen Gruppen. Die *Taenia*-Isolate lassen sich ebenfalls in zwei Hauptgruppen unterscheiden. Eine Gruppe bestehend aus allen Proben *T. saginata* Proglottiden sowie *T. saginata* eggs Basel, die andere Gruppe bestehend aus den Proteinspektren der Probe *T. saginata* eggs 8412.

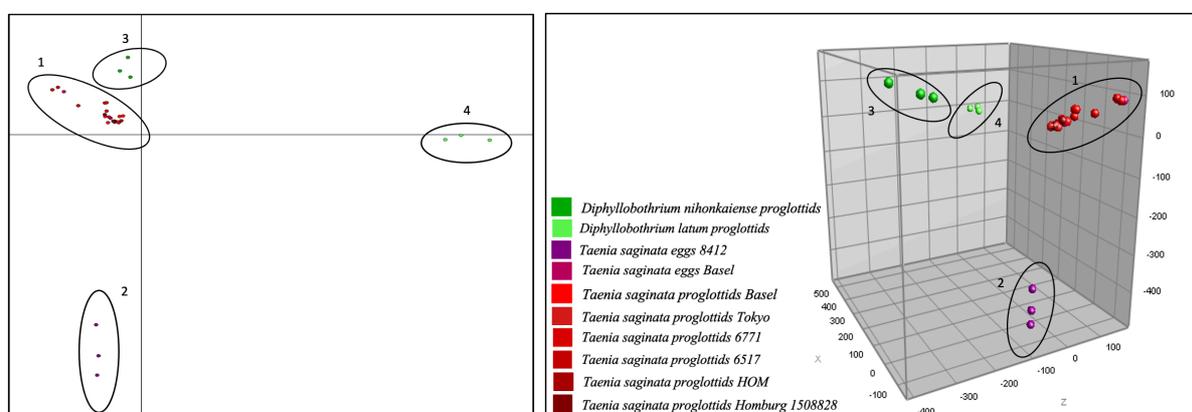


Abbildung 14: Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse der zusammengefassten Proteinspektren der Parasitenproben. In der zweidimensionalen Diskriminanzanalyse sowie in der dreidimensionalen PCA lassen sich vier Cluster feststellen, in denen die Proteinspektren mit einer hohen Ähnlichkeit gruppiert wurden.

4.1.2. Molekulargenetische Bestätigungsdiagnostik der untersuchten Parasiten

4.1.2.1. Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierungsergebnisse für die einzelnen Parasitenproben werden in **Tabelle 7** dargestellt, hier lassen sich die Ergebnisse der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Datenbank mit den ermittelten query cover, per. Ident., E.-values und der Zugangsnummer des besten Identifikationsorganismus entnehmen.

In **Tabelle 7** lässt sich erkennen, dass alle analysierten Parasitenproben mit einem query cover von >80% eine hohe Abdeckung der Zielsequenzen erreichen und dass die jeweiligen spezifischen E.-values als sehr gering angesehen werden und dementsprechend eine hohe Signifikanz der Übereinstimmungen bedeuten. Die percent identity ist für alle Proben mit

Werten >94% angegeben. E.-values von 0.0 bei den Proben von *Diphyllobothrium* spp. bedeuten, dass hier sehr kleine Werte vorliegen, die von BLAST auf 0.0 gerundet werden.

Betrachtet man nun zusammenfassend query cover, percent identification und E.-value lassen sich alle analysierten Parasitenproben mit den jeweiligen Organismen unter den genannten Zugangsnummern (accession number) von BLAST NCBI erfolgreich identifizieren.

Probennamen	Genutzter Primer	Sequenzierungsergebnisse der Consensussequenz	Query Cover	Per. Identification	E-Value	Accession Numer
<i>Taenia saginata proglottids Basel</i>	COX-1	Taenia saginata isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	99,60%	6e -146	MT074048.1
<i>Taenia saginata proglottids 6771</i>	COX-1	Taenia saginata Isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	99%	98,60%	1e - 138	MT074048.1
<i>Taenia saginata proglottids 6517</i>	COX-1	Taenia saginata Isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	99,30%	5e - 142	MT074048.1
<i>Taenia saginata proglottids Homburg</i>	COX-1	Taenia saginata isolate Tsag_MT cytochrome c oxidase subunit (COX1)	98%	98,53%	3e - 131	MN337881.1
<i>Taenia saginata proglottids Homburg 1508828</i>	COX-1	Taenia saginata isolate IPD-1 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	98,22%	3e - 134	MT074050.1
<i>Taenia saginata proglottids Tokyo</i>	COX-1	Taenia saginata Isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	98,95%	3e - 139	MT074048.1
<i>Taenia saginata eggs Basel</i>	COX-1	Taenia saginata Isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	98,91%	7e - 135	MT074048.1
<i>Taenia saginata eggs 8412</i>	COX-1	Taenia saginata Isolate IPD-3 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)	100%	100%	3e - 143	MT074048.1
<i>Diphyllobothrium nihonkaiense proglottids</i>	NAD-5	Diphyllobothrium nihonkaiense isolate HD-N-2-NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5)	97%	94,69%	0.0	KP273587.1
<i>Diphyllobothrium latum proglottids</i>	NAD-5	Dibothriocephalus latus mitochondrial DNA complete genom	84%	97,23%	0.0	AP017663.1

Tabelle 7: Sequenzierungsergebnisse der Parasitenproben: Ergebnisse nach Abgleich der Sequenzen mit der BLAST Datenbank von NCBI zeigen für alle gemessene Parasitenproben eine valide molekulargenetische Identifikation.

4.1.2.2. Statistische Analyse der Sequenzierungsergebnisse

Phylogenetischer Sequenzstammbaum

Eine phylogenetische evolutionsbiologische Ähnlichkeit der genutzten *T. saginata* Proben wurde mithilfe eines phylogenetischen Sequenzstammbaumes untersucht. Die Proben wurden mittels statistischer Methoden bearbeitet und hinsichtlich ihrer Evolutionsbiologie verglichen. Bei dem Vergleich lässt sich erkennen, dass die Sequenzen aller *Taenia* Proben als sehr ähnlich angegeben werden und sich keine spezifischen Gruppierungen feststellen lassen (vergleiche **Abbildung 15, A**).

In einem zweiten Schritt wurden zu den *Taenia* Proben die outgroup-Referenzproben *D. latum proglottids* und *D. nihonkaiense proglottids* hinzugefügt. Der Sequenzstammbaum zeigt eine Gruppierung aller *Taenia* Proben mit einer sehr hohen Ähnlichkeit. Die Proben von *Diphyllobothrium* spp. wurden gemeinsam geclustert und können als eigenständige Parasiten mit ausreichend Distanz zu dem *Taenia* Cluster unterschieden werden (vergleiche **Abbildung 15, B**).

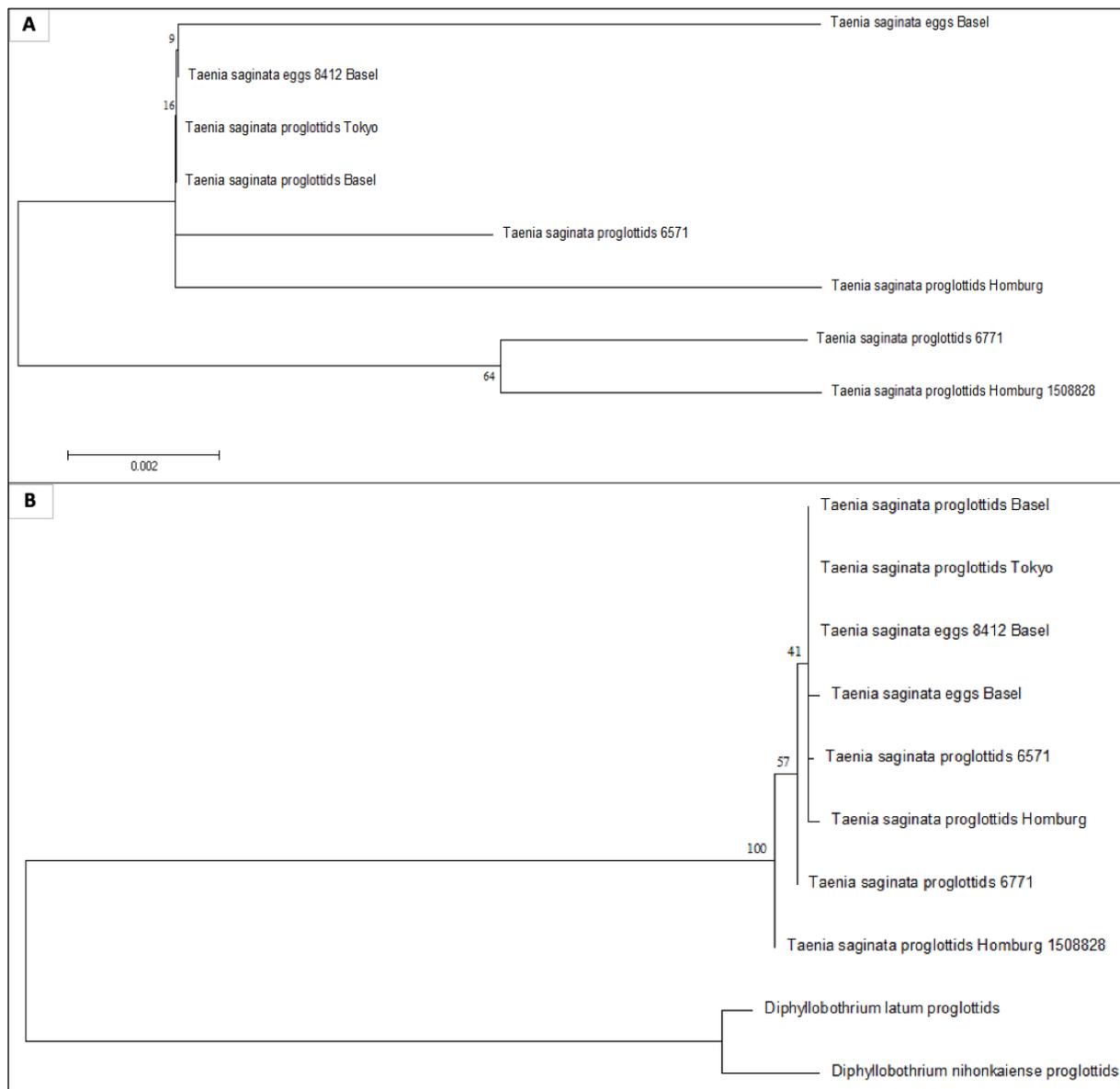


Abbildung 15: Phylogenetischer Sequenzstammbaum der Sequenzen aller Parasitenproben.
A) Vergleich aller Proben *T. saginata*, hier zeigt sich eine heterogene Clustering der Proben.
B) Vergleich aller Proben *T. saginata* inklusive der outgroup-Referenzproben *Diphyllobothrium* spp., die *Taenia* Sequenzen werden gemeinsam mit ausreichend Abstand zu den *Diphyllobothrium* Proben gruppiert.

4.2. Vergleichende Analyse der proteinbasierten Clustering und des phylogenetischen Sequenzstammbaues

Die Heterogenität der Clusteranalyse der massenspektrometrisch erzeugten artspezifischen Profile zeigte methodenübergreifend keine Ähnlichkeit zu dem phylogenetischem Sequenzstammbaum der generierten *Taenia* Sequenzen. Die entfernte Clustering der Probe

T. saginata eggs 8412 konnte molekulargenetisch nicht nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine komplexe differenzierbare Clusterung (vergleiche **Abbildung 16**).

