

**Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV,
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Leiter: Professor Dr. med. Thomas Löscher

**Etablierung einer PCR für *Strongyloides stercoralis* anhand
von Isolaten aus Tansania**

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

vorgelegt von
Moritz Pompl
aus Nürnberg
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bärbel Stecher
Prof. Dr. Roland Kappler

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nicole Berens-Riha

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2012

Teile der Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht als:

***Strongyloides spp.* infection in a non-endemic country (in travellers) confirmed by a novel real-time PCR**

M. Pompl¹, H. Rinder², E. Fleischmann¹, T. Löscher¹, N. Berens-Riha¹

¹ Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, University of Munich, Germany

² Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 <i>Strongyloides species</i>	8
1.2 Humanpathogene Strongyloiden	8
1.2.1 Arten	8
1.2.2 Verbreitung	9
1.2.3 Morphologie, Übertragung und Pathogenese	10
1.2.4 Symptome einer <i>Strongyloides</i> -Infektion	13
1.2.4.1 Symptome bei akuter Infektion	13
1.2.4.2 Symptome bei chronischer Strongyloidiasis	13
1.2.4.3 Hyperinfektions-Syndrom und disseminierte Strongyloidiasis	13
1.2.5 Auswirkungen auf die Bevölkerung	14
1.2.6 Diagnosemöglichkeiten der Strongyloidiasis	15
1.2.6.1 Direkte Nachweismethoden	16
1.2.6.2 Indirekte Nachweismethoden	17
1.2.7 Therapieoptionen bei Strongyloidiasis	17
2 Problemstellung und Zielsetzung	19
3 Patienten, Material und Methoden	21
3.1 Studienort, Patienten und Proben	21
3.1.1 Studienort, Mbeya Medical Research Programme	21
3.1.2 Studienteilnehmer, Proben und Fragebögen	22
3.1.2.1 Auswahl der Sites und der Teilnehmer	22
3.1.2.2 Probenerhebung und Verarbeitung	23
3.1.2.3 Körperliche Untersuchungen und Interviews	24
3.1.3 Patientenproben aus dem Tropeninstitut München	25
3.2 Methoden, Material und Durchführung	26
3.2.1 Baermann-Methode	26
3.2.1.1 Grundprinzip der Baermann-Methode	26
3.2.1.2 Durchführung des Baermann-Verfahrens im Labor	26
3.2.2 MIFC (Merthiolat-Iod-Formalin-Konzentration)	27
3.2.2.1 Grundprinzip der MIFC	27
3.2.2.2 Durchführung der MIFC im Labor	28
3.2.3 Kato-Katz-Verfahren	29
3.2.3.1 Grundprinzip der Kato-Katz-Methode	29
3.2.4 DNA-Extraktion aus Stuhlproben	30
3.2.4.1 Grundprinzip der DNA-Extraktion	30
3.2.4.2 Durchführung der DNA-Extraktion im Labor	30
3.2.5 DNA-Extraktion aus Baermann-Überständen / <i>S. ratti</i>	32
3.2.6 Photometrische Messung der DNA-Konzentration	33
3.2.6.1 Grundprinzip der photometrischen Messung	33
3.2.6.2 Durchführung der photometrischen Messung im Labor	34
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.2.7.1 Grundprinzip der PCR	34
3.2.7.2 Primerdesign	35
3.2.7.3 Durchführung der konventionellen PCR (cPCR) im Labor	35
3.2.8 Gelelektrophorese	36
3.2.8.1 Grundprinzip der Gelelektrophorese	36
3.2.8.2 Durchführung der Gelelektrophorese im Labor	37

3.2.9 Real-time-PCR (rtPCR)	38
3.2.9.1 Grundprinzip der Real-time-PCR.....	38
3.2.9.2 Durchführung der Real-time-PCR im Labor	39
3.2.10 Genom-Sequenzierung	40
3.2.10.1 Grundprinzip der DNA-Sequenzierung.....	40
3.2.10.2 Durchführung der Genom-Sequenzierung im Labor	40
3.2.11 AK-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	42
3.2.11.1 Grundprinzip des AK-ELISA.....	42
3.2.11.2 Durchführung des AK-ELISA im Labor.....	43
4 Ergebnisse	45
4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
4.1.1 Primerdesign	45
4.1.2 Erprobung der konventionellen PCR (cPCR)	48
4.2 Ergebnisse Proben Tansania	50
4.2.1 Baermann-Sediment	50
4.2.2 MIFC.....	51
4.2.3 Kato-Katz-Verfahren.....	51
4.2.4 Vergleich von Baermann, MIFC und Kato-Katz für unterschiedliche Helmithiasis	51
4.2.4.1 <i>Strongyloides stercoralis</i>	52
4.2.4.2 <i>Hookworm spp.</i>	52
4.2.4.3 <i>Ascaris lumbricoides</i>	53
4.2.4.4 <i>Taenia spp.</i>	53
4.2.4.5 <i>Hymenolepis spp.</i>	53
4.2.4.6 <i>Enterobius vermicularis</i>	54
4.2.4.7 Ermittlung eines Zusammenhangs von Doppelinfektionen	54
4.2.5 AK-ELISA Proben Tansania	55
4.2.6 Konventionelle PCR (cPCR) Proben Tansania	55
4.2.6.1 cPCR mit Stuhlproben	55
4.2.6.2 cPCR mit Baermann-Sediment	56
4.2.7 Real-time-PCR (rtPCR) Proben Tansania.....	57
4.2.8 Sequenzierung Proben Tansania	57
4.2.9 Messung des DNA-Gehaltes der Proben	57
4.2.9.1 DNA-Nachweis mittels Gel-Elektrophorese.....	57
4.2.9.2 Photometrische Messung des DNA-Gehaltes	57
4.2.10 Interviews und Untersuchungen	58
4.3 Ergebnisse Patientenproben München	60
4.3.1 Akkreditierung der Real-time-PCR (rtPCR).....	61
4.3.1.1 Intraassay und Interassay der rtPCR	61
4.3.1.2 Sensitivität der rtPCR	62
4.3.1.3 Spezifität der rtPCR.....	63
4.3.1.4 Linearität der rtPCR.....	64
4.3.1.5 Matrix-Effekt der rtPCR	65
4.3.2 Akkreditierung der konventionellen PCR (cPCR).....	65
4.3.2.1 Intraassay und Interassay der cPCR.....	65
4.3.2.2 Sensitivität der cPCR.....	66
4.3.2.3 Spezifität der cPCR	66
4.3.2.4 Linearität der cPCR	67

5 Diskussion	68
5.1 Epidemiologische Aspekte	68
5.2 Strongyloidiasis und Diagnostik	68
5.2.1 Stand der Dinge	68
5.2.2 Diagnostik in der vorliegenden Arbeit.....	70
5.2.2.1 Baermann-, Kato-Katz-Methode und MIFC im Vergleich	70
5.2.2.2 Prävalenz von Strongyloidiasis in der Mbeya-Region	70
5.2.2.3 Geschlechtsspezifische Aspekte der Strongyloidiasis.....	71
5.2.2.4 Weitere Helmintiasis und Doppelinfektionen	71
5.2.2.5 Konventionelle PCR und Real-time-PCR Proben Tansania.....	72
5.2.2.6 Konventionelle PCR und Real-time PCR Proben München.....	74
5.3 Schlussfolgerungen	
 6 Zusammenfassung	 77
 7 Danksagung	 80
 8 Abkürzungsverzeichnis	 81
 9 Literaturverzeichnis	 82
 10 Verwendete Fragebögen	 89

Abbildungsquellenverzeichnis

Fußnote	Quelle
1	M. Pompl (Fotos und Grafiken)
2	http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/map/en/
3	Mahon, C.R., D.C. Lehman, and G. Manuselis, <i>Textbook of diagnostic microbiology</i> . 3rd ed. 2007, [St. Louis, Mo.]: Saunders Elsevier. xix, 1211 p.
4	http://www.ecoi.net/file_upload/1006_1175764002_tanzania.pdf
5	Kartenmaterial des Geografischen Informationssystems (GIS), modifiziert durch Dr. Elmar Saathoff
6	John, D.T.P., William A.: Markell and Voge's Medical Parasitology. 9 ed. 2006: Saunders. 480.

Unserem Opa Max gewidmet, der mir die Liebe zur Natur gezeigt hat.

1 Einleitung

"Let it be remembered how many lives and what a fearful amount of suffering have been saved by the knowledge gained of parasitic worms through the experiments of Virchow and others..."

Charles Darwin

The Times (London) [1]

18 April 1881



Abb. 1:¹ Kinder im Projektdorf Isongole

1.1 Strongyloides species

Strongyloides stercoralis gehört zum Stamm der parasitär lebenden Nematoden (Fadenwürmer) und wird auch als Zwergfadenwurm bezeichnet. Ebenso wie die noch häufigeren Fadenwurmart *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* und die die Familie der Hakenwürmer bildenden *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus* werden Strongyloiden über den Erdboden auf den jeweiligen Endwirt übertragen (Geohelminthen, engl.: *soil-transmitted helminths*).

Im Pubmed Taxonomy Browser sind 19 verschiedene, taxonomisch der Gattung *Strongyloides* zugeordnete Arten gelistet [2]. Manche Autoren unterscheiden mehr als 50 Arten, Unterarten und Typspezies von Strongyloiden, wobei eine Einteilung und Unterscheidung häufig schwierig sein kann (Tab. 1).

Nachgewiesenermaßen humanpathogen sind jedoch nur die zwei Arten *Strongyloides stercoralis* und *Strongyloides fuelleborni*.

Art	Wirtsorganismus
<i>Strongyloides akbari</i>	Bisamratte
<i>Strongyloides avium</i>	Huhn, Truthahn, Gans, Ente, Wildvögel
<i>Strongyloides cebus</i>	Brüllaffe, Kapuzineraffe
<i>Strongyloides fuelleborni kellyi</i>	Mensch
<i>Strongyloides fuelleborni fuelleborni</i>	Mensch, Altweltaffe [3]
<i>Strongyloides mirzai</i>	Hakennasennatter
<i>Strongyloides myopotami</i>	Biberratte
<i>Strongyloides ophidiae</i>	Schlange
<i>Strongyloides papillosus</i>	Hase, Kaninchen, Ziege, Rind, Schaf, Wildwiederkäuer
<i>Strongyloides planiceps</i>	Hund, Katze, Fuchs
<i>Strongyloides procyonis</i>	Washbär
<i>Strongyloides ransomi</i>	Hausschwein
<i>Strongyloides ratti</i>	wild lebender Nager, experimentell: Labornager
<i>Strongyloides robustus</i>	Hörnchen
<i>Strongyloides sp. ex snake</i>	Schlange
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Mensch, Hund, Katze, Affe
<i>Strongyloides suis (syn. Ransomi)</i>	Schwein, Wildschwein
<i>Strongyloides westeri</i>	Pferd und andere Einhufer
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	Wanderratte

Tab. 1: Auswahl wichtiger *Strongyloides*-Arten und deren Wirt. Humanpathogene Arten sind fettgedruckt [4, 5].

1.2 Humanpathogene Strongyloiden

1.2.1 Arten

Der Hauptvertreter und bestuntersuchte der humanpathogenen Zwergfadenwurm-Arten ist *Strongyloides stercoralis*. Der Erreger wurde erstmals 1876 im Stuhl von französischen Soldaten entdeckt, die mit einer Durchfallerkrankung aus Indochina zurückkehrten [6]. Aktuell sind nach Schätzungen der WHO zwischen 30 und 100 Millionen Menschen in 70 Ländern weltweit Träger dieses Parasiten [7]. In anderen Quellen sind Zahlen von bis zu 600 Millionen infizierten Personen angegeben [8].

Neben *Strongyloides stercoralis* sind beim Menschen Infektionen bekannt, die auf *Strongyloides fuelleborni fuelleborni* zurückzuführen sind. Diese können besonders in afrikanischen Ländern schwerwiegende Symptome bei Kindern hervorrufen [7, 9]. Eine Subspezies stellt *Strongyloides fuelleborni kellyi* dar, der in Papua Neuguinea als humanpathogener Erreger nachgewiesen wurde [10].

In der vorliegenden Arbeit ist mit *Strongyloides*, soweit nicht anders vermerkt, *Strongyloides stercoralis* gemeint.

1.2.2 Verbreitung

Humanpathogene Strongyloiden kommen weltweit vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten vor. Besonders häufig sind Infektionen in Ländern mit niedrigen Hygienestandards, in denen Böden oder Trinkwasser oft mit Fäkalien kontaminiert sind [11]. In Entwicklungsländern betrifft die Erkrankung in erster Linie Menschen aus einfachen Verhältnissen und bestimmte Berufsgruppen wie Bauern oder Minenarbeiter, die oft in Kontakt mit kontaminiertem Boden kommen [12].

Daneben sind auch im Osten der Vereinigten Staaten von Amerika und in Australien Endemiegebiete bekannt [13-15].

In gemäßigten Klimazonen hingegen wird die Diagnose der Strongyloidiasis vor allem bei Fernreisenden gestellt, die aus Endemiegebieten zurückkehren. Gehäufte Infektionen finden sich zudem in Gemeinschaftseinrichtungen für Menschen mit geistiger Behinderung [16].

Die Datenlage zur geografischen Verteilung von Strongyloiden ist insgesamt allerdings lückenhaft, nicht zuletzt aufgrund der für die Diagnose der Strongyloidiasis mangelhaften, in großen epidemiologischen Studien zu Helminthen aber häufig verwendeten Untersuchungstechniken wie der Kato-Katz-Methode [17].

Die weltweite Prävalenz korreliert jedoch grob mit derjenigen anderer Wurmerkrankungen, zu denen ausreichende epidemiologische Daten vorliegen (Abb. 2).

In einigen asiatischen Ländern wie Laos, Kambodscha oder Vietnam wird die Prävalenz von Strongyloiden auf bis zu 10% der Bevölkerung geschätzt [18]. In Teilen Süd- und Mittelamerikas scheint die Verbreitung ebenfalls relativ groß zu sein [19-22]. Endemisch sind Strongyloiden zudem in Afrika zu finden. Hier wurde und wird die Prävalenz mit unter 1% aber niedriger angegeben [23], als es nach jüngeren Studien der Fall ist, sodass auch für viele afrikanische Länder von einer deutlich höheren Prävalenz ausgegangen werden muss [24, 25].

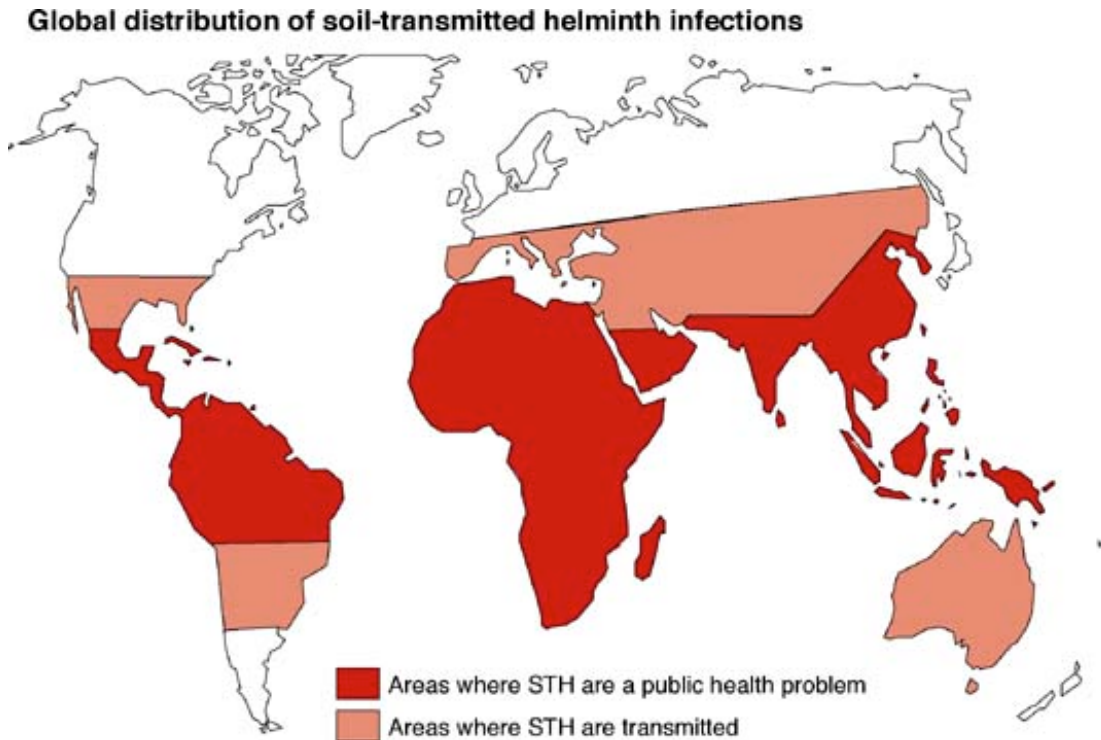


Abb. 2:² Weltweite Verbreitung humanpathogener Helminthen mit Auswirkung auf die öffentliche Gesundheit

1.2.3 Morphologie, Übertragung und Pathogenese

Die filariformen, infektiösen Larven der Strongyloiden werden vor allem bei Barfußlaufenden aus kontaminiertem Erdboden, in dem die Larven bei feuchtem Milieu mehrere Wochen überleben können, über die Haut aufgenommen. Enger körperlicher Kontakt, homosexueller Geschlechtsverkehr bei Männern und Organtransplantationen stellen weitere Übertragungsmöglichkeiten dar. Zudem gibt es Vermutungen, dass Larven auch beim Baden in Gewässern sowie über unreines Trinkwasser oder über die Muttermilch in den Körper gelangen können [26, 27]. Geophagie, das Essen von Erde, das in afrikanischen Ländern relativ verbreitet ist, scheint hingegen nicht mit Strongyloidiasis assoziiert zu sein [28].

Offenbar werden die Larven von Urocaninsäure angezogen, einem Histidin-Metaboliten, der sich in menschlicher Haut und deren Exkretionen befindet und im Fußbereich besonders hohe Konzentrationen erreicht [29]. Die Larven bohren sich durch die Cutis der Füße und suchen Anschluss an ein Blut- oder Lymphgefäß, wobei sie unter der Haut Gänge hinterlassen können, die als Larva-Migrans-Symptomatik imponieren [30, 31]. Die besonders schnelle Ausbreitung der *Strongyloides*-Larven in den Gängen von bis zu 10 cm pro Stunde hat ihnen den Beinamen *Larva-currens* eingebracht [32]. Über den venösen Blutstrom bzw. der Fortbewegung in der Lymphbahn gelangen die Larven in die Lunge. Sie durchbohren die Alveolen und werden aufgehustet und verschluckt, wodurch die Larven den Magen und schließlich den Dünndarm erreichen.

Im distalen Duodenum und im Jejunum wachsen die Larven zu adulten Würmern heran, die sich in den Mikrovilli aufhalten und etwa 2–3 Wochen nach Infestation mit

der Produktion von täglich bis zu 2.000 parthenogenetisch entwickelten Eiern beginnen, die ins Darmlumen abgegeben werden [33]. Mit Ausnahme der Ergebnisse zweier als widerlegt geltender Publikationen konnten in Dünndarmaspirationen ausschließlich weibliche adulte Strongyloiden nachgewiesen werden [34]. Diese sind mit einer Länge von 2–2,5 mm und einem Durchmesser von 30–50 µm deutlich größer als die nur etwa 0,7 mm langen und 14 µm dicken Männchen [35].