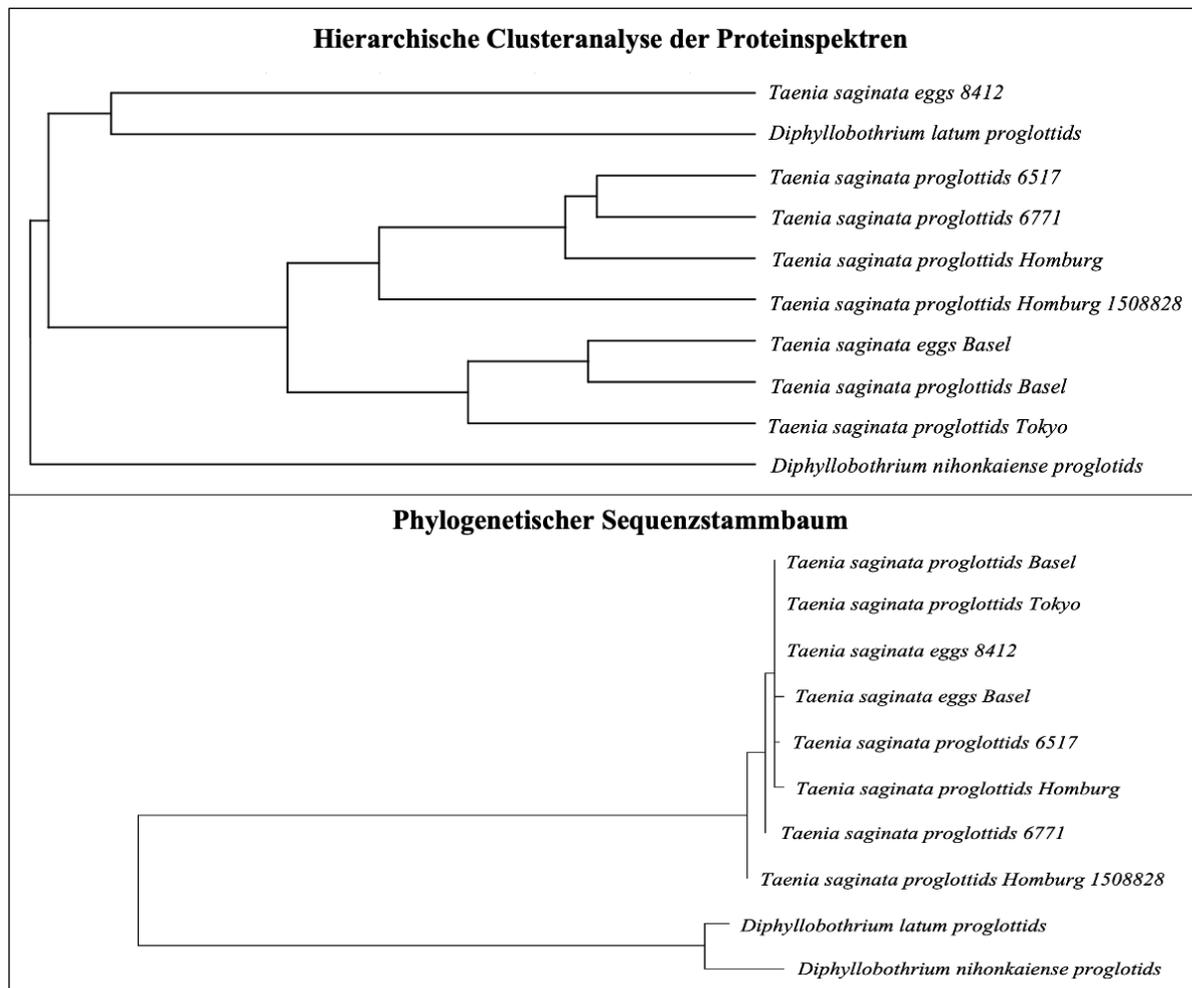


Abbildung 16: Vergleich der phylogenetischen Sequenzanalyse mit der hierarchischen Clusteranalyse der Proteinspektren der Parasitenproben. Die MALDI-TOF MS basierte Clusterung unterscheidet sich von der Sequenzanalyse.

4.3. Einfluss unterschiedlicher Lagerungsmedien auf die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik

4.3.1. Analysierte Proben

Wie **Tabelle 8** zu entnehmen konnten von den insgesamt 2400 gemessener Proteinspektren von *T. saginata* Proglottiden in den neuen Lagerungsmedien über einen Zeitverlauf von 24 Wochen nur 1988 Proteinspektren genutzt werden. 412 Proteinspektren mussten aufgrund von flat- oder outlines für den Versuch verworfen werden. Insgesamt mussten 2 Probenmessungen aufgrund von bakterieller Kontamination verworfen werden, sowie weitere 30 Proteinspektren mussten

aufgrund fehlender Peaks oder unrealistisch hoher Proteinspektren verworfen werden (ausgenommen die Proteinspektren der Proben gelagert in Formalin).

Probenname	Lagerungszeitraum	Lagerungsmedium	Verworfen Proteinspektren	Für Identifikation genutzte Proteinspektren
<i>T. saginata proglottids</i>	ca. 12 Monate	NaCl 0,45%	0	96
<i>T. saginata proglottids NaCl 2 weeks</i>	2 Wochen	NaCl 0,45%	0	96
<i>T. saginata proglottids EtOH 2 weeks</i>	2 Wochen	Ethanol 70%	0	96
<i>T. saginata proglottids Aqua 2 weeks</i>	2 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	0	96
<i>T. saginata proglottids Formalin 2 weeks</i>	2 Wochen	Formalin 37%	96 (no peaks found)	0
<i>T. saginata proglottids NaCl 4 weeks</i>	4 Wochen	NaCl 0,45%	9 (no peaks found)	87
<i>T. saginata proglottids EtOH 4 weeks</i>	4 Wochen	Ethanol 70%	2 (no peaks found)	94
<i>T. saginata proglottids Aqua 4 weeks</i>	4 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	6 (no peaks found)	90
<i>T. saginata proglottids Formalin 4 weeks</i>	4 Wochen	Formalin 37%	96 (no peaks found)	0
<i>T. saginata proglottids NaCl 6 weeks</i>	6 Wochen	NaCl 0,45%	6 (no peaks found)	90
<i>T. saginata proglottids EtOH 6 weeks</i>	6 Wochen	Ethanol 70%	0	96
<i>T. saginata proglottids Aqua 6 weeks</i>	6 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	0	96
<i>T. saginata proglottids Formalin 6 weeks</i>	6 Wochen	Formalin 37%	96 (no peaks found)	0
<i>T. saginata proglottids NaCl 8 weeks</i>	8 Wochen	NaCl 0,45%	0	96
<i>T. saginata proglottids EtOH 8 weeks</i>	8 Wochen	Ethanol 70%	0	96
<i>T. saginata proglottids Aqua 8 weeks</i>	8 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	0	96
<i>T. saginata proglottids Formalin 8 weeks</i>	8 Wochen	Formalin 37%	96 (Verunreinigung)	0
<i>T. saginata proglottids NaCl 12 weeks</i>	12 Wochen	NaCl 0,45%	0	96
<i>T. saginata proglottids EtOH 12 weeks</i>	12 Wochen	Ethanol 70%	0	96
<i>T. saginata proglottids Aqua 12 weeks</i>	12 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	0	96
<i>T. saginata proglottids Formalin 12 weeks</i>	12 Wochen	Formalin 37%	96 (no peaks found)	0
<i>T. saginata proglottids NaCl 24 weeks</i>	24 Wochen	NaCl 0,45%	1 (Verunreinigung)	95
<i>T. saginata proglottids EtOH 24 weeks</i>	24 Wochen	Ethanol 70%	0	96
<i>T. saginata proglottids Aqua 24 weeks</i>	24 Wochen	Wasser in LC - MS Qualität	0	96
<i>T. saginata proglottids Formalin 24 weeks</i>	24 Wochen	Formalin 37%	96 (no peaks found)	0

Tabelle 8: Probeninhalt des Projekts. Für jede der 25 Proben wurden 96 Proteinspektren erstellt, insgesamt wurden 412 Proteinspektren aufgrund von flatlines/outlines oder Verunreinigungen verworfen.

4.3.2. Vergleichende Analyse der Zeitverlaufsmessungen von *T. saginata* Proglottiden in unterschiedlichen Lagerungsmedien

4.3.2.1. Visueller Vergleich der Proteinspektren

Die gemessenen Proteinspektren der Ausgangsprobe *T. saginata* Proglottiden aus Basel und die Proteinspektren von *T. saginata* Proglottiden in den neuen Lagerungsmedien wurden mit FlexAnalysis begutachtet. Hierfür wurde repräsentativ jeweils ein Spektrum der 96 gemessenen Proteinspektren jeder Probe einzeln betrachtet. Die repräsentativen Proteinspektren können in **Abbildung 17** nachvollzogen werden.

Betrachtet man das Proteinspektrum der molekulargenetisch validierten **Ausgangsmessung** *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* mittels FlexAnalysis Software, lassen sich Proteinpeaks im Bereich zwischen 3 000 und 12 000 Da (m/z) detektieren. Charakteristische Peaks mit hoher Intensität zeigen sich bei 2590 m/z, 3828 m/z, 4832 m/z, 5878 m/z, 6502 m/z, 6895 m/z,

7067m/z, 7838 m/z und 11753 m/z. Die Intensität der Messung ist mit ca. 0.7×10^4 a.u. angegeben.

T. saginata Proglottiden, gelagert in **Natriumchlorid (NaCl) 0,45 %**, weist in allen Messungen Proteinpeaks bei 3585 m/z, 3919 m/z, 5880 m/z, 6503 m/z, 6896 m/z, 7068 m/z, 7838 m/z und 11754 m/z auf. Die Intensität wird für die Lagerungszeiten von zwei, vier, sechs, acht, 12 und 24 Wochen mit ca. 1.0×10^4 a.u. angegeben. Eine Intensitätsabnahme auf 8000 a.u. lässt sich nach einem Messzeitpunkt von sechs Wochen erkennen.

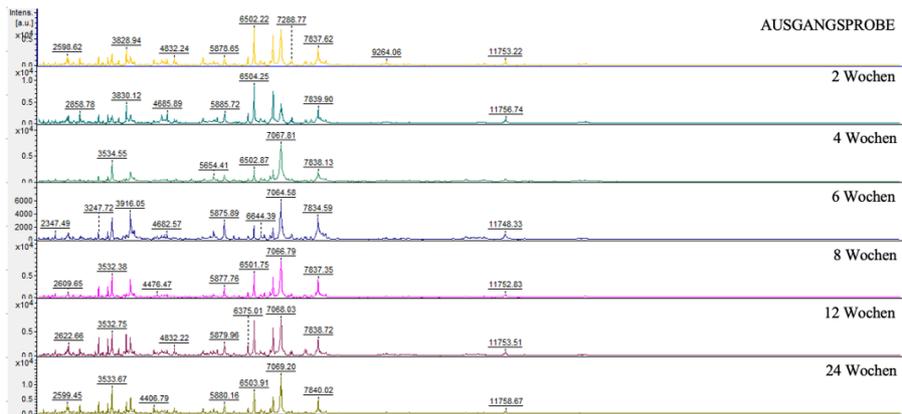
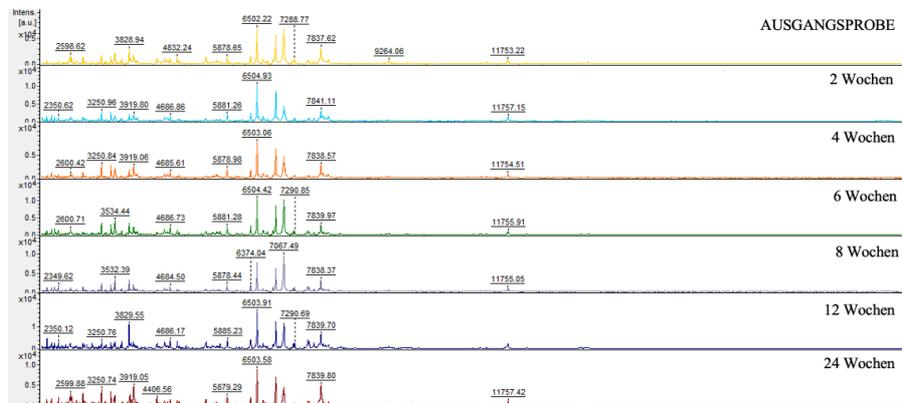
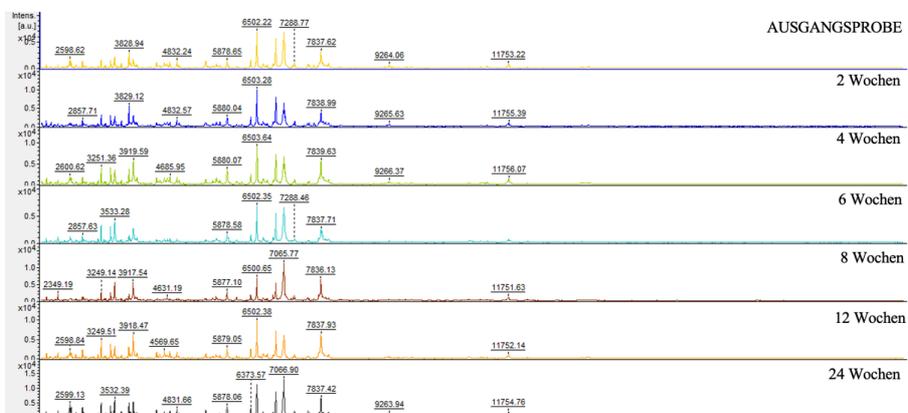
Die Proteinspektren von *T. saginata* Proglottiden gelagert in **Ethanol 70%** zeigen durchgehend Spektren mit hoher Intensität. Sowohl die Proteinpeaks als auch die Intensität zeigten keine nennenswerten Änderung über die Lagerungszeit hinweg. Charakteristische Proteinpeaks finden sich für die Lagerungszeiten von 2-24 Wochen bei 3250 m/z, 4686 m/z, 5881 m/z, 6504 m/z, 6895 m/z, 7067 m/z, 7838 m/z und 11757 m/z. Die Proteinpeaks weisen minimale Schwankungen im Wochenverlauf auf, was zu vernachlässigen gilt. Die Intensität der Proteinpeaks von *T. saginata* Proglottiden, gelagert in Ethanol, ist mit ca. 1.0×10^4 a.u. angegeben und ändert sich über die Lagerungszeit hinweg kaum.