Nur selten und vorwiegend im Rahmen schwerwiegender Infektionen werden bei Befall mit *Strongyloides stercoralis* Eier im Stuhl nachgewiesen – im Gegensatz zu *Strongyloides fuelleborni*, wo dies regelhaft vorkommt (diese ähneln Hakenwürmern und sind etwa 50 µm lang und 30 µm breit [36, 37]). Stattdessen schlüpfen aus den *Stercoralis*-Eiern im Regelfall bereits während der Darmpassage rhabditiforme, ca. 300–500 µm lange und 20 µm dicke, nicht infektiöse Larven (Abb. 3), die mit den Fäzes an die Umwelt gelangen. Dort stehen den wegen ihres muskulösen, gedrungenen und mit einem Endbulbus ausgestatteten Ösophagus als rhabditiform bezeichneten Larven zwei Möglichkeiten offen: Entweder sie verwandeln sich in 500–700 µm lange, infektiöse, sog. filariforme Larven mit fadenförmigem Ösophagus, die direkt wieder in einen neuen Wirt eindringen können, oder es entstehen adulte Würmer, die im feuchten Erdboden mehrere Wochen überlebensfähig sind und bei ausreichender Mindesttemperatur von 15 °C Eier legen, aus welchen wiederum infektiöse Larven entstehen [38]. In der freien Natur kommen im Gegensatz zu den ausschließlich weiblichen adulten Formen im Wirtsorganismus auch männliche Würmer vor.

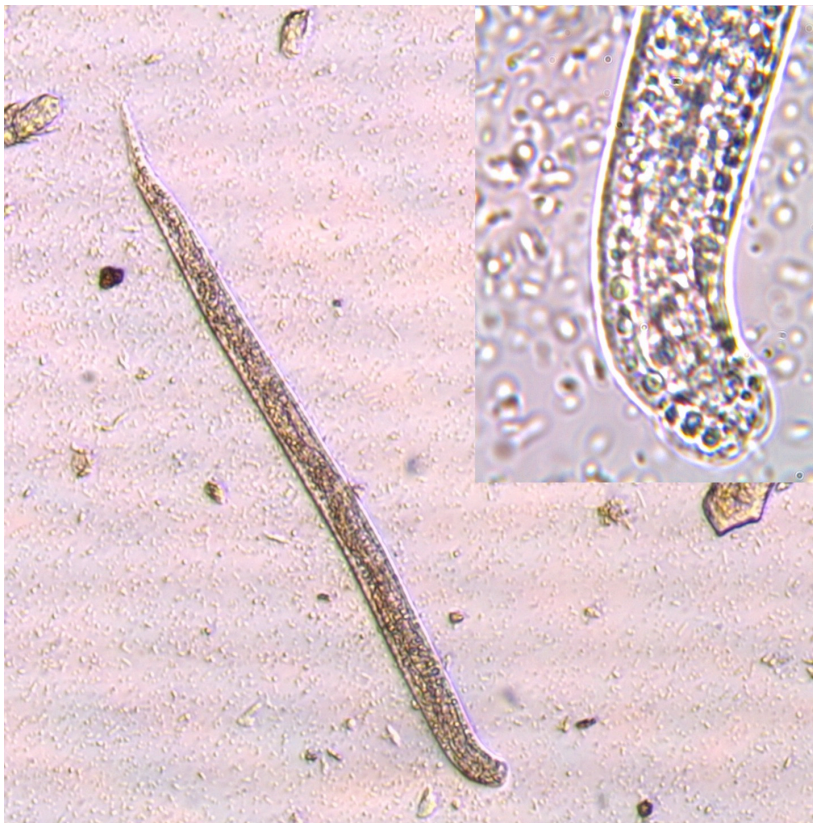


Abb. 3:¹
Lichtmikroskopische Darstellung einer rhabditiformen Larve von *Strongyloides stercoralis* im Baermann-Sediment, rechts oben vergrößerter Ausschnitt des Kopfbereiches mit kurzem Ösophagus

Eine Sonderform der *Strongyloides*-Entwicklung stellt die Autoinfektion dar, welche entweder intern oder extern erfolgen kann. Hierbei entwickeln sich aus den rhabditiformen Larven noch während der Darmpassage – und nicht erst nach deren Ausscheidung – filariforme Larven, die schon im Darmlumen (interne Autoinfektion) bzw. extern, vor allem in der Afterregion, Anschluss an die Blut- oder Lymphbahn des Wirtes finden. Diese Larven gelangen somit direkt wieder zum rechten Herzen und zur Lunge, um schließlich erneut den Dünndarm zu erreichen, wo sie zu adulten Weibchen heranreifen.

Die Autoinfektion kann bei chronischer Strongyloidiasis im immunkompetenten Patienten über Jahre weitgehend unbemerkt persistieren, läuft allerdings bei Immunkompromittierten im Rahmen des Hyperinfektionssyndroms aufgrund einer ungenügenden Immunantwort wesentlich massiver ab. Vormalig gesunde Patienten können so selbst nach Jahrzehnten ein Hyperinfektionssyndrom entwickeln, z.B. unter einer längeren Cortison-Behandlung [39, 40].

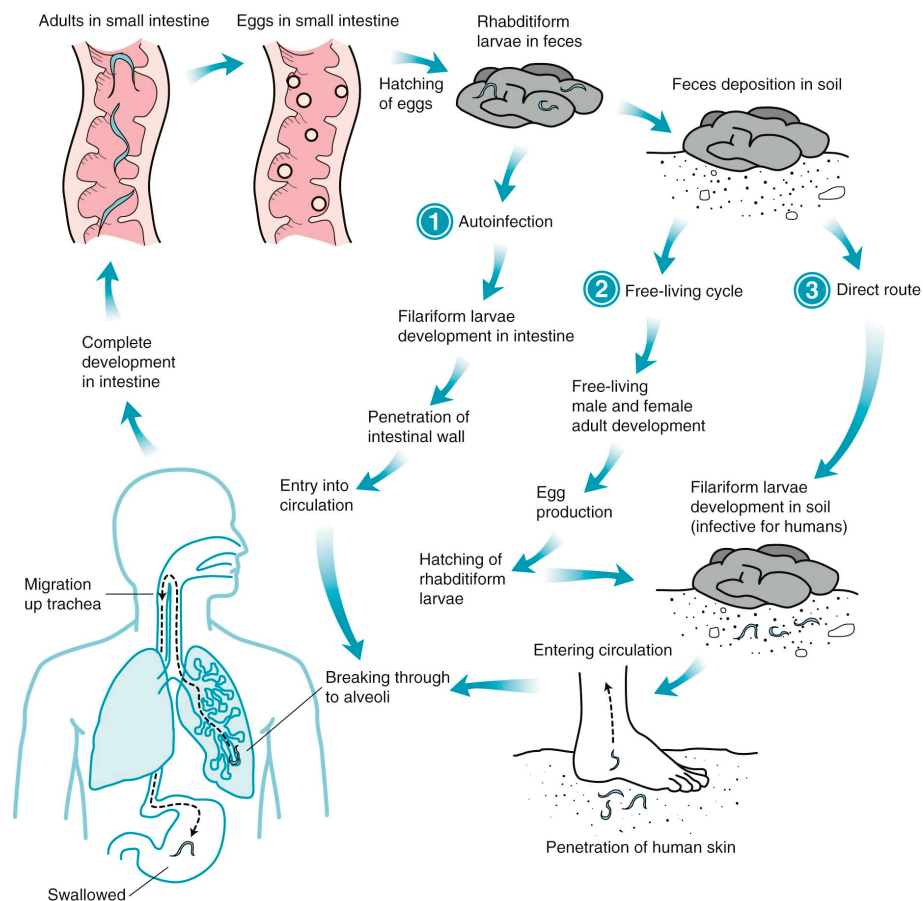


Abb. 4:³ Infektionszyklus von *Strongyloides stercoralis* [35]

1.2.4 Symptome einer Strongyloides-Infektion

1.2.4.1 Symptome bei akuter Infektion

Das Eindringen der Larven in die Haut mit Gangbildung („*Larva-migrans*“) kann lokal zu akutem Pruritus und serpiginösen Exanthenen führen. Diese Symptome verschwinden meist innerhalb weniger Tage, können aber auch mehrere Wochen andauern. Es sind allerdings auch Fälle bekannt, bei denen es aufgrund der Schnelligkeit der „rennenden Larven“ von bis zu 10 cm/h zu kaum bemerkbaren Hauterscheinungen kommt. Generell verspüren Touristen eher starken Juckreiz, während von der einheimischen Bevölkerung häufig keine Larva-Migrans-Symptomatik beschrieben wird [36]. Die Hauterscheinungen sind meist im Fuß- oder Knöchelbereich lokalisiert. Bei externer Autoinfektion ist vor allem der Perianalbereich betroffen, es kommen aber, abhängig vom Hygieneverhalten, auch andere Körperpartien in Frage.

Im Rahmen der Lungenpassage der Larven kann eine Pneumonitis auftreten, welche mit trockenem Husten, Dyspnoe, eosinophiler Infiltration und eventuell Hämoptoe einhergehen kann. Dies wird auch als Löffler-Syndrom bezeichnet [41].

Ab etwa zwei Wochen nach der Infektion kommen gastrointestinales Beschwerden mit meist epigastrischen Schmerzen und Diarrhö, Obstipation und Appetitlosigkeit vor. Nach weiteren zwei Wochen werden die ersten infektiösen Larven mit dem Stuhl ausgeschieden [42]. Im Blut ist wie bei anderen Helminthiasen oft eine unspezifische Eosinophilie festzustellen.

1.2.4.2 Symptome bei chronischer Strongyloidiasis

In den meisten Fällen verläuft die chronische Strongyloidiasis asymptomatisch [43]. Es werden allerdings wie bei der akuten Infektion gastrointestinale Beschwerden mit epigastrischen Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhö oder Obstipation beschrieben. Durch die in der Mukosa verankerten adulten Strongyloiden kommt es häufig zu einer entzündlichen Infiltration der Darmschleimhaut, mit ödematöser Schwellung, Ulzerationen und petechialen Blutungen [44]. Bei ausgeprägten Infektionen kann es zu Fieber und Gewichtsabnahme mit Entwicklung eines Malabsorptionssyndroms kommen. Durch den Lungenbefall kann eine Pneumonitis auftreten, die klinisch teils wie eine bakterielle Pneumonie imponiert. Auch chronischer Husten und Dyspnoe werden beobachtet [45]. Typischerweise ist auch hier als unspezifisches Zeichen eine Bluteosinophilie festzustellen. Zudem treten urtikariaähnliche Hauterscheinungen auf [46-48].

1.2.4.3 Hyperinfektions-Syndrom und disseminierte Strongyloidiasis

Im Gegensatz zum oft asymptomatischen Befall mit Strongyloiden bei Immunkompetenten kann es bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem zu schwerwiegenden Komplikationen kommen.

Die Entwicklung des Hyperinfektionssyndroms wird durch eine immunsuppressive Therapie mit Corticoiden im Rahmen einer anderen Erkrankung begünstigt [49].

Dabei steht die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) an erster Stelle. Einige Studien konnten zeigen, dass ein Hyperinfektionssyndrom bereits nach einer kurzen Behandlungsdauer mit hochdosiertem Methylprednison i.v. von weniger als zehn Tagen, oder nach weniger als 20 Tagen oraler Prednison-Therapie auftreten kann [34, 50, 51].

Darüber hinaus betrifft die Erkrankung vor allem Patienten mit Alkoholismus [52] oder hämatologischen Neoplasien [53], Organtransplantierte [39], sowie Träger des humanen T-Zell-Virus (HTLV-1) [42, 54, 55]. Auch Patienten mit AIDS im fortgeschrittenen Stadium scheinen anfälliger für ein Hyperinfektionssyndrom bei Strongyloidiasis zu sein [56], allerdings wird nach bisherigen Erkenntnissen nicht von einer typisch opportunistischen Infektion gesprochen [7, 57].

Personen mit entsprechenden Erkrankungen oder solche, die sich in einer Cortison-Therapie befinden, sollten zur Vermeidung einer *Strongyloides*-Infestation mit Nachdruck darauf hingewiesen werden, bei Reisen in südliche Länder auf das Tragen von festem Schuhwerk zu achten [58].

Charakteristisch für das Hyperinfektionssyndrom ist die beschleunigte interne und externe Autoinfektion, also eine gesteigerte Wanderung der Larven im Wirtsorganismus. Diese geht einher mit einer verstärkten Manifestation von gastrointestinalen und pulmonalen Symptomen und kann in eine disseminierte Strongyloidiasis übergehen. Das bedeutet, dass die Larven neben Darm und Lunge auch andere Organe wie Leber, Herz oder ZNS befallen. Bei Kindern ist eine Assoziation zum nephrotischen Syndrom beschrieben [59]. Es kann zu Sepsis, Hepatosplenomegalie, ulzerierender Enterokolitis [60], Darmobstruktionen und paralytischem Ileus [61] sowie zu schweren Pneumonien mit Hämoptysen bis hin zum ARDS kommen. Bei ZNS-Befall reichen die Symptome von Kopfschmerzen und Meningismus bis hin zu Krämpfen und Koma.

Das Hyperinfektionssyndrom tritt bei etwa 1,5–2,5% der Patienten mit Strongyloidiasis auf. Die Mortalitätsrate liegt je nach Quellenangabe zwischen 15% und 87%. Von entscheidender Bedeutung für eine Heilung sind eine schnelle Diagnose und Therapie [62, 63].

1.2.5 Auswirkungen auf die Bevölkerung

Es wird angenommen, dass weltweit mehr als zwei Milliarden Menschen von Wurminfektionen betroffen sind, davon 30–100 Millionen von *Strongyloides stercoralis*. Auch Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Wurmartarten treten auf. Nach Schätzungen der WHO ist weltweit von etwa 135.000 Todesfällen pro Jahr durch Wurminfektionen auszugehen [64].

Bei Kindern in Entwicklungsländern, die von chronischen Wurminfektionen betroffen sind, treten gehäuft Mangelernährung mit Wachstumsretardierung und intellektuellen Defiziten auf, was sich negativ auf die schulischen Leistungen und somit auf die Wirtschaftlichkeit des jeweiligen Landes auswirkt. Auch wenn diese Folgen kaum von anderen Gründen abzugrenzen sind, gelten Wurminfektionen als wichtiger

Grund für mangelhafte wirtschaftliche Produktivität in Entwicklungsländern. Die negativen Effekte werden von manchen Autoren mit denen von Malaria oder Tuberkulose gleichgestellt [65].

Trotz allem wird den Wurminfektionen von medizinischer Seite nach wie vor zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt, und gerade *Strongyloides stercoralis* wird von einigen Wissenschaftlern als fatalerweise von der Forschung vernachlässigter Parasit eingeschätzt [66]. Forschungsinteressen und -finanzierung bewegen sich in überschaubaren Dimensionen, da vorwiegend der ärmste Teil der Menschheit betroffen ist. Außerdem lassen sich die klinischen Beschwerden aufgrund des chronischen Verlaufs oft schwer erfassen und die erwähnten negativen Auswirkungen auf Bildung und Wirtschaft sind nur schlecht quantifizierbar [67].

1.2.6 Diagnosemöglichkeiten der Strongyloidiasis

Die Differentialdiagnose einer Strongyloidiasis sollte bei jeder klinischen Symptomatik mit gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhö oder Oberbauchschmerzen, Eosinophilie und erhöhtem Serum-IgE berücksichtigt werden [13, 68]. Der Verdacht erhärtet sich weiter beim Vorliegen einer Larva-Migrans-Symptomatik.

Zum Routinenachweis stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Der direkte Nachweis der Larven ist möglich im Stuhl oder Duodenalsaft. *Strongyloides*-Larven können unter Umständen auch im Bronchialsekret, Sputum oder Urin nachgewiesen werden, bei disseminiertem Befall zudem in Liquor oder Aszitesflüssigkeit [86]. Gelegentlich werden die sehr kleinen Adultwürmer endoskopisch im Duodenum oder selten auch im Jejunum entdeckt und können dann für die Artbestimmung extrahiert bzw. geborgen werden.

Meist erfolgt der Nachweis aus Stuhlproben, die möglichst frisch untersucht werden sollten. Ein mikroskopischer Direktnachweis gelingt nur selten und am ehesten bei hyperinfektiver Strongyloidiasis. Fast immer sind Anreicherungsverfahren mit anschließendem mikroskopischem Nachweis erforderlich, wie die Kato-Katz-Methode, die MIFC, oder Auswanderungsmethoden wie die Harada-Mori-Filterpapiermethode, die Agar-Platten-Kultur oder die Baermann-Sedimentation.

Indirekte Nachweismethoden beruhen auf dem Nachweis spezifischer Antikörper.

Trotz der verschiedenen Diagnosemöglichkeiten gilt der Nachweis von Strongyloiden als schwierig, nicht zuletzt deshalb, weil die Menge der ausgeschiedenen Larven mit dem Stuhl stark variieren kann [69]. In zwei Drittel der Fälle finden sich weniger als 25 Larven pro Gramm Stuhl. Für die einmalige direkte Stuhluntersuchung wird von einem falsch negativen Ergebnis von bis zu 70% ausgegangen, bei drei Untersuchungen pro Patient wird in einigen Studien von einer Sensitivität von 50% ausgegangen [36, 70]. Die Ausscheidung von Larven kann für einen leichteren Nachweis durch die vorherige, einmalige Gabe von Albendazol gesteigert werden, allerdings ist dieses Verfahren im klinischen Alltag kaum umzusetzen [71].

1.2.6.1 Direkte Nachweismethoden

Kato-Katz-Methode

Diese in Entwicklungsländern häufig angewandte Methode wird von der WHO zur Diagnostik und bei epidemiologischen Untersuchungen für Schistosomiasis und verschiedene Geohelminthen empfohlen. Sie ist auch als Kit für Felduntersuchungen verfügbar (vgl. 3.2.3), gilt aber zur Detektierung von *Strongyloides*-Larven als weitgehend ungeeignet [16, 74].

MIFC (Merthiolat-Iod-Formalin-Konzentration, vgl. 3.2.2)

Dies ist eine sensitive Standardanreicherungsmethode zum Nachweis zahlreicher intestinaler Helminthiasen. Zum Nachweis von *Strongyloides*-Larven ist sie aber im Vergleich zu Baermann- oder Agar-Platten-Verfahren weniger gut geeignet [17, 73].

Baermann-Methode (vgl. 3.2.1)

Diese wird von zahlreichen Autoren als zuverlässigste Diagnosemöglichkeit beschrieben, es sind jedoch auch bei diesem arbeitsintensiven Verfahren je nach Menge der ausgeschiedenen Larven oft mehrere Stuhluntersuchungen desselben Patienten notwendig, um die Diagnose einer Strongyloidiasis zu sichern [17, 72].

Agar-Platten-Kultur

Bei dieser relativ teuren und arbeitsintensiven Methode wird eine Stuhlprobe von etwa 2 g in die Mitte einer Petri-Schale mit Agar aufgebracht [75]. Im Verlauf können die Spuren der potentiell im Stuhl vorhandenen *Strongyloides*-Larven auf dem Agar beobachtet werden.

Zur Diagnose der Strongyloidiasis wird dieses Verfahren von einigen Autoren der Baermann-Sedimentation vorgezogen [76-78]. Andere Studien weisen auf eine höhere Sensitivität der Baermann-Sedimentation hin [17]. Eine Überlegenheit gegenüber MIFC und Kato-Katz-Technik wurde beschrieben [77, 79], wobei in einigen Studien bis zu 20% der *Strongyloides*-haltigen Stühle von der MIFC, nicht aber vom Agar-Platten-Verfahren erfasst wurden [73, 80].

Harada-Mori-Filterpapiermethode

Wie bei der Agar-Platten-Kultur macht man sich auch bei diesem Verfahren das Wanderverhalten der Larven zu Nutze. Eine Stuhlprobe von 1–2 g wird hierbei auf einen Filterpapierstreifen aufgebracht. Dieser wird in ein Zentrifugenröhrchen mit destilliertem Wasser gestellt, sodass die Probe etwa 1 cm über dem Wasserniveau zu liegen kommt. Über einen Zeitraum von etwa 10 Tagen wird täglich eine kleine Wassermenge vom Boden des Röhrchens entnommen und lichtmikroskopisch auf Larven untersucht [16].