Betrachtet man die Proteinspektren von *T. saginata* Proglottiden, gelagert in **Wasser in LC-MS-Qualität**, lassen sich Proteinpeaks zu jeder Lagerungszeit bei 3250 m/z, 3919 m/z, 5880 m/z, 6503 m/z, 6896 m/z, 7066 m/z, 7838 m/z und 11755 m/z finden. Zu den Messzeitpunkten zwei, vier, sechs, acht, 12 und 24 Wochen wurde stets eine hohe Signalintensität mit 1.0×10^4 a.u. gemessen.

In **Formalin 37%** gelagerte *T. saginata* Proglottiden Proben zeigen zu keinem Messzeitpunkt Proteinpeaks, es sind ausschließlich flatlines erkennbar.

In **Abbildung 17** sind die Profile der Proteinspektren der *T. saginata* Proglottiden Proben in den neuen Lagerungsmedien im Zeitverlauf eingefügt. Dargestellt ist jeweils ein neues Lagerungsmedium mit den repräsentativen Proteinspektren nach zwei, vier, sechs, acht, 12 und 24 Wochen. Zusätzlich ist zu Beginn jedes Zeitverlaufes die Ausgangsmessung eingefügt.

Die X-Achse der Grafiken beschreibt die mass-charge-ratio (m/z), die Y-Achse gibt die Intensität in a.u. an.

T. saginata Proglottiden in 0,45% Natriumchlorid**T. saginata Proglottiden in 70% Ethanol****T. saginata Proglottiden in Wasser mit LC-MS Qualität**

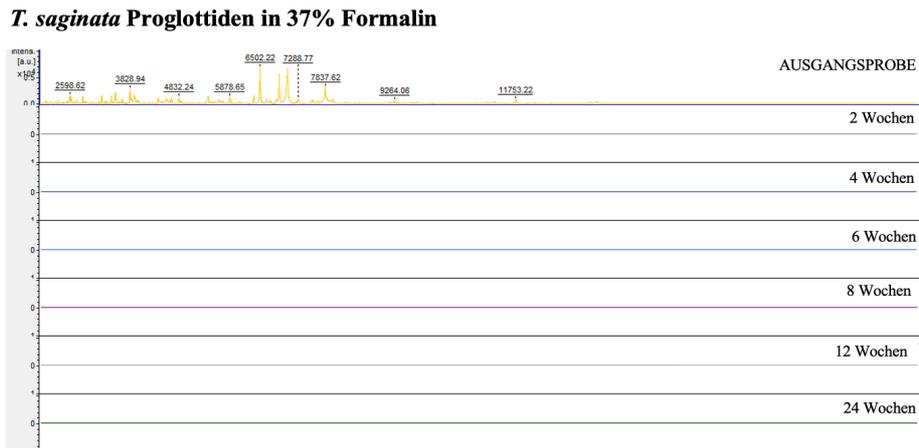


Abbildung 17: Proteinspektrumprofile von *T. saginata* Proglottiden im Zeitverlauf in den neuen Lagerungsmedien. Die X-Achse beschreibt die mass-charge-ratio (m/z), die Y-Achse spiegelt die Intensität in % wider. Für die Lagerungsmedien 0,45% NaCl, 70% Ethanol sowie Wasser in LC-MS-Qualität lassen sich im Zeitverlauf ähnliche Proteinspektren darstellen. Im Lagerungsmedium 37% Formalin hingegen lässt nach einer 2-wöchigen Lagerung kein Proteinspektrum mehr messen.

4.3.2.2 LSV-Analyse

Die neuen gelagerten Proben von *T. saginata* Proglottiden wurden mithilfe der MALDI-Biotyper Software zunächst mit der offiziellen Bruker Standarddatenbank für Bakterien und Pilze und anschließend mit der Bruker Standarddatenbank zusammen mit unserer in-house-Database einschließlich des MSP der Ausgangsprobe *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* verglichen. Für jedes neue Lagerungsmedium erhielten wir sechs Proben (Messungen nach 2-24 Wochen), die im Folgenden zusammengefasst für ein Lagerungsmedium angegeben werden. Es wurden jeweils LSVs generiert, die die Wahrscheinlichkeit der Art- und Speziesidentifizierung angeben. Die Ergebnisse sind **Tabelle 9** zu entnehmen.

Beim Vergleich der *T. saginata* Ausgangsprobe sowie der neu gelagerten *T. saginata* Proglottiden Proben mit der Bruker Standarddatenbank wurde keine positive Identifizierung gefunden. Als bester Identifikationsorganismus wurde das Bakterium *Arthrobacter monumenti* ermittelt. Mit LSVs durchgehend <1,69 zeigt sich keine zuverlässige Identifikation.

Der Abgleich der neu gelagerten *T. saginata* Proglottiden Proben mit der Bruker Database in Kombination mit der in-house-Database zeigt für alle Proben eine hohe Identifikationsquote.

Für das Lagerungsmedium **Natriumchlorid 0,45% (NaCl)** lässt sich eine Identifikation von 97,2% der Proteinspektren mit der Ausgangsprobe *Taenia saginata proglottids NaCl 0 weeks* feststellen. Der Mittelwert aller berechneten LSVs für die Identifikation liegt bei 2,54.

Im Lagerungsmedium **Ethanol 70%** konnten 99,7% aller gemessenen Proteinspektren im Verlauf der Lagerungszeit mit der Ausgangsprobe *Taenia saginata proglottids NaCl 0 weeks*

identifiziert werden. Im Mittel konnte ein LSV von 2,53 ermittelt werden. *T. saginata* Proglottiden in **Wasser in LC-MS-Qualität** konnte mit 99% aller Proteinspektren als *Taenia saginata proglottids NaCl 0 weeks* identifiziert werden. Der Mittelwert des LSVs lag hier über den Lagerungszeitraum von 24 Wochen hinweg bei 2,57.

Die Parasitenproben gelagert in **Formalin 37%** zeigten zu keinem Messzeitpunkt Proteinpeaks. Dementsprechend wurden 0% aller Spektren mit einem LSV im Mittel von <0 identifiziert.

Betrachten wir die LSVs für die jeweiligen Messzeitpunkte der *T. saginata* Proglottiden Proben in den neuen Lagerungsmedien genauer, zeigen sich für die Lagerungsmedien **Natriumchlorid 0,45% (NaCl)**, **Ethanol 70%** und **Wasser in LC-MS-Qualität** konstant hohe Log Score Values von >2,3 (vergleiche **Abbildung 18**). LSVs $\geq 2,3$ gewährleiten laut Bruker eine sichere Gattungs- und Artidentifizierung. Leichte Schwankungen bis zu 0,24 Werte im LSV können im Verlauf der Lagerungszeit in allen Lagerungsmedien beobachtet werden. Im Medium **Natriumchlorid 0,45% (NaCl)** fallen die Schwankungen etwas höher aus, nach sechs Wochen Lagerungszeit zeigt sich hier der niedrigste LSV mit 2,37.

A		Bruker Database		
Probename	Identifikationsrate	LSV Mittelwert	Bester Identifikationsorganismus	
<i>T. saginata proglottids NaCl 0 weeks</i>	0%	1,37	Arthrobacter monumenti DSM 16405T DSM	
B		Bruker Database		
Lagerungsmedium	Identifikationsrate	LSV Mittelwert	Bester Identifikationsorganismus	
Natriumchlorid 0,45%	0%	1,38	Arthrobacter monumenti DSM 16405T DSM	
Ethanol 70%	0%	1,39	Arthrobacter monumenti DSM 16405T DSM	
Wasser in LC-MS Qualität	0%	1,38	Arthrobacter monumenti DSM 16405T DSM	
Formalin 37%	0%	<0	no peaks found	
C		Bruker Database & in-house-Database		
Lagerungsmedium	Identifikationsrate	LSV Mittelwert	Bester Identifikationsorganismus	
Natriumchlorid 0,45%	97%	2,55	Taenia Saginata Proglottids_0weeks_NaCl	
Ethanol 70%	100%	2,52	Taenia Saginata Proglottids_0weeks_NaCl	
Wasser in LC-MS Qualität	99%	2,56	Taenia Saginata Proglottids_0weeks_NaCl	
Formalin 37%	0%	<0	no peaks found	

Tabelle 9: Identifikationsrate, LSV-Mittelwerte und bester Identifikationsorganismus aus (T. P. Wendel et al., 2021):

A) nach Vergleich der Ausgangsprobe *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* mit der Bruker Standarddatenbank

B) nach Vergleich von *T. saginata* Proglottiden in den neuen Lagerungsmedien mit der offiziellen Bruker Standarddatenbank für Bakterien und Pilze

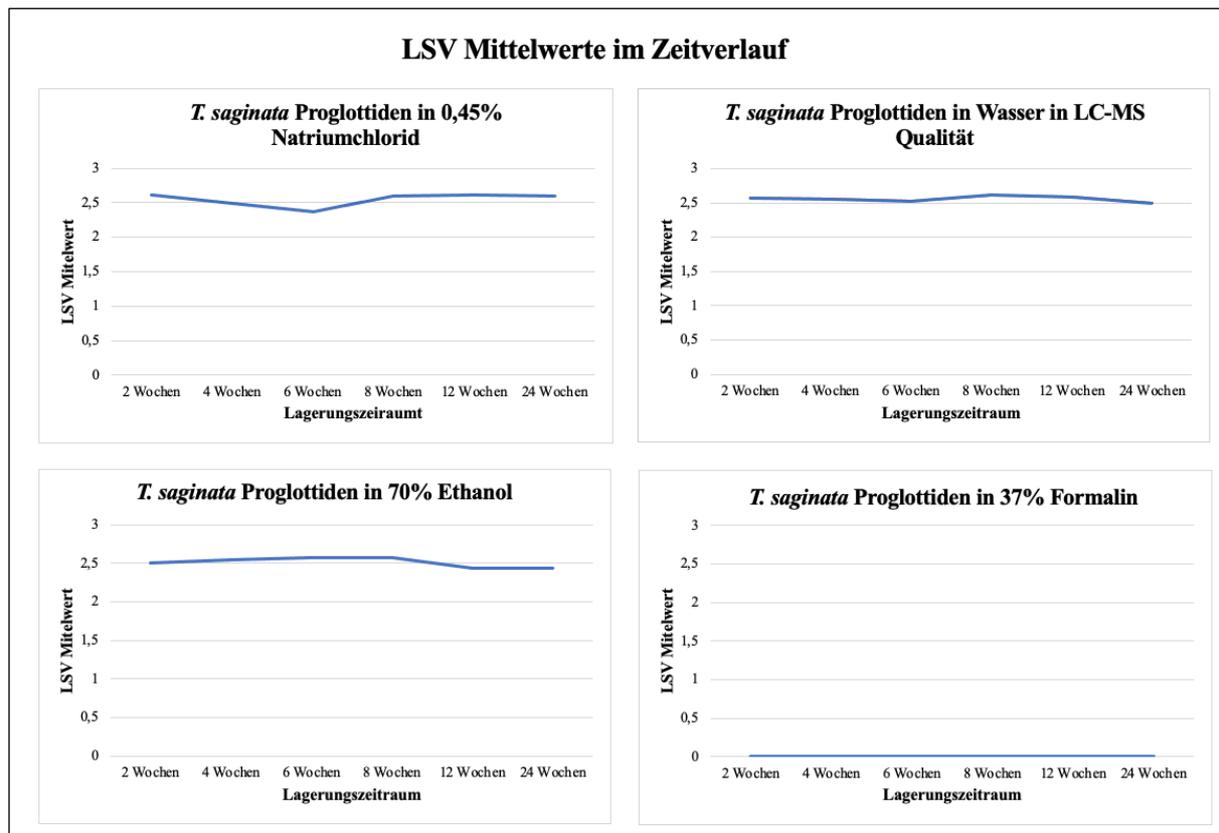


Abbildung 18: Mittelwerte der log score values von *T. saginata* Proglottiden in den unterschiedlichen Lagerungsmedien im Zeitverlauf von 2-24 Wochen (T. P. Wendel et al., 2021). Die X-Achse der Diagramme gibt den Mittelwert des LSVs an, die Y-Achse beschreibt den Lagerungszeitraum. Die LSVs der Zeitverlaufsmessung sind jeweils konstant hoch >2,3. Lediglich für die Zeitverlaufsmessungen in 37% Formalin lassen sich keine Proteinpeaks generieren.

4.3.2.3. Statistische Analyse

Cluster Analyse

Die einzelnen Proteinspektren der Proben in den neuen Lagerungsmedien konnten mithilfe der BioNumerics Software in einem Dendrogramm visualisiert werden (vergleiche **Abbildung 19**). Es lässt sich erkennen, dass die Proteinspektren von *T. saginata* Proglottiden nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in den unterschiedlichen Lagerungsmedien scheinbar willkürlich zueinander geclustert werden. Die Ähnlichkeit wird durchgehend mit >85% angegeben (**A**). Für eine genauere Untersuchung wurden der Analyse Proteinspektren der zuvor molekulargenetisch validierte Vergleichsprobe *D. latum* Proglottiden hinzugefügt (**B**). Es lässt sich eine valide Unterscheidung der verschiedenen Parasitenproben erkennen. Alle Proben

T. saginata Proglottiden wurden entsprechend nahe mit einer Ähnlichkeit von >89% unabhängig des Lagerungsmediums und der Lagerungszeit gemeinsam geclustert. Die Probe *D. latum proglottids* lässt sich als unterschiedliche Probe differenzieren.