Duodenalaspiration

In Zweifelsfällen kann eine Duodenalaspiration im Rahmen einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie mit anschließendem mikroskopischem Nachweis der Strongyloiden durchgeführt werden. In der Routinediagnostik findet diese Methode jedoch trotz guter Sensitivität aufgrund ihrer Invasivität nur in Spezialfällen Anwendung, dann vor allem bei immunsupprimierten Kindern, bei denen bei Verdacht auf eine schwerwiegende Infektion mit *Strongyloides stercoralis* schnellstmöglich die Diagnose mit Einleitung einer entsprechenden Therapie erfolgen muss [7].

1.2.6.2 Indirekte Nachweismethoden

Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Strongyloides*-Antigene wird am häufigsten der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) verwendet (vgl. 3.2.11). Hierbei werden als Antigen meist Larven-Extrakte von *Strongyloides ratti* oder anderen nicht humanpathogenen *Strongyloides*-Arten verwendet, die eine hohe Kreuzreaktivität mit *Strongyloides stercoralis*-Antigenen aufweisen. Bei guter Sensitivität wird eine relativ niedrige Spezifität des Verfahrens beschrieben. Kreuzreaktionen bei Patienten mit Ankylostomiasis, Filariose, Ascariasis, Schistosomiasis und anderen Wurminfestationen sind häufig [21, 81, 82]. Das Verfahren wird von manchen Autoren zur Verlaufskontrolle nach der Therapie oder in Kombination mit der Baermann-Sedimentation empfohlen [83, 84]. Für Immigranten mit chronischer Infektion wird eine höhere Sensitivität beschrieben als für Reisende [85]. Neben dem ELISA können Antikörper auch mittels indirektem Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden [87].

1.2.7 Therapieoptionen bei Strongyloidiasis

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Wurminfestationen zeigt eine einmalige anthelmithische Therapie bei Strongyloidiasis meist keine ausreichende Wirkung. Bei Immunkompetenten hat sich eine Verabreichung von 400 mg Albendazol 2x täglich über 3–7 Tage bewährt [88]. Bei Patienten unter 60 kg Körpergewicht wird auf eine Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht 2x täglich zurückgegriffen.

Noch häufiger kommt aber mittlerweile das hochwirksame Ivermectin zum Einsatz, welches in einer Dosierung von 200 µg/kg Körpergewicht über 1–3 Tage verabreicht wird und in Studien teils eine Überlegenheit gegenüber Albendazol aufwies [89, 90]. Nach 2–3 Wochen wird eine Wiederholung der Therapie empfohlen.

Beim Vorliegen eines Hyperinfektionssyndroms muss die Behandlung meist über einen längeren Zeitraum, beispielsweise über vier Wochen, gewährleistet sein [91]. Hier hat sich bei Erwachsenen als auch bei Kindern Ivermectin bewährt [92, 93]. Der Therapieerfolg sollte durch mehrfache Stuhlproben überprüft werden. Bei Rezidiven sollte eine Koinfektion mit HTLV-1 ausgeschlossen werden [94].

Die Prognose der Strongyloidiasis ist bei rechtzeitiger Diagnose und adäquater Behandlung in der Regel gut.

Unlängst wurde von der WHO festgestellt, dass Ivermectin bei Entwurmungskampagnen im Public-Health-Bereich nach wie vor in zu geringem Umfang eingesetzt wird. Gegen Strongyloiden konnte mit dem Einsatz von Ivermectin teils eine Reduktion der Prävalenz von 94% erreicht werden [95]. Allerdings ist auch hier der Therapieerfolg bei klassischer Einmalgabe im Rahmen großangelegter Entwurmungskampagnen in Frage zu stellen [96].

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Anzahl der weltweiten Strongyloides-Infestationen wird auf mindestens 30–100 Millionen Menschen in etwa 70 Ländern der Erde beziffert [7].

Als diagnostische Methoden zum Direktnachweis einer Strongyloidiasis im Stuhl stehen die Baermann-Sedimentation, die MIFC und die Kato-Katz-Methode zur Verfügung, wobei von den genannten die für breite epidemiologische Studien verwendete Kato-Katz-Methode die unzuverlässigsten Ergebnisse zum Nachweis von *Strongyloides* erbringt [74]. Die Baermann-Methode scheint laut früherer Studien der MIFC überlegen, aber auch sie liefert teils unbefriedigende Ergebnisse und bedarf aufgrund der variablen Ausscheidung von Larven oft multipler Stuhluntersuchungen [17].

Als weitere Verfahren werden die Agar-Platten-Methode und die Harada-Mori-Filterpapiermethode angewandt. Die Agar-Platten-Methode wird von manchen Autoren der Baermann-Sedimentation vorgezogen [76, 77]. Andere Wissenschaftler wiederum weisen auf eine Überlegenheit der Baermann-Sedimentation hin [17].

Darüber hinaus findet der AK-ELISA Anwendung in der Diagnostik von *Strongyloides*-Infektionen. Allerdings ist dieses Verfahren bei guter Sensitivität relativ unspezifisch und weist Kreuzreaktionen mit anderen Wurminfestationen auf [82, 97]. Zudem erlaubt der Nachweis von Antikörpern keine zuverlässige Unterscheidung zwischen einer aktuellen Infektion und Durchseuchungstitern aufgrund früheren, spontan oder chemotherapeutisch ausgeheilten Infektionen.

Keines der genannten Verfahren zum Nachweis von *Strongyloides* wird letztlich den potentiell lebensbedrohlichen Gefahren gerecht, die für den Infizierten von diesem Parasiten ausgehen.

Die Datenlage zur Prävalenz der Strongyloidiasis in Entwicklungsländern ist nicht zuletzt aufgrund der mangelhaften Diagnosemöglichkeiten lückenhaft und möglicherweise sind weit mehr Menschen betroffen als bisher angenommen. Manche Autoren gehen von bis zu 600 Millionen Infizierten aus [8]. Es muss damit gerechnet werden, dass es – nicht zuletzt im Rahmen der AIDS-Pandemie – weltweit zu einer Zunahme an fulminant verlaufenden Infektionen mit Strongyloiden kommen könnte [22]. Auch wenn die Assoziation zwischen HIV-Infektion und Strongyloidiasis nicht restlos geklärt ist, so weisen Studien teils auf eine höhere Prävalenz von *Strongyloides* bei HIV-Positiven hin [98].

Problematisch ist außerdem die Tatsache, dass durch die zunehmend steigende Reiseaktivität der Bevölkerung [99] mit einer weiteren Zunahme an Infektionen mit tropischen Erregern und somit auch mit *Strongyloides stercoralis* zu rechnen ist. Folglich wird es wahrscheinlich zukünftig auch in Deutschland zu einem Anstieg an *Strongyloides*-bedingten Hyperinfektionssyndromen bei immunkompromittierten Patienten kommen.

Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. Es soll eine PCR etabliert werden, mit deren Hilfe *Strongyloides*-Infektionen zuverlässiger als mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden diagnostiziert werden können. Die Akkreditierung der Methode erfolgt dabei für eine konventionelle PCR und eine Real-time-PCR auf dem Roche LightCycler® zur Routineanwendung im Tropeninstitut München. Die Methode soll in der Routinediagnostik implementiert und in klinische und diagnostische Algorithmen integriert werden, um die Diagnostik der Strongyloidiasis zu verbessern. Gleichzeitig sollen hiermit aussagekräftigere Daten zur Prävalenz bei Reisenden und Populationen in Endemiegebieten gewonnen werden.
2. Außerdem soll ein Überblick über die Prävalenz von *Strongyloides*-Infektionen in der Mbeya-Region in Tansania gewonnen werden, gegebenenfalls mit dem Ziel, im Rahmen des Mbeya Medical Research Programmes den Nachweis von Strongyloidiasis mittels PCR großflächiger anzuwenden.
3. Zuletzt soll ein Vergleich zwischen Kato-Katz-Verfahren, Baermann-Methode und MIFC im Hinblick auf die Diagnose verschiedener Wurminfestationen in der Region Mbeya gezogen werden.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Studienort, Patienten und Proben

3.1.1 Studienort, Mbeya Medical Research Programme

Tansania ist mit einer Fläche von mehr als 945.000 km² das größte ostafrikanische Land und zählte zum Zeitpunkt der Erhebung (2009) rund 41 Millionen Einwohner [100]. Dodoma gilt als offizielle Hauptstadt, das an der Küste gelegene Dar es Salaam ist jedoch das eigentliche wirtschaftliche und kulturelle Zentrum des Landes. Von dort führen die wichtigsten Straßen Tansanias nördlich nach Arusha und Kenia, in südwestlicher Richtung über Mbeya nach Sambia und Malawi.

Die Stadt Mbeya gilt mit etwa 290.000 Einwohnern als viertgrößte Stadt Tansanias und ist Verwaltungssitz der gleichnamigen Region im südwestlichen Hochland. Sie ist etwa 850 km von Dar es Salaam, 120 km von der Malawischen und 100 km von der Sambischen Grenze entfernt.

Die Region Mbeya grenzt im Süden an den drittgrößten afrikanischen See, den Lake Nyasa (Malawisee), wo tropisch heißes Klima vorherrscht und die

Prävalenz von

Malaria entsprechend hoch ist [101]. Ein Großteil der Region liegt aber in gebirgigem Hochland, die Stadt Mbeya selbst befindet sich auf einer Höhe von etwa 1.700 m über dem Meer.

In der Stadt sind die Labors des Mbeya Medical Research Programmes (MMRP) ansässig, welches seit mehreren Jahren die häufigsten Infektionskrankheiten der Region Mbeya, v.a. HIV, Malaria, Tuberkulose, sowie seit kurzem auch Wurminfek-



Abb. 5:⁴ Politische Karte Tansanias mit Studienregion

tionen untersucht, und sich zum Ziel gesetzt hat, in enger Kollaboration mit den Tansanischen Gesundheitsbehörden geeignete Strategien zur Bekämpfung der genannten Erkrankungen mitzuentwickeln. Das Team des MMRP umfasst mittlerweile mehr als 60 Mitarbeiter und arbeitet mit zahlreichen Institutionen zusammen, wie unter Anderem mit dem Tropeninstitut der LMU München, der London School of Hygiene & Tropical Medicine und dem US Military HIV Research Program [102].

3.1.2 Studienteilnehmer, Proben und Fragebögen

3.1.2.1 Auswahl der Sites und der Teilnehmer

Das verwendete Untersuchungsmaterial stammte aus drei von neun verschiedenen Sites in der Region Mbeya, die an der seit 2006 laufenden Emini-Studie unter der Leitung der LMU München teilnehmen: Mlowo, Santyllia und Isongole.

Die neun Studiengebiete des Emini-Projektes sind in einem Radius von maximal 120 km um Mbeya-Stadt so ausgewählt, dass sie in der Kombination ihrer jeweiligen Eigenschaften (Gebirgslage vs. Flachland, städtisch vs. ländlich, Highway-nah vs. entlegen) einen repräsentativen Durchschnitt der Bevölkerung vor Ort darstellen. Nach GPS-Markierung wurde die gesamte Bevölkerung gezählt und zu Haushaltskriterien befragt (etwa 180.000 Personen in 45.000 Haushalten). Per Zufallsprinzip wurden davon 10% ausgewählt, diese nehmen seitdem an der Emini-Studie teil.

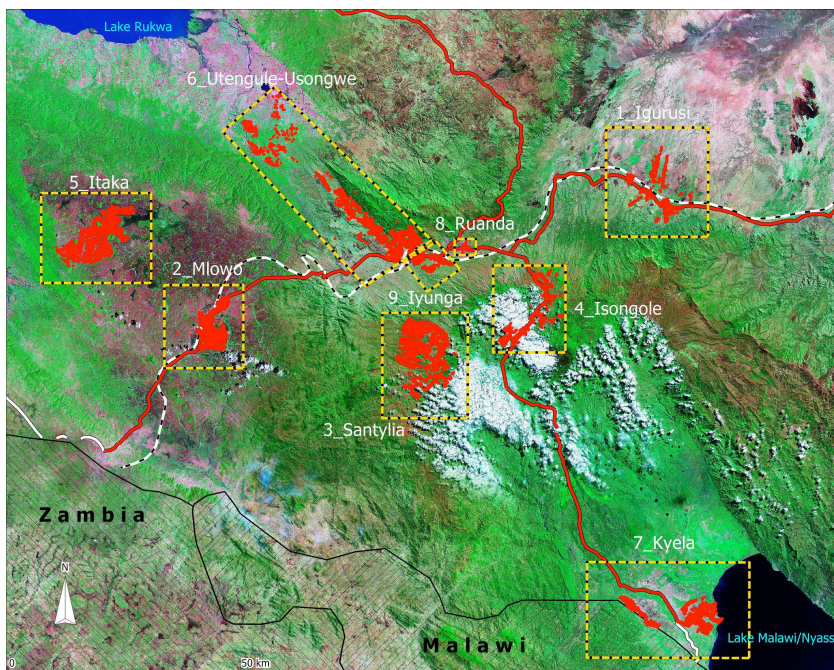


Abb. 6:⁵
Region Mbeya
mit Emini-Sites:

Mlowo liegt am Highway Richtung Sambia, etwa 40 km westlich von Mbeya.

Santyllia befindet sich im Hochland südwestlich der Stadt.

Isongole erstreckt sich in der bergigen Region entlang des Highways nach Malawi südlich von Mbeya.

In die Studie wurden im Verlauf neue Familienmitglieder, aber keine neuen Familien aufgenommen. Die Teilnehmer waren im Vorfeld über die Studie aufgeklärt worden und eine entsprechende Einwilligung als „informed consent“ der Probanden war Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie.

Die Partizipanten werden auf HIV, Malaria, Tuberkulose und Wurmerkrankungen als häufigste Infektionskrankheiten der Region untersucht. Hierfür werden neben Stuhl-, Urin- und Blutproben bei Verdacht auf Tuberkulose auch Sputumproben erhoben.

Die Probanden der vorliegenden Arbeit waren im Schnitt 22,8 Jahre alt (range: 2–82). Von den 578 Teilnehmern waren 310 weiblichen und 269 männlichen Geschlechts.

3.1.2.2 Probenerhebung und Verarbeitung

Von August bis Dezember 2008 wurden insgesamt 594 Stuhlproben von 578 Teilnehmern (16 Doppeluntersuchungen) aus den drei Sites Mlowo, Santyilia und Isongole mit der Baermann-Sedimentation bzw. der MIFC auf Strongyloiden und andere Helminthiasis untersucht. Zusätzlich wurden die Proben im Rahmen der Emini-Studie von den tansanischen Mitarbeitern auch mit der Kato-Katz-Technik auf Wurminfektionen überprüft.

Site	Baermann-Sediment	MIFC-Verfahren	Kato-Katz-Technik
Mlowo	273 (88)	90	257
Santyilia	211 (38)	46	211
Isongole	99 (16)	16	99

Tab. 2: Anzahl der mit den verschiedenen Methoden untersuchten Stuhlproben nach Site. In Klammern jeweils die Anzahl der Proben, die auch mit dem MIFC-Verfahren untersucht wurden.

Die Stuhl- und Serumproben für die vorliegende Studie wurden per Zufallsprinzip aus den im Rahmen der Emini-Studie gesammelten Proben ausgewählt. Wichtig war hierbei allerdings, dass eine hinreichend große Stuhlmenge vorlag, um mit Baermann-Sediment, MIFC und Kato-Katz-Methode untersuchen zu können. Dies war nicht bei allen Proben gewährleistet, da teils nur geringe Stuhlmengen abgegeben wurden.

Die Proben wurden von sechs „Field-Teams“ in den Haushalten gesammelt und anschließend im Labor in Mbeya untersucht. Um einen schnellen Ablauf zu garantieren, wurden die leeren Stuhlbehälter bereits am Vorabend ausgehändigt, um dann beim Besuch des jeweiligen Haushaltes am nächsten Morgen eingesammelt zu werden.

Die Teams besuchten im Schnitt 20–30 Haushalte am Tag (etwa 80–120 Teilnehmer) und kehrten je nach Entfernung des Projektdorfes 2–5 mal pro Woche nach Mbeya zurück. Der Transport der Proben erfolgte in Kühlbehältern.

Die Stuhlproben wurden am selben, spätestens jedoch am nächsten Tag mit Baermann-Sedimentation, MIFC und Kato-Katz-Technik untersucht. Bei diagnostizierter Wurminfektion wurden die entsprechenden Teilnehmer im Anschluss medikamentös behandelt.

Von 125 der 578 untersuchten Stuhlproben wurden DNA-Extrakte für die nachfolgend in München durchgeführte PCR gewonnen und bei -18 °C zwischengelagert

sowie später auf Trockeneis nach Deutschland transportiert. Darunter befanden sich die in der Mikroskopie für *Strongyloides* positiven Probandenproben.

Im Vorfeld war die PCR in München mit Patientenproben aus dem Tropeninstitut und mit dem DNA-Extrakt aus L3-Larven von *Strongyloides ratti* erfolgreich erprobt worden (vgl. 4.1.2). Das Genom von *Strongyloides ratti* war beim Primerdesign berücksichtigt worden und wurde somit ebenfalls von der PCR erfasst.

Alle 125 Proben wurden im Münchener Tropeninstitut mittels cPCR und rtPCR auf Strongyloidiasis untersucht (vgl. 4.2.6 und 4.2.7).

Zu den 125 DNA-Proben wurden die entsprechenden Patienten-Blutseren ebenfalls bei -18 °C konserviert und im Anschluss mittels ELISA zum Strongyloiden-Antikörper-Nachweis im Tropeninstitut München untersucht.



Abb. 7:¹ Emini-Field-Team in Isongole bei der Blutentnahme

3.1.2.3 Körperliche Untersuchungen und Interviews

Von den Field-Teams wurden neben der Probenerhebung auch körperliche Untersuchungen und standardisierte Interviews durchgeführt (vgl. Kap. 10). Folgende Parameter aus den Untersuchungen und Interviews wurden bei der vorliegenden Studie berücksichtigt: Bauchschmerzen, Durchfall (wässrig, blutig, schwarz), Übelkeit, Erbrechen (wässrig, blutig), Husten (trocken, produktiv), Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Mangelernährung, Anämie, Juckreiz, Hautläsionen und allgemeine gesundheitliche Probleme. Außerdem wurden Alter und Geschlecht der Probanden registriert.

3.1.3 Patientenproben aus dem Tropeninstitut München

Im Zeitraum 2008–2011 wurden zusätzlich Stuhl- und Serumproben von Patienten gesammelt, die sich mit möglichen Symptomen einer Strongyloidiasis, wie Juckreiz, Durchfall, Übelkeit oder Husten, in der Ambulanz des Münchener Tropeninstituts vorstellten. Den Patienten wurde ein Stuhlgefäß ausgehändigt und der frische Stuhl wurde direkt nach Absetzen bzw. bei abendlicher Abgabe am nächsten Morgen mittels MIFC untersucht (die Baermann-Methode wurde aufgrund der aufwändigen Durchführung im Labor und der Gleichwertigkeit der MIFC in diesem Setting nicht bei allen Proben durchgeführt). Zudem wurde den Patienten für die Durchführung des AK-ELISA sowie zur Bestimmung von Eosinophilie und Serum-IgE Blut abgenommen (Bestimmung nach den Standard-Labormethoden des Tropeninstituts mit einem Referenzwert für Eosinophile von 1–4% der Leukozyten im Blutaussstrich und einem Referenz-Serum-IgE <100 U/l).

Die Patienten wurden über die Durchführung und Ziele der Studie informiert und ein schriftlicher „informed consent“ wurde eingeholt. Bei Nachweis einer Strongyloidiasis bekamen die Patienten eine medikamentöse Therapie mit Ivermectin nach Standardschema.