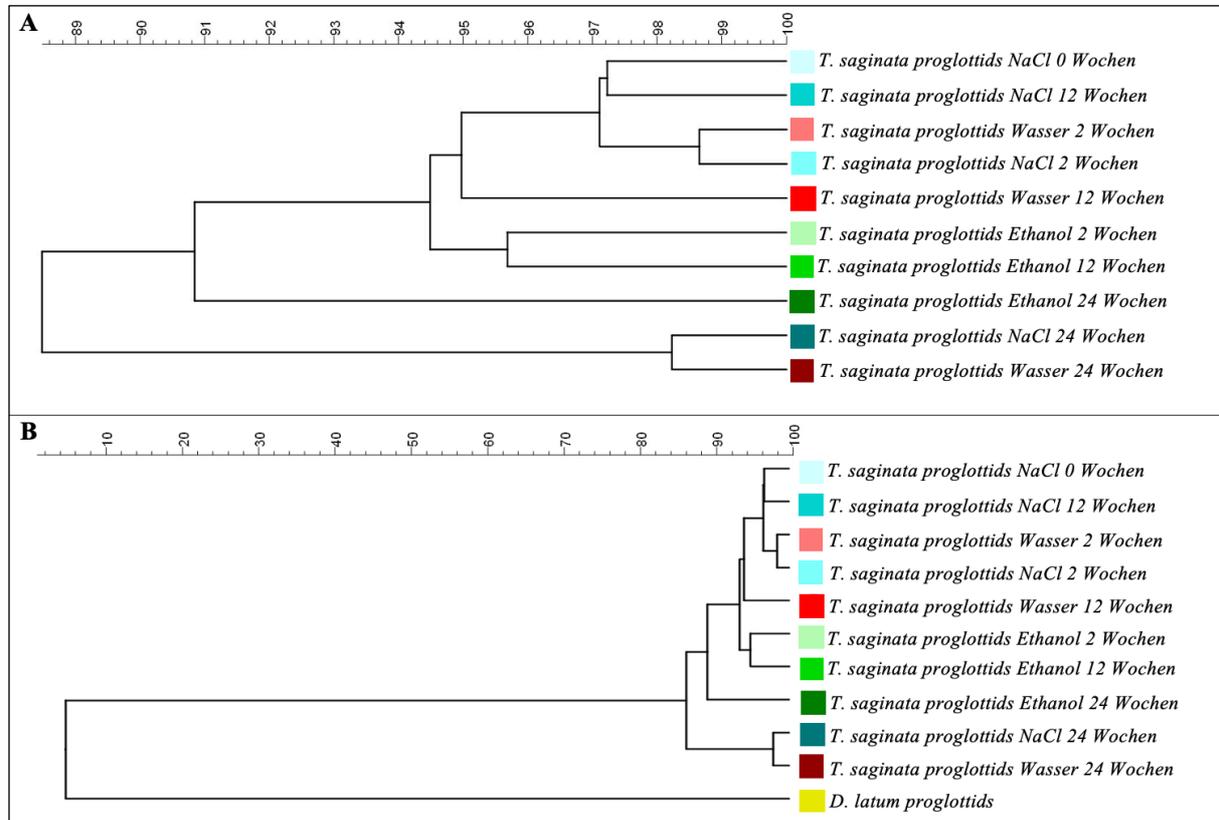


Abbildung 19: Dendrogramm der summary spectra (T. P. Wendel et al., 2021) der technischen Replikate der Proteinspektren von

A) der *T. saginata* Ausgangsprobe und den *T. saginata* Proglottiden Proben in unterschiedlichen Lagerungsmedien zu unterschiedlichen Zeitpunkten und
 B) der *T. saginata* Proglottiden Ausgangsprobe und den *T. saginata* Proglottiden Proben in unterschiedlichen Lagerungsmedien zu unterschiedlichen Zeitpunkten und im Vergleich zu *D. latum* Proglottiden als Referenzprobe

Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse

Die Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurden mit der BioNumerics Software und der zuvor erstellten Database aus den summary spectra der Proteinspektren der Ausgangsprobe *T. saginata proglottids NaCl 0 weeks* sowie von *T. saginata* Proglottiden in unterschiedlichen Lagerungsmedien nach einem Lagerungszeitraum von zwei, zwölf und 24 Wochen durchgeführt. Die dreidimensionale Ansicht der PCA sowie die zweidimensionale Ansicht der Diskriminanzanalyse sind in **Abbildung 20** dargestellt. Jeder Punkt steht für ein

dargestelltes Proteinspektrum, jedes Aufbewahrungsmedium ist mit einer unterschiedlichen Farbe gekennzeichnet. In den statistischen Analysen fallen keine spezifischen Unterschiede, weder bezogen auf das Lagerungsmedium noch auf den Lagerungszeitraum, auf. Die starke Ähnlichkeit in den Analysen deutet auf ein nahezu identisches Muster der Proteinspektren hin.

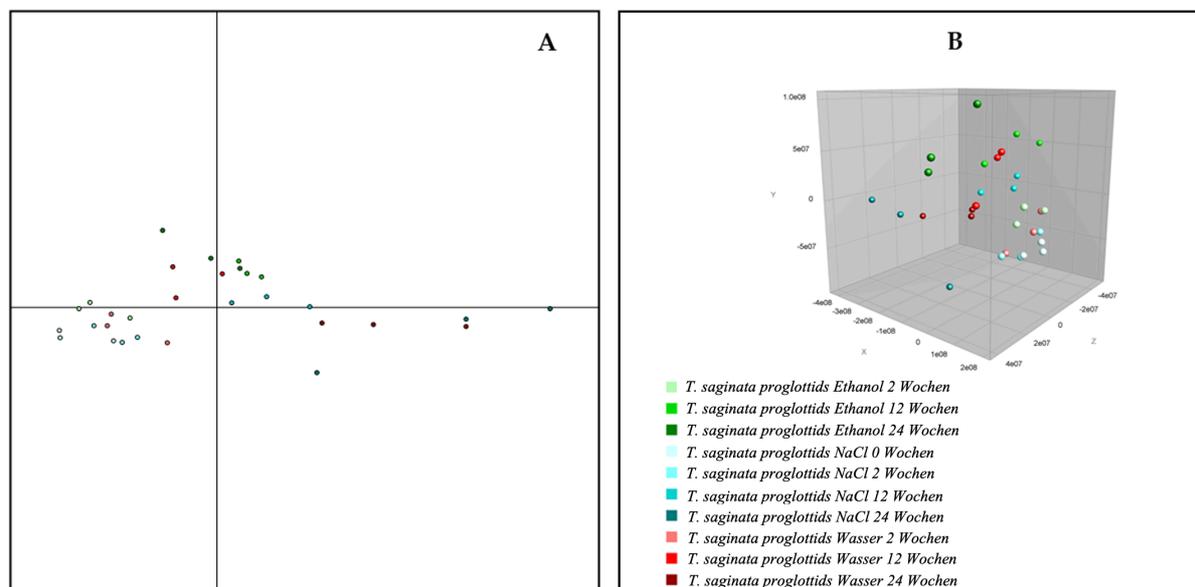


Abbildung 20: Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse (PCA) der *T. saginata* Proglottiden Proben in unterschiedlichen Lagerungsmedien nach zwei, zwölf und 24 Wochen Lagerungszeit (T. P. Wendel et al., 2021) Jedes Aufbewahrungsmedium ist mit einer anderen Farbe dargestellt, die Lagerungszeit wird mit einem anderen Farbton angegeben. Beide statistischen Analysen zeigen, dass die Cluster stark miteinander verwandt sind und nicht voneinander getrennt werden können. (A) Zweidimensionale Ansicht der Diskriminanzanalyse, (B) Dreidimensionale Ansicht der PCA.

5. Diskussion

5.1. MALDI-TOF MS als diagnostische Methode zur Identifikation von *T. saginata*

Dieses Projekt diente der Validierung einer neuen MALDI-TOF MS basierten diagnostischen Methode für die Identifikation des humanpathogenen Parasiten *T. saginata*, der eine Taeniasis im Menschen und eine Zystizerkose in Rindern auslösen kann. Eine neue valide und kostengünstige Methode zur schnellen Diagnostik der Pathogene der Taeniasis und der Zystizerkose wird dringend benötigt, um die weltweit verbreiteten humanpathogenen Parasiten der *Taenia* Gruppe richtig zu erkennen und die durch sie verursachte Morbidität zu reduzieren. Die globale Bedeutung durch Taeniasis ist insbesondere in Ländern des globalen Südens bedeutsam (Okello & Thomas, 2017). Sie wird einerseits auf die chronische Erkrankung der Taeniasis als Teil der NTDs sowie andererseits auf die hohen wirtschaftlichen Verlusten durch die Verwerfung infizierter Nutztiere in der Fleischindustrie (Symeonidou et al., 2018) zurückgeführt. Zusätzlich ist die speziesspezifische Unterscheidung der unterschiedlichen *Taenia* Pathogene von fundamentaler Bedeutung, um eine Infektion mit *T. solium* als Erreger der potentiell letal verlaufenden Neurozystizerkose rechtzeitig zu erkennen und eine entsprechende Therapie einzuleiten (Garcia et al., 2014).

MALDI-TOF MS ist eine umfassend validierte Diagnosetechnik, die heute in klinisch-mikrobiologischen Labors routinemäßig eingesetzt wird (Calderaro et al., 2014) und aufgrund der hohen Genauigkeit, niedriger Betriebskosten und einem geringen Wartungsbedarfs als Standarddiagnosetechnik für Bakterien und Pilze gilt (Lavigne et al., 2013). Auch in der Parasitologie findet das massenspektrometrische Verfahren in den vergangenen Jahren langsam Einzug (Feucherolles et al., 2019). Hier mangelte es jedoch bisher an Erfahrungswerten hinsichtlich standardisierter Arbeitsprotokolle und Referenzspektren häufiger Parasiten wie z.B. der *Taenia* spp.

In diesem Projekt konnten spezifische Proteinspektrumprofile für unterschiedliche Proben des Rinderbandwurms *T. saginata* sowie vergleichend des Fischbandwurms *Diphyllobothrium* spp. generiert werden. Unabhängig von den Entwicklungsstadien des Bandwurmes konnten diese spezifischen Proteinspektren für *T. saginata* Eier und *T. saginata* Proglottiden gemessen werden und auch erfolgreich von anderen Helminthen differenziert werden. Von insgesamt acht *T. saginata* Proben konnten sechs korrekt als *T. saginata* identifiziert werden (vergleiche **Tabelle 6**). Diese Identifikation konnte allerdings nur bei zwei von sieben Proben sicher gattungs- und wahrscheinlich art-/speziesspezifisch durchgeführt werden.

Der Differenz in den Proteinspektren der *Taenia* Organismen sowie der unzureichenden artspezifischen Identifikation und der heterogenen Clusterung im Dendrogramm können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Prinzipiell zeigt MALDI-TOF MS basierte Diagnostik Limitationen in Bezug auf die Identifikation sehr eng verwandter Arten wie zum Beispiel *Escherichia coli* und *Shigella* (Rychert, 2019). Hier kann einerseits eine hohe genetische Verwandtschaft der Proben ursächlich sein, andererseits kann auch ein Mangel an ausreichenden differenzierenden Proteinspektren in der Datenbank ein Grund für die fehlerhafte Identifizierung bestimmter Arten sein (Rychert et al., 2018; Šedo et al., 2018). Als ein Lösungsansatz für diese Probleme wurde in der Literatur die Durchführung weiterer, proteombasierter Tests zur Verbesserung der Unterscheidungskraft sowie Identifizierung der Organismen auf Stamm- oder Serotypebene bei genetisch verwandten Arten vorgeschlagen, bei denen eine Identifikation auf Artniveau klinisch relevant ist (Karlsson et al., 2015; Rychert, 2019).

Des Weiteren wird über eine unzureichende MALDI-TOF MS basierte Identifizierung auf Artniveau bei der Diagnostik von grampositiven Milchsäurebakterien wie *Leuconostoc* spp. berichtet (Zeller-Péronnet et al., 2013). Hier zeigten sich Grenzen der massenspektrometrischen Diagnostik hinsichtlich der Peak-Identifizierung einzelner Isolate einer Art, was in der Literatur teils mit einer fehlenden artspezifischen molekulargenetischen Identifikation des Organismus selbst erklärt wird.

Mittels MALDI-TOF MS basierter Identifikation lassen sich Proteine erfassen, die durch Variation verschiedener Gene (z.B. sogenannter housekeeping genes) entstehen (A. L. Rettinger, 2013). Die Vielfalt der genetischen Variationen von zu untersuchenden Organismen beeinflusst dementsprechend die massenspektrometrischen Muster (Lartigue et al., 2009). Die Veränderung von Genen durch beispielsweise Punktmutationen kann zu einer Expression eines unterschiedlichen Proteins führen und somit zu einer Differenz in den Proteinspektrumprofilen. Dadurch lässt sich eine MALDI-TOF MS basierte Subtypisierung von Spezies verschiedener Bakterien wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes* (Jadhav et al., 2021), *Streptococcus agalactiae* (Lartigue et al., 2009) oder *Arcobacter butzleri* (Giacometti et al., 2018) sowie von Pilzen (Bader, 2013) erstellen. Auch bei dem Einsatz von MALDI-TOF MS in der Parasitologie konnten genetische Variationen festgestellt werden. So wurde zum Beispiel bei der massenspektrometrischen Identifikation von *Fasciola* spp. durch eine Veränderung im Proteinspektrum ein Hinweis auf eine Hybridspezies gefunden (Sy et al., 2021). Die Clusteranalyse sowie eine Analyse der Hauptkomponenten können eine genetische Variation der zu untersuchenden Proben aufdecken. Hierfür werden allerdings deutliche Unterschiede in

den Proteinspektren benötigt. Bei der Subtypisierung von beispielsweise *Leptospira* spp. wird eine Differenz von mindestens zwei eigenständigen intensiven Proteinpeaks als ausreichend für eine Unterscheidung mittels PCA angegeben (A. Rettinger et al., 2012).

Es ist zu überlegen, ob die Differenz der Proteinspektren der verschiedenen Proben *T. saginata* sowie deren entfernte Clusterung womöglich auf genetische Variationen rückführbar sind. Informationen über die globale genetische Vielfalt von *T. saginata* sind sehr begrenzt (Sanpool et al., 2017). Jüngste Studien zeigen international eine genetische Divergenz der *T. saginata* Spezies von 2,5 % (Anantaphruti et al., 2013). Es kann eine genetische Unterteilung in fünf Gruppen vorgenommen werden (Sanpool et al., 2017). Mittels vollständiger Sequenzierung verschiedener Genabschnitte unter anderem des mitochondrialen *cox-1*-Gens (Anantaphruti et al., 2014; Sanpool et al., 2017) oder des 12S-ribosomalen DNA Abschnitts (Rostami et al., 2015) kann eine Differenzierung der genetischen Untergruppen von *T. saginata* getroffen werden. Des Weiteren wird über eine gelegentliche Hybridisierung der beiden Arten *T. saginata* und *T. asiatica* berichtet, die sich im Endwirt Mensch im asiatischen Raum entwickeln kann (Okamoto et al., 2010; Yamane et al., 2012). Hier scheint eine molekulargenetische Unterscheidung ebenfalls mittels vollständiger Sequenzierung des *cox-1* Gens möglich. Der Austausch von Genen innerhalb der *Taenia* Spezies sowie die genetischen Variationen innerhalb der unterschiedlichen Haplotypen könnten sich auch massenspektrometrisch in der Differenz von Proteinpeaks sichtbar machen. Dies könnte die unterschiedlichen Proteinspektrumprofile der Proben *T. saginata proglottids Tokyo* und *T. saginata eggs 8412 Basel* sowie deren teils entfernte Clusterung erklären. Molekulargenetisch konnte eine genetische Variation der *Taenia* Proben in diesem Projekt nicht hinreichend bestätigt werden, alle *Taenia* Proben wurden in der phylogenetischen Sequenzanalyse gemeinsam gruppiert und Unterscheidungen bzw. eine eindeutige Erklärung der unstimmgigen Clusterung der Proteinspektren kann daher nicht abgeleitet werden (vergleiche **Abbildung 15**).

In diesem Projekt wurde die molekulargenetische Analyse nur mittels Amplifikation und Sequenzanalyse des *cox-1*-Genabschnitts durchgeführt, es fand keine komplette Sequenzierung des Genoms statt. In der zugrundeliegenden Literatur konnte die genetische Varianz allerdings nur mittels vollständiger Sequenzierung der *Taenia* Proben festgestellt werden. Möglicherweise lassen sich in einer differenzierten vollständigen Sequenzierung massenspektrometrische Unterschiede auch molekulargenetisch wiederfinden. Zusätzlich wäre hier das Hinzufügen anderer *Taenia* Arten, vor allem der humanpathogenen *T. solium* oder *T. asiatica* wünschenswert. Eine massenspektrometrische valide Unterscheidung dieser Arten würde einen

fundamentalen Wert für die Diagnostik der Taeniasis und Zystizerkose mit sich bringen, da *Taenia*-Eier verschiedener Spezies sich mikroskopisch nicht unterscheiden.

Neben der genetischen Variation als Erklärungsansatz für die teils unzureichende artspezifische massenspektrometrische Identifikation von *T. saginata* in diesem Projekt, könnte die fehlende Identifikation auch auf eine geringe Anzahl an Referenzspektren in der Vergleichsdatenbank zurückzuführen sein.

Die Qualität und Anzahl der Proteinprofile in der hinterlegten Datenbank bestimmt die Identifizierbarkeit der zu untersuchenden Probe (A. L. Rettinger, 2013). Eine sichere, speziesspezifische Identifizierung kann nur erfolgen, wenn mehrere Isolate oder Stämme eines Organismus in der zu vergleichenden Datenbank vorhanden sind (Lartigue et al., 2009). Die in dieser Arbeit genutzte Referenzdatenbank, unsere in-house-Datenbase, bestand aus dem MSP eines einzigen Exemplars einer *T. saginata* Proglottide. Nach Erweiterung der Referenzdatenbank durch Hinzufügen von Proteinspektren der neuen *T. saginata* Proben zur in-house-Datenbase konnten sechs anstatt zwei der sieben *Taenia* Organismen (75 %) wahrscheinlich auf Gattungsebene identifiziert werden. Die Identifikationsrate bei Erweiterung der Referenzspektren stieg somit an.

Eine stetige Erweiterung der Referenzdatenbank mit internationalen *Taenia* Organismen aus unterschiedlichen geographischen Ursprungsgebieten ist dementsprechend entscheidend für die valide massenspektrometrische Identifikation, und entsprechende Erweiterungen sollten in Zukunft erfolgen.

Eine Standardisierung des Arbeitsprotokolls sowie der Lagerungsmedien könnte zudem zu einer genaueren Identifizierung mittels MALDI-TOF MS beitragen. Seit Beginn des Einsatzes von MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Routine wird vermehrt über die Problematik der Protokollstandardisierung diskutiert. Durch den Einsatz verschiedener Kulturbedingungen und Reagenzien sei es hier zu einem hohen Maß an Variation in der Identifikation gekommen (Clark et al., 2013; Wunschel et al., 2005). Zudem kann das Alter der Proben, die Anzahl der verwendeten Laserschüsse, die gemittelten Proteinspektren pro Messung und viele weitere Faktoren wie Personalschulung etc. die Qualität der Ergebnisse und damit die korrekte Identifizierung von Proben beeinträchtigen (Cuénod et al., 2021). Durch intensive Forschung konnte eine Standardisierung der Arbeitsabläufe sowie umfassende Datenbanken für die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik von Bakterien und Pilzen etabliert werden und so eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien erreicht werden (Branda et al., 2017; Mellmann et al., 2009). Trotzdem wird vor allem bei der Diagnostik von Erregern mit hoher genetischer Variabilität häufig auf hauseigene Standardarbeitsanweisungen für die

Probenvorbereitung und die Auswertung der Artenbestimmung mittels MALDI-TOF MS ausgewichen (Cuénod et al., 2021).

5.2. Einfluss des Lagerungsmediums und der Lagerungszeit auf die massenspektrometrische Diagnostik

Es besteht in der Anwendung der MALDI-TOF MS-basierten Parasitendiagnostik noch Unklarheit über eine Standardisierung des Analyseprotokolls und auch die Auswirkung verschiedener präanalytischer Verfahren ist noch nicht hinreichend geklärt.

In den bisher beschriebenen Untersuchungen wurden verschiedene Analyseprotokolle genutzt. Für die Identifizierung von *Fasciola* spp. (Sy et al., 2021), *Cyathotominae* spp. (Bredtmann et al., 2019) und Läusen (Ouarti et al., 2020) wurde 70% Ethanol als Aufbewahrungslösung verwendet, während in Studien über *Anisakis* spp. (Marzano et al., 2020), *Dirofilaria* spp. (Pshenichnaya et al., 2015) und *Ascaris* spp. (Nagorny et al., 2019) eine Natriumchloridlösung verwendet wurde. Hierbei wurden *Ascaris* spp. und *Dirofilaria* spp. Proben zudem mit Antibiotika versetzt, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern. Einige wenige Untersuchungen fokussierten sich auf die Abgrenzung verschiedener Arbeitsprotokolle und Aufbewahrungsmedien: Nebbak *et. al.* (A. Nebbak et al., 2017) untersuchten die Auswirkungen verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Identifizierung von Arthropoden und kamen zu dem Schluss, dass das sofortige Einfrieren der Proben ohne Zugabe eines Fixiermittels die beste Methode zur Generierung spezifischer Proteinspektren sein könnte. Eine Lagerung in 70% Ethanol bei Raumtemperatur wurde hier als minimal schlechter bewertet (T. P. Wendel et al., 2021). Mayer-Scholl *et al.* zeigten in ihrer Studie zu *Trichinella* spp., dass direktes Einfrieren der Proben ohne Fixiermittel im Vergleich zur Lagerung in 70% Ethanol keine Veränderungen im Proteinspektrum oder der berechneten LSVs zeige, lediglich eine Abnahme der Peakintensität wurde bemerkt (Mayer-Scholl et al., 2016).

Als Lagerungsmedien wurden die in der klinischen Routine größtenteils verfügbaren Lösungen Natriumchlorid 0,45%, Ethanol 70%, Wasser in LC-MS-Qualität sowie Formalin 37% ausgewählt. Hier zeigte sich außer für Formalin bei allen Lagerungsmedien im Zeitverlauf von 24 Wochen gleichermaßen eine Aufrechterhaltung der hohen Qualität der Proteinpeaks sowie eine hohe Raten an korrekten Probenidentifizierungen. Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da Formalin erhebliche molekulare Vernetzungen hervorruft, die die Proteinstrukturen verändern können (Lu et al., 2010). Auch in der Pathologie zeigt die massenspektrometrische Untersuchung von in Formalaldehyd gelagertem Gewebe erhebliche Probleme (Buck et al., 2016). Hier wird als Konservierungsmethode meist FFPE genutzt

(*formalin-fixed paraffin-embedded*). Formaldehyd vernetzt Proteine durch Methylenverbrückung der Seitenketten und stabilisiert so die Zellmorphologie, was in der Pathologie genutzt wird, da es Autolyse und Zersetzung verhindert (Kakimoto et al., 2012). In der MALDI-TOF MS basierten Diagnostik werden die Proteine üblicherweise enzymatisch aufgeschlossen. Bei zu starker Quervernetzung kann der Enzymaufschluss nicht ausreichend stattfinden und eine massenspektrometrische Messung wird problematisch (Kakimoto et al., 2012; Palmer-Toy et al., 2005). Formalin sollte somit keinesfalls als Lagerungsmedium für die Aufbewahrung von Parasitenproben dienen, wenn diese im zeitlichen Verlauf massenspektrometrisch untersucht werden sollen. Problematisch ist dies bei der Aufarbeitung jahrzehntelang konservierter Proben, die meist in Formalin gelagert wurden. Hier wird vermehrt an Ansätzen geforscht, die in Formalin oder FFPE gelagerte Organismen und Proben valide untersuchen zu können. Möglichkeiten, Proteinspektren zu erzeugen, sind beispielsweise mehrstufige Verfahren aus hitzeinduziertem Antigen-Retrieval (HIAR) in Gegenwart von EDTA und gezielter Trypsin-Hydrolyse (Kakimoto et al., 2012) oder die vereinfachte In-situ-Vorbehandlungsmethode bestehend aus Erhitzung mit Acetonitril enthaltendem Dampf (Kakimoto et al., 2012).

Mehrere Einschränkungen begrenzen die Übertragbarkeit der hier vorgestellten Ergebnisse. Das als Ausgangsprobe dienende Exemplar *T. saginata* Proglottid wurde ursprünglich zwölf Monate in Natriumchlorid 0,45% gefroren gelagert, bevor dieses in die unterschiedlichen Lagerungsmedien aufgeteilt wurde. Hier wäre eine erneute Untersuchung von frischen *T. saginata* Proben sinnvoll, die unmittelbar nach Konservierung in verschiedene Lagerungsmedien gebracht werden. Aufgrund des doch relativ seltenen Vorkommens von *T. saginata* im deutschsprachigen Raum musste für die Versuche auf bereits vorhandene und über einen längeren Zeitraum in Kochsalzlösung gelagerte Proben zurückgegriffen werden. Daten aus einer aktuellen Studie über geeignete Puffer zum MALDI-TOF MS basierten Screening biochemischer Targets lassen jedoch keine Bedenken hinsichtlich der Verwendung von Natriumchlorid erkennen (Chandler et al., 2017; T. P. Wendel et al., 2021).