Insgesamt wurde aus 34 Stuhlproben DNA extrahiert. Diese Proben stammten von Patienten mit mikroskopischem oder serologischem Nachweis von *Strongyloides*, mit ehemaliger Strongyloidiasis, hoher Eosinophilie oder starkem klinischen Verdacht auf eine *Strongyloides*-Infestation.

Zudem wurden 20 Kontrollstühle von Patienten mit Mikrosporidien und 7 Stühle von Patienten mit potentiell kreuzreaktiven Wurminfestationen (Hookworm *spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichostrongylus*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Enterobius vermicularis* und *Schistosoma mansoni*) untersucht.

Insgesamt 11 positive Patientenproben mit positiven Ergebnissen für *Strongyloides* in der MIFC oder im AK-ELISA wurden mit cPCR und rtPCR auf Strongyloiden getestet. Außerdem wurden die Werte für Eosinophilie und Serum-IgE ermittelt. Die Proben dienten der Akkreditierung von cPCR und rtPCR zur Routinediagnostik (vgl. 4.3.1 und 4.3.2).

Die DNA-Extraktion aus den Stuhlproben erfolgte am selben Tag und äquivalent zu den tansanischen Probandenproben mittels Vor-Lyse unter Einsatz von DTT, KOH, HCl und Tris-HCl und dem anschließenden Qiagen-Standard-Protokoll (vgl. 3.2.4).

3.2 Methoden, Material und Durchführung

3.2.1 Baermann-Methode

3.2.1.1 Grundprinzip der Baermann-Methode

Die Baermann-Anreicherung ist ein auch in der Tiermedizin verwendetes Koprokultur-Verfahren. Potentiell in einer Stuhlprobe sich befindliche Nematodenlarven sedimentieren aufgrund ihrer Tendenz zur Auswanderung aus der Probe und ihrer Schwimmfähigkeit in einem wassergefüllten Trichter. Sie können anschließend lichtmikroskopisch nachgewiesen werden [103].

BEZEICHNUNG	FIRMA
Analyse-Trichter (ø ca. 10 cm)	VWR-international, D-Ismaning
Deckgläser	Menzel, D-Braunschweig
Lichtmikroskop	Zeiss, D-Jena
Objektträger	Menzel, D-Braunschweig
Pasteurpipetten	VWR-international, D-Ismaning
Schlauchklemmen	VWR-international, D-Ismaning
Silikonschlauch	VWR-international, D-Ismaning
Stativ	VWR-international, D-Ismaning
Stativringe mit Muffen	VWR-international, D-Ismaning
Verbandmull/Stoffgaze	Hartmann, D-Heidenheim
Zentrifuge	Hettich, D-Tuttingen
Zentrifugengläser (spitzbodig)	Neolab, D-Heidelberg

Tab. 3: für die Baermann-Sedimentation benötigte Labormaterialien

3.2.1.2 Durchführung des Baermann-Verfahrens im Labor

Zur Vorbereitung des Trichters wurde der Gummischlauch über den Trichterstützen gezogen, das Ende des Schlauches spitzwinklig abgeschnitten und mit einer Schlauchklemme verschlossen [104]. Am besten eignen sich gläserne Analysetrichter mit einem Durchmesser von 10 cm oder mehr.

Der Trichter wurde in die am Stativ fixierte Stativringhalterung gehängt. Anschließend wurde eine etwa walnussgroße, frische Stuhlprobe (ca. 10–20 g) in zwei Schichten Stoffgaze eingeschlagen und mit einer Wäscheklammer am Trichterrand fixiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Gaze vollständig innerhalb des Trichters zu liegen kommt, da sonst Wasser überlaufen kann. Wichtig ist außerdem, dass der Stuhl innerhalb der ersten Stunde nach Absetzen verarbeitet werden sollte, da Beweglichkeit und Intaktheit lebender Organismen danach nicht mehr gewährleistet sind [16]. Alternativ kann auf den Trichter ein feinmaschiges Sieb und darauf zwei Schichten Stoffgaze gelegt werden, auf denen die Stuhlprobe aufgebracht wird.

Dann wurde der Trichter bis zur Stoffgaze mit lauwarmem Leitungswasser angefüllt, sodass sich die Stuhlprobe etwa bis zur Hälfte im Wasser befand. In Mbeya war darauf zu achten, dass hinreichend gefiltertes Wasser verwendet wurde, um die Gefahr einer Verunreinigung durch unsauberes Leitungswasser zu minimieren. Die Probe wurde so mindestens 8 h lang, idealerweise über Nacht, bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine ausreichende Sedimentation potentiell im Stuhl vorhan-

dener Larven sicherzustellen. Dann waren etwa 10 ml Flüssigkeit aus dem Schlauch in ein Zentrifugenröhrchen abzulassen und 10 min bei 1500 U/min zu zentrifugieren. Aus dem gewonnenen Sediment wurde eine Probe entnommen, auf einen Objektträger aufgebracht und nach Auflegen eines Deckgläschens unter dem Lichtmikroskop untersucht. Aufgrund der Infektiosität der Larven war jederzeit auf das Tragen von Gummihandschuhen zu achten.

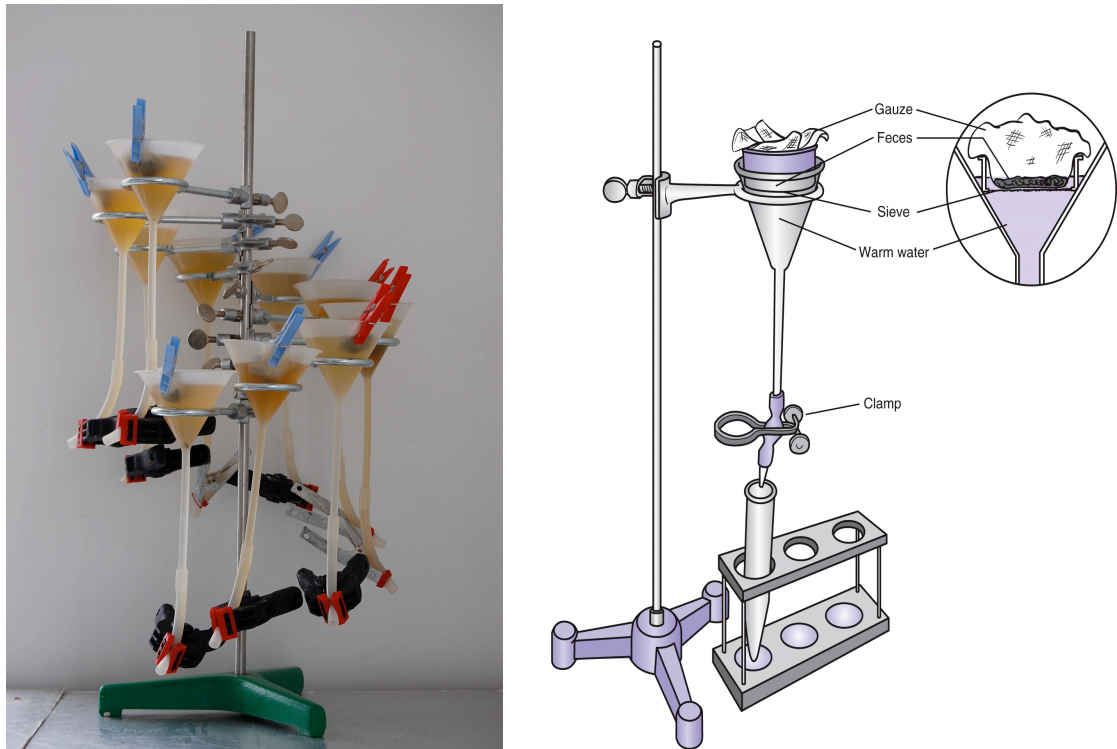


Abb. 8: Baermann-Versuchsaufbau im Labor in Mbeya¹, Schemazeichnung⁶

3.2.2 MIFC (Merthiolat-Iod-Formalin-Konzentration)

3.2.2.1 Grundprinzip der MIFC

BEZEICHNUNG	FIRMA
<i>Aqua dest.</i>	<i>Kerndl GmbH, D-Weissenfeld</i>
Formaldehyd	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Glyzerin	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Holzmundspatel	<i>Seidel GmbH, D-Buchendorf</i>
Holzstäbchen, stumpf	<i>Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, D-Hamburg</i>
Lichtmikroskop	<i>Zeiss, D-Jena</i>
MIF-Lösung ohne Thiomersal	<i>Apotheke Innenstadt, D-München</i>
Objektträger und Deckgläser	<i>Menzel, D-Braunschweig</i>
Pasteurpipette	<i>VWR-international, D-Ismaning</i>
Stuhlrührbecher (PS-Röhrchen, 10-30 ml)	<i>Greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhäusen</i>
Technischer Äther	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Trichter (ø etwa 5 cm)	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Verbandmull/Stoffgaze	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
Zellstofftupfer	<i>Lohmann & Rauscher International GmbH, D-Rengsdorf</i>
Zentrifuge, Zentrifugenröhrchen	<i>Hettich, D-Tuttligen</i>

Tab. 4: Für die MIFC benötigte Labormaterialien

Die zu einer Stuhlprobe hinzugegebene Merthiolat-Iod-Formalin-Lösung konserviert Parasiten dauerhaft, Helminteneier und Protozoenzysten werden zudem durch den Jodgehalt der Lösung leicht angefärbt. Nach Zentrifugation der gelösten Probe wird das Sediment im Lichtmikroskop untersucht [103].

Eine Alternative zur Fixierung von Parasiten stellt die quecksilberfreie SAF-Lösung dar (Natriumacetat-Essigsäure-Formalin-Lösung) [105]. Es kann aber auch eine modifizierte MIF-Lösung ohne das umweltschädliche Thiomersal hergestellt werden [16].