Da der Lagerungszeitraum Auswirkung auf die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik ausübt (Cuénod et al., 2021), wäre eine erneute Versuchsreihe mit Proben sinnvoll, die direkt nach Konservierung aus den klinischen Materialien massenspektrometrisch gemessen werden.

Des Weiteren wurden die potentiellen Auswirkungen des Lagerungsmediums auf die massenspektrometrische Diagnostik lediglich von *T. saginata* untersucht. Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass andere Helminthen-Arten wesentlich anders auf die Veränderungen der präanalytischen Faktoren reagieren würden, ist eine breitere Validierung bei ähnlichen

Cestoden sowie bei Nematoden und Trematoden wünschenswert. Zuletzt wurden in dieser Studie bis auf die Veränderung des Lagerungsmediums weder das Analyseprotokoll noch die Lagerungstemperatur verändert. Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert und sind nach spätestens 24 Wochen gemessen worden. Interessant wäre eine Prüfung der speziesspezifischen Identifikation von Helminthen bei erhöhten Temperaturen. Hier wäre eine „Überwucherung“ mit bakteriellen Erregern denkbar und bisher ist nicht klar, ob die Proteinspektren dieser Erreger von denen der Parasiten zu trennen sind. In der Vergangenheit zeigte die MALDI-TOF MS basierte Diagnostik Limitationen polymikrobielle Infektionen zu identifizieren (Lagacé-Wiens et al., 2012; Martinez et al., 2014; Zhou et al., 2017). Zuletzt wurden vermehrt Protokolle zur erfolgreichen Diagnostik von infektiösen Blutkulturen mehrerer Erreger veröffentlicht, in denen eine Trennung der Proteinspektren verschiedener Organismen und so eine Identifikation möglich war (Florio et al., 2019; Hou et al., 2019).

5.3. Anwendbarkeit des MALDI-TOF MS für die Identifikation von *T. saginata* und Ausblick

In diesem Projekt wurde gezeigt, dass eine MALDI-TOF MS basierte Diagnostik von *T. saginata* prinzipiell möglich ist. Es konnten spezifische Proteinspektren mit einer hohen Reproduzierbarkeit erzeugt werden, die von Proteinspektren anderer Organismen wie Bakterien, Pilzen und einigen Parasiten gut differenziert werden können. Zudem wurde eine Erweiterung der vorhandenen in-house-Database für Helminthen durchgeführt, mit welcher eine Identifikation von *T. saginata* in 71,4% (x/n) der Fälle auf Gattungsebene erfolgen konnte. Hier wird darauf hingewiesen, dass die Referenzdatenbank weiterführend mit Proteinspektren von Parasitenproben gefüllt werden muss, um eine valide und speziesspezifische Identifikation zu gewährleisten. Interessant wäre zudem eine massenspektrometrische Untersuchung von *T. solium* Organismen, um die Differenzierbarkeit zwischen den verschiedenen Spezies zu überprüfen, da dies mittels mikroskopischer Untersuchungen nicht gelingt.

Idealerweise sollte eine Ganzgenomsequenzierung der genutzten Proben zusätzlich durchgeführt werden, um eine genetische Varianz der zu untersuchenden Proben erkennen zu können und so Unterschiede in den Proteinspektren zu erklären.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *T. saginata* noch nach 24 Wochen Lagerung in Wasser in LC-MS-Qualität, Natriumchlorid 0,45% und Ethanol 70% zuverlässig identifiziert werden kann. In unserem Versuch zeigte sich hierbei keine Favorisierung eines Lagerungsmediums zur

massenspektrometrischen Identifikation von *T. saginata*. Formalin als Fixiermittel sollte für die spätere MALDI-TOF MS Analyse allerdings nicht verwendet werden.

Zusammenfassend scheint MALDI-TOF MS eine vielversprechende diagnostische Methodik für eine schnelle und genaue Identifizierung von *T. saginata* zu sein. Zukünftige Studien sollten hierbei vermehrt verschiedene Helminthen aus unterschiedlichen Regionen der Welt sowie unterschiedliche Analyseprotokolle und Lagerungsmedien untersuchen, um eine Helminthen-spezifische Identifikationsdatenbank zu erstellen, welche perspektivisch einen Einsatz dieser Technik als Routinediagnostik ermöglichen könnte.

Literaturverzeichnis

- Abuseir, S., Nagel-Kohl, U., Wolken, S., & Strube, C. (2013). An immunoblot for detection of *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasitology Research*, *112*(5), 2069–2073., <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3368-5>
- Albrethsen, J. (2007). Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, *53*(5), 852–858., <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.082644>
- Alexander, A., John, K. R., Jayaraman, T., Oommen, A., Venkata Raghava, M., Dorny, P., & Rajshekhar, V. (2011). Economic implications of three strategies for the control of taeniasis. *Tropical Medicine and International Health*, *16*(11), 1410–1416., <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02850.x>
- Allan, J. C., & Craig, P. S. (2006). Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. *Parasitology International*, *55*, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.010>
- Anantaphruti, M., Thaenkham, U., Kusolsuk, T., Maipanich, W., Saguankiat, S., Pubampen, S., & Phuphisut, O. (2014). Genetic variation and population genetics of *Taenia saginata* in North and northeast Thailand in relation to *Taenia asiatica*. *Journal of Parasitology Research*, *7*(45). <https://doi.org/10.1155/2013/310605>
- Ash, L. R., & Orihel, T. C. (2007). *Ash & Orihel's Atlas of Human Parasitology (5th ed.)* (Jong-Yil C). American Society for Clinical Pathology Press.
- Bader, O. (2013). MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, *13*(5), 788–799. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200468>
- Bartlett, J. W., & Frost, C. (2008). Reliability, repeatability and reproducibility: Analysis of measurement errors in continuous variables. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *31*(4), 466–475. <https://doi.org/10.1002/uog.5256>
- Bayramiçli, O. U., Ak, O., Dabak, R., Demirhan, G., & Ozer, S. (2012). *Taenia saginata* a rare cause of acute cholangitis: A case report. *Acta Clinica Belgica*, *67*(6), 436–437. <https://doi.org/10.2143/ACB.67.6.2062709>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
- Braae, U. C., Thomas, L. F., Robertson, L. J., Dermauw, V., Dorny, P., Willingham, A. L.,

- Saratsis, A., & Devleeschauwer, B. (2018). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: a systematic review of the distribution in the Americas. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13071-018-3079-y>
- REVIEW
- Branda, J. A., Fritsche, T. R., Burnham, C.-A., Butler-Wu, S., Doern, C., Doing, K. M., Fedorko, D., Frana, T. S., Gawoski, J. M., Ginocchio, C., Hamula, C., Hazen, K., Kiss, K., Kus, J., Mingel, L., Perry, M., Pincus, D. H., Shea, Y., Smoot, L., Ziegelmann-Fjeld, K. I. (2017). Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry,. In *CLSI guideline*. https://clsi.org/media/1672/m58ed1_sample.pdf
- Bredtmann, C. M., Krücken, J., Murugaiyan, J., Balard, A., Hofer, H., Kuzmina, T. A., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2019). Concurrent Proteomic Fingerprinting and Molecular Analysis of *Cyathostomins*. *Proteomics*, *19*(7). <https://doi.org/10.1002/pmic.201800290>
- Brindley, P. J., Mitreva, M., Ghedin, E., & Lustigman, S. (2009). Helminth genomics: The implications for human health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000538>
- Bruker Daltonics Inc. (2021). *MALDI Biotyper® CA Reference Library (US-IVD)*.
- Buck, A., Balluff, B., Voss, A., Langer, R., Zitzelsberger, H., Aichler, M., & Walch, A. (2016). How Suitable is Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight for Metabolite Imaging from Clinical Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue Samples in Comparison to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotro. *Analytical Chemistry*, *88*(10), 5281–5289. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00460>
- Bucur, I., Gabriel, S., Van Damme, I., Dorny, P., & Vang Johansen, M. (2019). Survival of *Taenia saginata* eggs under different environmental conditions. *Veterinary Parasitology*, *266*, 138–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.011>
- Calderaro, A., Arcangeletti, M. C., Rodighiero, I., Buttrini, M., Gorrini, C., Motta, F., Germini, D., Medici, M. C., Chezzi, C., & De Conto, F. (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports*, *4*, 6803. <https://doi.org/10.1038/srep06803>
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., Ferroni, A., Gutmann, L., & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, *44*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>

- Casulli, A. (2021). New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021–2030. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009373>
- Chai, J. Y., Murrell, K. D., & Lymbery, A. J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *International Journal for Parasitology*, *35*(11–12), 1233–1254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>
- Chandler, J., Haslam, C., Hardy, N., Leveridge, M., & Marshall, P. (2017). A Systematic Investigation of the Best Buffers for Use in Screening by MALDI–Mass Spectrometry. *SLAS Discovery*, *22*(10), 1262–1269. <https://doi.org/10.1177/1087057116681726>
- Choi, H. J., Lee, J., & Yang, H. J. (2012). Four human cases of *Diphyllobothrium latum* infection. *Korean Journal of Parasitology*, *50*(2), 143–146. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.2.143>
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Conraths, F. J., & Deplazes, P. (2015). *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Veterinary Parasitology*, *213*(3–4), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.027>
- Craig, P., & Ito, A. (2007). Intestinal cestodes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *20*(5), 524–532. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000400>
- Cuénod, A., Foucault, F., Pflüger, V., & Egli, A. (2021). Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.646648>
- Dermauw, V., Dorny, P., Braae, U. C., Devleeschauwer, B., Robertson, L. J., Saratsis, A., & Thomas, L. F. (2018). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: A systematic review of the distribution in southern and eastern Africa. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 578. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3163-3>
- Diemert, D. J. (2017). Cestode and Trematode Infections. In J. Cohen, W. G. Powderly, & S. M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (Fourth Edi, pp. 1032-1037.). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00119-2>
- Dorny, P., & Praet, N. (2007). *Taenia saginata* in Europe. *Veterinary Parasitology*, *149*(1–2), 22–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.004>

- Dubourg, G., Raoult, D., & Fenollar, F. (2019). Emerging methodologies for pathogen identification in bloodstream infections: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *19*(2), 161–173. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1568241>
- Durrani, M. I., Basit, H., & Blazar, E. (2021). *Diphyllobothrium Latum*.
- Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(1), 107–135. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>
- Eichenberger, R. M., Thomas, L. F., Gabriël, S., Bobić, B., Devleeschauwer, B., Robertson, L. J., Saratsis, A., Torgerson, P. R., Braae, U. C., Dermauw, V., & Dorny, P. (2020). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: A systematic review of the distribution in East, Southeast and South Asia. *Parasites and Vectors*, *13*(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04095-1>
- Fang, F. C., Billman, Z. P., Wallis, C. K., Abbott, A. N., Olson, J. C., Dhanireddy, S., & Murphy, S. C. (2015). Human *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection in Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(4), 1355–1357. <https://doi.org/10.1128/JCM.00065-15>
- Feucherolles, M., Poppert, S., Endriss, Y., Hermosilla, C., Lundström-Stadelmann, B., Utzinger, J., & Becker, S. L. (2019). Application of matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight (MALDI- TOF) mass spectrometry in diagnostic helminthology : a proof-of- concept study.
- Feucherolles, M., Poppert, S., Utzinger, J., & Becker, S. L. (2019). MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3493-9>
- Flisser, A., Craig, P. S., & Ito, A. (2011). Cysticercosis and taeniosis: *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. In S. R. Palmer, Lord Soulsby, P. Torgerson, & D. W. G. Brown (Eds.), *Oxford Textbook of Zoonoses: Biology, Clinical Practice and Public Health Control* (2nd ed., Vol. 8, Issue 6, pp. 627–644). <http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780198570028.001.0001/med-9780198570028-chapter-051>
- Flisser, A., Viniegra, A. E., Aguilar-Vega, L., Garza-Rodriguez, A., Maravilla, P., & Avila, G. (2004). Portrait of human tapeworms. *Journal of Parasitology*, *90*(4), 914–916. <https://doi.org/10.1645/GE-3354CC>
- Florio, W., Cappellini, S., Giordano, C., Vecchione, A., Ghelardi, E., & Lupetti, A. (2019). A new culture-based method for rapid identification of microorganisms in polymicrobial

- blood cultures by MALDI-TOF MS. *BMC Microbiology*, 19(1), 267.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1641-1>
- Garcia, H. H., Jimenez, J. A., Escalante, H., Jorgensen, J. H., & Pfaller, M. A. (2015). Parasites - Cestodes. In *Manual of Clinical Microbiology* (11th Edition), pp. 2222–2229. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch145>
- Garcia, H. H., Nash, T. E., & Del Brutto, O. H. (2014). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*, 13(12), 1202–1215.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8)
- García, Héctor H., González, A. E., Del Brutto, O. H., Tsang, V. C. W., Llanos-Zavalaga, F., Gonzalez, G., Romero, J., & Gilman, R. H. (2007). Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 262(1–2), 153–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.039>
- García, Héctor H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A. W., & Gilman, R. H. (2003). *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*, 362(9383), 547–556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14117-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14117-7)
- García, Hector H., Evans, C. A. W., Nash, T. E., Takayanagui, O. M., White, A. C., Botero, D., Rajshekhar, V., Tsang, V. C. W., Schantz, P. M., Allan, J. C., Flisser, A., Correa, D., Sarti, E., Friedland, J. S., Martinez, S. M., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., & Brutto, O. H. Del. (2002). Current Consensus Guidelines for Treatment of Neurocysticercosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 747–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.747-756.2002>
- Gebrie, M., & Engdaw, T. A. (2015). Review on Taeniasis and its Zoonotic Importance. *European Journal of Applied Sciences*, 7(4), 182–191.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2015.7.4.96169>
- Giacometti, F., Piva, S., Vranckx, K., De Bruyne, K., Drigo, I., Lucchi, A., Manfreda, G., & Serraino, A. (2018). Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *International Journal of Food Microbiology*, 277, 50–57.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.026>
- Glinz, D., Silué, K. D., Knopp, S., Lohourignon, L. K., Yao, K. P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N’Goran, E. K., & Utzinger, J. (2010). Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and *Soil-transmitted helminths*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000754>

- González, L. M., Montero, E., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E., & Garate, T. (2000). Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 737–744. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.2.737-744.2000>
- Guo, A. J., Liu, K., Gong, W., Luo, X. N., Yan, H. Bin, Zhao, S. B., Hu, S. N., & Jia, W. Z. (2012). Molecular identification of *Diphyllobothrium latum* and a brief review of diphyllobothriosis in China. *Acta Parasitologica*, 57(3), 293–296. <https://doi.org/10.2478/s11686-012-0036-3>
- Hakeem, S. Y., Rashid, A., Khuroo, S., & Bali, R. S. (2012). *Taenia saginata*: A Rare Cause of Gall Bladder Perforation. *Case Reports in Surgery*, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2012/572484>
- Hall, B. G. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Hamid, A., Margono, S. S., Wandra, T., & Ito, A. (2005). Treatment of taeniasis and cysticercosis with praziquantel and albendazole. *Medical Journal of Indonesia*, 14(4), 253–257. <https://doi.org/10.13181/mji.v14i4.206>
- Hemphill, A., & Lundstroem-Stadelmann, B. (2021). Echinococcus-the model cestode parasite. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S003118202100113X>
- Hendrickx, E., Thomas, L. F., Dorny, P., Bobić, B., Braae, U. C., Devleeschauwer, B., Eichenberger, R. M., Gabriël, S., Saratsis, A., Torgerson, P. R., Robertson, L. J., & Dermauw, V. (2019). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: A systematic review of the distribution in West and Central Africa. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3584-7>
- Hoberg, E. P. (2006). Phylogeny of *Taenia*: Species definitions and origins of human parasites. *Parasitology International*, 55, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.049>
- Hotez, P. J., Aksoy, S., Brindley, P. J., & Kamhawi, S. (2020a). What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0008001>
- Hotez, P. J., Aksoy, S., Brindley, P. J., & Kamhawi, S. (2020b). World neglected tropical diseases day. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007999>
- Hotez, P. J., & Kamath, A. (2009). Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: Review

- of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(8), 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000412>
- Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Ottesen, E., Sachs, S. E., & Sachs, J. D. (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Medicine*, 3(5), 576–584. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030102>
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Ito, A., & Craig, P. S. (2003). Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. *Trends in Parasitology*, 19(9), 377–381. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00200-9)
- Jadhav, S. R., Shah, R. M., & Palombo, E. A. (2021). MALDI-ToF MS: A Rapid Methodology for Identifying and Subtyping *Listeria monocytogenes*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2220, 17–29. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0982-8_2
- Kakimoto, Y., Tsuruyama, T., Yamamoto, T., Furuta, M., Kotani, H., Ozeki, M., Yoshizawa, A., Haga, H., & Tamaki, K. (2012). Novel in situ pretreatment method for significantly enhancing the signal in MALDI-TOF MS of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *PLoS ONE*, 7(8), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041607>
- Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Boulund, F., Svensson-Stadler, L., Skovbjerg, S., Karlsson, A., Davidson, M., Hulth, S., Kristiansson, E., & Moore, E. R. B. (2015). Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms - A prospectus. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.006>
- Kim, H. J., Eom, K. S., & Seo, M. (2014). Three cases of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection in Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 52(6), 673–676. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.6.673>
- King, C. H., & Fairley, J. K. (2015). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. B. Tenover, M. Blaser, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition) (eds.); 8th ed.). Elsevier/Saunders. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00291-5](https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00291-5)
- 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).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000331>
- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C. L., Izri, A., Raoult, D., & Parola, P. (2016). Identification of *Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors* by MALDI-TOF MS. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004351>
- Lagacé-Wiens, P. R. S., Adam, H. J., Karlowsky, J. A., Nichol, K. A., Pang, P. F., Guenther, J., Webb, A. A., Miller, C., & Alfa, M. J. (2012). Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3324–3328. <https://doi.org/10.1128/JCM.01479-12>
- Laranjo-González, M., Devleeschauwer, B., Jansen, F., Dorny, P., Dupuy, C., Requena-Méndez, A., & Allepuz, A. (2018). Epidemiology and economic impact of bovine cysticercosis and taeniosis caused by *Taenia saginata* in northeastern Spain (Catalonia). *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2931-4>
- Laranjo-González, M., Devleeschauwer, B., Trevisan, C., Allepuz, A., Sotiraki, S., Abraham, A., Afonso, M. B., Blocher, J., Cardoso, L., Correia Da Costa, J. M., Dorny, P., Gabriël, S., Gomes, J., Gómez-Morales, M. Á., Jokelainen, P., Kaminski, M., Krt, B., Magnussen, P., Robertson, L. J., Dermauw, V. (2017). Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe. *Parasites and Vectors*, 10(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2280-8>
- Lartigue, M. F., Héry-Arnaud, G., Haguenoer, E., Domelier, A. S., Schmit, P. O., Van Der Mee-Marquet, N., Lanotte, P., Mereghetti, L., Kostrzewa, M., & Quentin, R. (2009). Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2284–2287. <https://doi.org/10.1128/JCM.00175-09>
- Lavigne, J. P., Espinal, P., Dunyach-Remy, C., Messad, N., Pantel, A., & Sotto, A. (2013). Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(2), 257–270. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0291>
- Local, B., & Search, A. (2007). Sequenzähnlichkeitssuche mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) in den Sequenzdatenbanken des NCBI.

- Biowissenschaftlich Recherchieren*, 79–112. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8526-2_6
- Lu, K., Ye, W., Zhou, L., Collins, L. B., Chen, X., Gold, A., Ball, L. M., & Swenberg, J. A. (2010). Structural characterization of formaldehyde-induced cross-links between amino acids and deoxynucleosides and their oligomers. *Journal of the American Chemical Society*, 132(10), 3388–3399. <https://doi.org/10.1021/ja908282f>
- Mackey, T. K., Liang, B. A., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K. C., & Lee, D. E. (2014). Emerging and reemerging neglected tropical diseases: A review of key characteristics, Risk factors, And the policy and innovation environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 949–979. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-14>
- Martinez, R. M., Bauerle, E. R., Fang, F. C., & Butler-Wu, S. M. (2014). Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2521–2529. <https://doi.org/10.1128/JCM.00529-14>
- Marzano, V., Pane, S., Foglietta, G., Mortera, S. L., Vernocchi, P., Muda, A. O., & Putignani, L. (2020b). Mass spectrometry based-proteomic analysis of *anisakis* spp.: A preliminary study towards a new diagnostic tool. *Genes*, 11(6), 693. <https://doi.org/10.3390/genes11060693>
- Mayer-Scholl, A., Murugaiyan, J., Neumann, J., Bahn, P., Reckinger, S., & Nöckler, K. (2016). Rapid identification of the foodborne pathogen *trichinella* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *PLoS ONE*, 11(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152062>
- McManus, D. P. (2006). Molecular discrimination of *taeniid cestodes*. *Parasitology International*, 55, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.004>
- Medical Care Development International, & U.S. Health. (2010). *Diagnostic Findings - Taeniasis*. https://mcdinternational.org/trainings/malaria/english/dpdx5/html/Frames/S-Z/Taeniasis/body_Taeniasis_mic1
- Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A. D., Drake, R. R., Eigner, U., Fahr, A. M., He, Y., Ilina, E. N., Kostrzewa, M., Maier, T., Mancinelli, L., Moussaoui, W., Prévost, G., Putignani, L., Seachord, C. L., Tang, Y. W., & Harmsen, D. (2009). High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3732–3734. <https://doi.org/10.1128/JCM.00921-09>
- Melter, O., & Castelhana, R. (2019). Helminths. In *The MicroBook : Clinical Microbiology*

- for Medical Students* (pp. 280–290). Charles University in Prague, Karolinum Press.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=2175055&lang=de&site=ehost-live>
- Murrell, K. D., Dorny, P., Flisser, A., Geerts, S., Kyvsgaard, N. C., McManus, D. P., Nash, T. E., & Pawlowski, Z. S. (2005). Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis. In *WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis*.
- Mwape, K. E., & Gabriël, S. (2014). The Parasitological, Immunological, and Molecular Diagnosis of Human Taeniasis with Special Emphasis on *Taenia solium* Taeniasis. *Current Tropical Medicine Reports*, 1(4), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0028-5>
- Nagorny, S. A., Aleshukina, A. V., Aleshukina, I. S., Ermakova, L. A., & Pshenichnaya, N. Y. (2019). The application of proteomic methods (MALDI-toff MS) for studying protein profiles of some nematodes (*dirofilaria and ascaris*) for differentiating species. *International Journal of Infectious Diseases*, 82, 61–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.02.047>
- Ndimubanzi, P. C., Carabin, H., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y. J., Rainwater, E., Dickey, M., Reynolds, S., & Stoner, J. A. (2010). A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000870>
- Nebbak, A., El Hamzaoui, B., Berenger, J. M., Bitam, I., Raoult, D., Almeras, L., & Parola, P. (2017). Comparative analysis of storage conditions and homogenization methods for tick and flea species for identification by MALDI-TOF MS. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 438–448. <https://doi.org/10.1111/mve.12250>
- Nebbak, Amira, & Almeras, L. (2020). Identification of *Aedes mosquitoes* by MALDI-TOF MS biotyping using protein signatures from larval and pupal exuviae. *Parasites and Vectors*, 13(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04029-x>
- Ng-Nguyen, D., Stevenson, M. A., Dorny, P., Gabriël, S., Vo, T. Van, Nguyen, V. A. T., Phan, T. Van, Hii, S. F., & Traub, R. J. (2017). Comparison of a new multiplex real-time PCR with the Kato Katz thick smear and copro-antigen ELISA for the detection and differentiation of *Taenia* spp. in human stools. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005743>
- Ohnishi, K., & Kato, Y. (2003). Single low-dose treatment with praziquantel for *Diphyllobothrium nihonkaiense* infections. *Internal Medicine*, 42(1), 41–43.

- <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.42.41>
- Okamoto, M., Nakao, M., Blair, D., Anantaphruti, M. T., Waikagul, J., & Ito, A. (2010). Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitology International*, 59(1), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.007>
- Okello, A. L., & Thomas, L. F. (2017). Human taeniasis: Current insights into prevention and management strategies in endemic countries. *Risk Management and Healthcare Policy*, 10, 107–116. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S116545>
- Ouarti, B., Laroche, M., Righi, S., Meguini, M. N., Benakhla, A., Raoult, D., & Parola, P. (2020). Development of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lice isolated from farm animals. *Parasite*, 27, 28. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020026>
- Palmer-Toy, D. E., Krastins, B., Sarracino, D. A., Nadol, J. B. J., & Merchant, S. N. (2005). Efficient method for the proteomic analysis of fixed and embedded tissues. *Journal of Proteome Research*, 4(6), 2404–2411. <https://doi.org/10.1021/pr050208p>
- Payne, M. E., & Grayson, S. M. (2018). Characterization of synthetic polymers via matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Journal of Visualized Experiments*, 136, 1–15. <https://doi.org/10.3791/57174>
- Pezzotti, P., Ludovisi, A., Boufana, B., Dorny, P., Kortbeek, T., Blocher, J., Schmidt, V., Amati, M., Gabriël, S., Pozio, E., Winkler, A. S., Ring, T., & Participants, T. (2021). Collaborative Studies for the Detection of *Taenia* spp . Infections in Humans within CYSTINET , the European Network on Taeniosis / Cysticercosis. *Microorganisms*, 9(6), 1173.
- Pshenichnaya, N., Nagorny, S., Aleshukina, A., Ermakova, L., & Krivorotova, E. (2015). Paper Poster Session II MALDI - TOF Application of matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry for the identification of *Dirofilaria* species. 3, 347.
- QIAGEN. (2020). DNeasy Blood & Tissue Handbook. In *Qiagen*. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/>
- Raoul, F., Li, T., Sako, Y., Chen, X., Long, C., Yanagida, T., Wu, Y., Nakao, M., Okamoto, M., Craig, P. S., Giraudoux, P., & Ito, A. (2013). Advances in diagnosis and spatial analysis of cysticercosis and taeniasis. *Parasitology*, 140(13), 1578–1588. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001303>
- Rettinger, A., Krupka, I., Grünwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., Raschel, H., Busch, U., Sing, A., Straubinger, R. K., & Huber, I. (2012). *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing

- and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*, 12, 185.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-185>
- Rettinger, A. L. (2013). Anwendbarkeit der Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) für den Nachweis und die Differenzierung von *Leptospira* spp. im Vergleich zum Multilocus Sequence Typing (MLST). Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Richard D. Pearson. (2018). Diphyllbothriasis (Fischbandwurminfektion). *MSD Manuals*.
- Romig, T, Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., Massolo, A., Craig, P. S., Wassermann, M., Takahashi, K., & de la Rue, M. (2017). Chapter Five - Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. In R. C. A. Thompson, P. Deplazes, & A. J. B. T.-A. in P. Lymbery (Eds.), *and Echinococcosis, Part A* (Vol. 95, pp. 213–314). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>
- Romig, Thomas. (2003). Epidemiology of echinococcosis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 388(4), 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00423-003-0413-3>
- Rostami, S., Salavati, R., Beech, R. N., Babaei, Z., Sharbatkhori, M., & Harandi, M. F. (2015). Genetic variability of *Taenia saginata* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Parasitology Research*, 114(4), 1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4314-5>
- Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infection*, 2(4), 1–5.
<https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>
- Rychert, J., Slechta, E. S., Barker, A. P., Miranda, E., Babady, N. E., Tang, Y. W., Gibas, C., Wiederhold, N., Sutton, D. A., & Hanson, K. E. (2018). Multicenter evaluation of the vitek ms v3.0 system for the identification of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(2), 1–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.01353-17>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sanpool, O., Rodpai, R., Intapan, P. M., Sadaow, L., Thanchomnang, T., Laymanivong, S., Maleewong, W., & Yamasaki, H. (2017). Genetic diversity of *Taenia saginata* (Cestoda: Cyclophyllidae) from Lao People's Democratic Republic and northeastern Thailand based on mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2079-7>
- Saratsis, A., Sotiraki, S., Braae, U. C., Devleeschauwer, B., Dermauw, V., Eichenberger, R.

- M., Thomas, L. F., Bobić, B., Dorny, P., Gabriël, S., & Robertson, L. J. (2019). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: A systematic review of the distribution in the Middle East and North Africa. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3339-5>
- Scholz, T., Garcia, H. H., Kuchta, R., & Wicht, B. (2009). Update on the human broad tapeworm (genus *diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(1), 146–160. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-08>
- Schubert S., & Wieser A. (2010). MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 760–762.
- Šedo, O., Radolfová-Křížová, L., Nemeč, A., & Zdráhal, Z. (2018). Limitations of routine MALDI-TOF mass spectrometric identification of *Acinetobacter* species and remedial actions. *Journal of Microbiological Methods*, *154*, 79–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.009>
- Sharifdini, M., Nematdoost, K., Shafiei, R., & Teimouri, A. (2021). Acute eosinophilic appendicitis caused by *Taenia saginata*: A case report. *Annals of Medicine and Surgery*, *64*, 102241. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102241>
- Sharma, K., Wijarnpreecha, K., & Merrell, N. (2018). *Diphyllobothrium latum* Mimicking Subacute Appendicitis . *Gastroenterology Research*, *11*(3), 235–237. <https://doi.org/10.14740/gr989w>
- Schubert, S., & Kostrzewa, M. (2017). MALDI-TOF MS in Microbiology Laboratory: Current trends. *Current Issues in Molecular Biology*, *23*, 17–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28504240><http://www.caister.com/cimb/abstracts/v23/17.html><https://dx.doi.org/10.21775/cimb.023.017>
- Steinmann, P., Utzinger, J., Du, Z. W., Jiang, J. Y., Chen, J. X., Hattendorf, J., Zhou, H., & Zhou, X. N. (2011). Efficacy of single-dose and triple-dose albendazole and mebendazole against soil-transmitted helminths and *taenia* spp.: A randomized controlled trial. *PLoS ONE*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025003>
- Sy, I., Margardt, L., Ngbede, E. O., Adah, M. I., Yusuf, S. T., Keiser, J., Rehner, J., Utzinger, J., Poppert, S., & Becker, S. L. (2021). Identification of adult *fasciola* spp. Using matrix-assisted laser/desorption ionization time-of-flight (maldi-tof) mass spectrometry. *Microorganisms*, *9*(1), 82. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010082>
- Sy, I., Wendel, T., Feucherolles, M., Nimmersgern, A., Steuermann, A., Endres, Y., Utzinger, J., Poppert, S., & Becker. (2020). Application of MALDI-TOF MS for identification of helminths in clinical samples. *Project: Helminths - Use of MALDI-TOF MS for the*

Identification of Helminths of Medical and Veterinary Interest.

- Symeonidou, I., Arsenopoulos, K., Tzilves, D., Soba, B., Gabriël, S., & Papadopoulos, E. (2018). Human taeniasis/cysticercosis: A potentially emerging parasitic disease in Europe. *Annals of Gastroenterology*, *31*(4), 406–412. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0260>
- Tamarozzi, F., Legnardi, M., Fittipaldo, A., Drigo, M., & Cassini, R. (2020). Epidemiological distribution of *Echinococcus granulosus* infection in human and domestic animal hosts in European Mediterranean and Balkan countries: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008519>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Torgerson, P. R., Abdybekova, A. M., Minbaeva, G., Shapiyeva, Z., Thomas, L. F., Dermauw, V., Devleeschauwer, B., Gabriël, S., Dorny, P., Braae, U. C., Saratsis, A., Robertson, L. J., & Bobić, B. (2019). Epidemiology of *Taenia saginata* taeniosis/cysticercosis: A systematic review of the distribution in central and western Asia and the Caucasus. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3438-3>
- Torgerson, P. R., & Macpherson, C. N. L. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*, *182*(1), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.017>
- Torres-sangiao, E., Leal Rodriguez, C., & García-riestra, C. (2021). Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. *Microorganisms*, *9*(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>
- Tsuchida, S., Umemura, H., & Nakayama, T. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser. *Molecules*, *25*(20), 4775.
- U.S. Department of Health & Human Services. (2013). *Center for Disease Control and Prevention - Parasites Taeniasis*. <https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/biology.html#>
- 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*, 19–22. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13727>
- Vercruyse, J., Levecke, B., & Prichard, R. (2012). Human soil-transmitted helminths: Implications of mass drug administration. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *25*(6), 703–708. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328358993a>

- Waldenmaier, C. (2013). *Potential und praktische Anwendung der MALDI-TOF Technologie für die Analyse von Bakteriengemeinschaften* [Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig zur].
<https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDsQFjABahUKEwjxrufH0OnGAhXIKnIKHWlvDAE&url=http://przyrbwn.icm.edu.pl/APP/PDF/123/a123z1p17.pdf&ei=sN6sVfGWI-XVyAPp3rEI&usg=AFQjCNHVe0VtykfO4y1S6XRGUGm-sWmAYA&sig2=e8vl4JJt>
- Weiß, M., & Göker, M. (2011). *The Yeasts* (T. B. Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell (ed.); Fifth Edit). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00012-4>
- Wendel, T. P., Feucherolles, M., Rehner, J., Poppert, S., Utzinger, J., Becker, S. L., & Sy, I. (2021). Evaluating different storage media for identification of *Taenia saginata* proglottids using maldi-tof mass spectrometry. *Microorganisms*, 9(10), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102006>
- Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). *Comparative Genomics: Volumes 1 and 2*. (N. H. Bergman (ed.)). Humana Press.
- White, A. C., Coyle, C. M., Rajshekhar, V., Singh, G., Hauser, W. A., Mohanty, A., Garcia, H. H., & Nash, T. E. (2018). Diagnosis and treatment of neurocysticercosis: 2017 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4), 945–966. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-88751>
- Wicht, B., de Marval, F., & Peduzzi, R. (2007). *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Yamane et al., 1986) in Switzerland: First molecular evidence and case reports. *Parasitology International*, 56(3), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.02.002>
- Wilkins, P. P., Allan, J. C., Verastegui, M., Acosta, M., Eason, A. G., Hugo Garcia, H., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., & Tsang, V. C. W. (1999). Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 199–204. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.199>
- World-Health-Organization. (n.d.). *Neglected Tropical Diseases*.
https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/,
- World-Health-Organization. (2022). *Ending NTDs: Together towards 2030*.
- World-Health-Organization, & National Centre for Parasitology (CNM), C. (2020). *Developing capacity to monitor parasitic NTDs through Kato-Katz in Cambodia*.

Worldbank. (n.d.).

- Wunschel, S. C., Jarman, K. H., Petersen, C. E., Valentine, N. B., Wahl, K. L., Schauki, D., Jackman, J., Nelson, C. P., & White, E. 5th. (2005). Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *16*(4), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.12.004>
- Yamane, K., Suzuki, Y., Tachi, E., Li, T., Chen, X., Nakao, M., Nkouawa, A., Yanagida, T., Sako, Y., Ito, A., Sato, H., & Okamoto, M. (2012). Recent hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*. *Parasitology International*, *61*(2), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.005>
- Yamasaki, H., Allan, J. C., Sato, M. O., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Qiu, D., Mamuti, W., Craig, P. S., & Ito, A. (2004). DNA Differential Diagnosis of Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(2), 548–553. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.548-553.2004>
- Zeller-Péronnet, V., Brockmann, E., Pavlovic, M., Timke, M., Busch, U., & Huber, I. (2013). Potential and limitations of MALDI-TOF MS for discrimination within the species *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, *8*(3), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s00003-013-0826-z>
- Zhang, W., Che, F., Tian, S., Shu, J., & Zhang, X. (2015). Molecular identification of *Diphyllobothrium nihonkaiense* from 3 human cases in Heilongjiang Province with a brief literature review in China. *Korean Journal of Parasitology*, *53*(6), 683–688. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.683>
- Zhou, M., Yang, Q., Kudinha, T., Sun, L., Zhang, R., Liu, C., Yu, S., Xiao, M., Kong, F., Zhao, Y., & Xu, Y. C. (2017). An improved in-house MALDI-TOF MS protocol for direct cost-effective identification of pathogens from blood cultures. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01824>

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden von mir als Erstautorin in der Fachzeitschrift *Microorganisms* (Impact Factor: 4.5) publiziert:

Wendel TP, Feucherolles M, Rehner J, Poppert S, Utzinger J, Becker SL, Sy I. Evaluating different storage media for identification of *Taenia saginata* proglottids using MALDI-TOF mass spectrometry. *Microorganisms*. 2021;9(10):2006. doi: 10.3390/microorganisms9102006.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich im Rahmen dieser Promotionsarbeit unterstützt und gefördert haben.

Allen voraus ein besonderer Dank an das gesamte Laborteam der Mikrobiologie, die mir das praktische Arbeiten im Labor nähergebracht haben und mir all meine Fragen geduldig beantwortet haben.

Vielen Dank an meinen Doktorvater *Herrn Professor Dr. Dr. Sören Becker*, der durch seine spannenden Vorlesungen mein Interesse an der Mikrobiologie und Tropenmedizin geweckt hat und mich in dieser Promotionsarbeit in jedem Schritt bestens beraten und unterstützt hat. Sein Engagement, Wertschätzung und Begeisterung werden mir ein Vorbild für mein weiteres Arbeiten sein.

An *Issa Sy* für die Betreuung meiner Arbeit und meiner Publikation. Vielen Dank für die Mitarbeit und Unterstützung bei jeglichen Fragen und Problemen.

Sowie an *Anna Nimmersgern* und *Maureen Feucherolles*, für die Vorarbeit, Organisation der Proben und schnelle unkomplizierte Hilfe.

Danke an unsere Kooperationspartner *Herrn Professor Dr. Jörg Utzinger* vom Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) für die Bereitstellung der Proben und Mitarbeit an der Veröffentlichung sowie an das Team des Department of Tropical Medicine and Parasitology der Dokkyo Medical University.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich in jeder Phase meines Studiums und der Promotionsarbeit liebevoll unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank an meine Eltern *Michaela* und *Christoph* für die bedingungslose Unterstützung, die viele investierte Zeit und das Vertrauen während meiner gesamten Ausbildung. Sowie an meine Schwester *Anna*, für die fachliche Hilfe bei zugegebenermaßen dummen Fragen und das offene Ohr, wenn mal wieder alles schief zu gehen schien. Ohne eure Hilfe hätte ich es niemals so weit geschafft. Vielen Dank für Alles!

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung nicht veröffentlicht.