3.2.2.2 Durchführung der MIFC im Labor

Die MIF-Gebrauchslösung wurde auf Vorrat angesetzt und in einer Braunglasflasche gelagert (Haltbarkeit etwa 6 Monate) [103]. Sie wurde zusammengesetzt aus:

- 2000 ml MIF-Lösung ohne Thiomersal (bestehend aus Ethanolamin (0.10%), Ethylendiamin (0,028%), Natriumchlorid (0,80%), Di-Natrium-tetraborat-Decahydrat (0,14%) und gereinigtem Wasser (zu 100%))
- 250 ml Formaldehyd (37%)
- 50 ml Glycerin
- 2500 ml *Aqua dest.*

10 ml der MIF-Lösung wurden zu einem erbsengroßen Stück Kot hinzugegeben. Die Probe wurde mit zwei Holzstäbchen bis zur weitgehenden Lösung kräftig verrührt und 30 min zum Fixieren stehen gelassen. Der in ein Zentrifugenröhrchen gestellte Trichter war mit zwei Lagen Stoffgaze auszulegen. Dann wurde die gelöste Kotprobe mit Schwung in den Trichter überführt und die Stoffgaze mit den zwei Holzstäbchen ausgewrungen, sodass möglichst viel gelöstes Material im Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde. Nach Hinzugeben von 2 ml Äther wurde das Zentrifugenröhrchen mit dem Daumen verschlossen und der Inhalt durch mehrmaliges Kippen gemischt. Dabei führt der Äther zu einem Überdruck im Röhrchen, der durch mehrmaliges vorsichtiges Anheben des Daumens in einen Zellulosestopfen entlassen werden sollte. Anschließend wurde die Probe etwa 1 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Weiteren war es nun wichtig, vor Verarbeitung der nächsten Probe den Handschuh im Daumenbereich zu reinigen und zu desinfizieren, um eine Verschleppung von Erregern und damit verfälschte Ergebnisse zu vermeiden.

Bei der darauffolgenden 3–5 minütigen Zentrifugation mit 1500 U/min entstanden vier Schichten: Während in der obersten Schicht der Äther mit den gelösten Lipiden vorzufinden ist, befindet sich zuunterst das Sediment mit den Parasitenstadien. Dazwischen liegen Detrituspfpopf und MIF-Lösung. Die oberen drei Schichten wurden nun dekantiert und mit einer Pasteurpipette 1-2 Tropfen des Sediments auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Auflegen eines Deckgläschens wurde das Präparat unter dem Lichtmikroskop zunächst bei schwacher (100x), dann bei stärkerer Vergrößerung (400x) untersucht [16].

3.2.3 Kato-Katz-Verfahren

3.2.3.1 Grundprinzip der Kato-Katz-Methode

Mit der Kato-Katz-Methode können semiquantitative Aussagen zur Konzentration der jeweils nachgewiesenen Wurminfektion getroffen werden. Dieses Verfahren ist als Kit für Felduntersuchungen verfügbar und wird von der WHO zum Nachweis von *Schistosoma* spp. empfohlen [106, 107]. Auch andere Wurmeier können mit diesem Verfahren nachgewiesen werden. Für die Detektierung von Strongyloides-Larven gilt die Methode allerdings als weitgehend ungeeignet [16, 74].



Abb. 9:¹ Emini-Team beim Verarbeiten der Stuhlproben mit der Kato-Katz-Technik

Bei der Kato-Katz-Methode wurde frischer Stuhl durch ein feines Netz mit etwa 0,2 mm Maschenbreite gepresst, um grobe Stuhlbestandteile zurückzuhalten. Anschließend wurde ein Teil (zwischen 10 und 50 mg) des nunmehr gefilterten Stuhls in das vorgegebene Loch eines Objektträgers verbracht, mit einem glyzerolgetränkten Cellophan-Stück abgedeckt und unter dem Lichtmikroskop untersucht. Das Glycerol dient dabei der besseren Darstellung der Wurmeier, welche sich so von umliegenden Stuhlbestandteilen klarer abheben. Die Cellophanstückchen sollten 2,5 x 2,5 cm bemessen und einen Tag vor der Untersuchung in die Glycerin-Malachit-Lösung eingeweicht worden sein.

Die Kato-Katz-Methode wurde im Rahmen der Emini-Studie des MMRP von den tansanischen Mitarbeitern übernommen.

3.2.4 DNA-Extraktion aus Stuhlproben

3.2.4.1 Grundprinzip der DNA-Extraktion

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, WI, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
1,5 ml und 2 ml Mikrozentrifugengefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
QIAamp-Säulen (im Qiagen-Kit enthalten)	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
Sammeltubes (im Qiagen-Kit enthalten)	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
Probenmaterial	
Stuhlprobe (bis walnussgroß)	
ca. 200 mg Stuhlprobe (lysiert) zum Einsatz in das Qiagen-Protokoll	
Reagenzien	
Dithiothreitol (DTT), 1M	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>
96-100%iges Ethanol	<i>AppliChem GmbH, D-Darmstadt</i>
Kaliumhydroxid (KOH), 1M	<i>Apotheke Innenstadt, D-München</i>
Salzsäure rauchend, 37%	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Tris-HCl, 2M	
Im Qiagen-Kit (QIAamp Stool Mini Kit) enthalten:	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
• InhibitEX-Tabletten	• AW2-Puffer (Waschpuffer 2)
• ASL-Puffer (Stuhl-Lyse-Puffer)	• AE-Puffer (Elutionspuffer)
• AL-Puffer (Lyse-Puffer)	• Qiagen Proteinase K
• AW1-Puffer (Waschpuffer 1)	
Geräte	
pH-Meter	<i>Sartorius AG, D-Göttingen</i>
Sicherheitswerkbank	<i>Claus Damm, DK-Fredensborg</i>
Thermomixer	<i>Heinrich Haep HLC Haep Labor Consult, D-Bovenden</i>
Vortex Genius 3	<i>IKA Werke GmbH, D-Stauffen</i>
Wasserbad	<i>Julabo Labortechnik GmbH, D-Seelbach</i>
Zentrifuge	<i>Hettich, D-Tuttligen</i>

Tab. 5: Benötigte Labormaterialien für die DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Für die Weiterverarbeitung in der PCR findet zunächst eine Isolierung der DNA aus den Stuhlproben statt. Hierzu werden die in der Probe vorhandenen Zellen alkalisch lysiert und die DNA mit organischen Lösungsmitteln sowie durch mehrfaches Zentrifugieren von anderen Bestandteilen getrennt.

Wird die isolierte DNA bei -20 °C gelagert, so kann sie etwa 6 Monate ohne Qualitätsminderung für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.4.2 Durchführung der DNA-Extraktion im Labor

Um größere Stuhlproben verarbeiten zu können, wurden die Proben vor Befolgung des Standard-Protokolls des Qiagen-Kits *QIAamp DNA Stool Mini Kit* zunächst durch Zugabe von KOH, DTT, HCl und Tris-HCl lysiert. Vorteilhaft an diesem Vorgehen war dabei, dass auch mehrere Gramm schwere Stuhlproben lysiert werden konnten, während die ausschließliche Qiagen-Methode nur Stuhlmengen von etwa 0,2 g vorsieht. Die Wahrscheinlichkeit – so unsere Theorie – eine *Strongyloides*-

Larve mitzulysieren, steigt mit der Menge des verarbeiteten Stuhls. Diese betrug zwischen 800 µg und 20,18 g mit einem Durchschnittswert von 4,42 g je Probe.

Zu einer Probe von 1 g wurden 333 µl 1M KOH und 9,3 µl 1M DTT zugegeben, die anschließend kräftig zu schütteln waren. Dann wurde die Probe bei 65 °C für 15 min unter Schütteln inkubiert. Nun wurde erneut geschüttelt, bevor 4,2 µl 25% HCl und 80 µl 2 M Tris-HCl (pH 8,3) hinzugegeben und wieder geschüttelt wurde. Bei der Verwendung des pH-Meters zur Messung des pH-Wertes der Tris-HCl war darauf zu achten, dass dieses vor Verwendung geeicht und danach gründlich gereinigt wurde.

Von der vorlysierten Stuhlprobe wurden je etwa 200 µg mit dem Standard-Protokoll des Qiagen-Kits weiterverarbeitet, um die in der Probe befindliche DNA zu isolieren. Das Kit verwendet dabei eine spezielle Silika-Gel-Membran, die die Eigenschaft besitzt, während der Waschschriffe die DNA zu binden und erst nach Hinzugabe des AE-Puffers im letzten Schritt wieder in Lösung freizugeben. Die DNA kann so von den übrigen Bestandteilen der Stuhlprobe isoliert werden.

Vor Verwendung der Puffer des Kits war zu beachten, dass der AW1- und der AW2-Puffer jeweils mit 25 ml bzw. 30 ml 96–100% Ethanol versetzt wurden. Zudem können ASL- und AL-Puffer bei längerem Nichtgebrauch auskristallisieren und müssen in diesem Fall für 15 min bei 70 °C im Wasserbad erhitzt werden. Alle Puffer waren vor Gebrauch gut zu schütteln.

Der Thermocycler wurde auf 95 °C eingestellt und die Proben sowie ein leeres Tube als Extraktionskontrolle mit je 1,4 ml ASL-Puffer versehen und kräftig gevortext, bis die Stuhlprobe homogen in der Lösung verteilt war. Bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit wurden die Proben im Thermocycler für 5 min inkubiert, anschließend erneut gevortext und dann bei maximaler Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert. Insgesamt 1,2 ml des Überstandes wurden in ein neues 2 ml-Tube überführt. Wichtig war das Beschriften der Tubes mit einem wasserfesten Marker. Je Tube wurde nun eine InhibitEX-Tablette hinzugegeben und die Tubes sofort geschüttelt, bis die Tablette vollständig suspendiert war. Es folgte eine Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur, gefolgt von einer 3-minütigen Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit. Der gesamte Überstand wurde in ein 1,5 ml Tube überführt und erneut 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden mit 200 µl AL-Puffer und 15 µl Proteinase K in ein neues 1,5 ml Tube pipettiert, gevortext und 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 200 µl 96–100% Ethanol hinzugegeben, geschüttelt und anzentrifugiert.

Für jede Probe wurde nun je eine Säule und ein Sammeltube entnommen, die Säule beschriftet und auf das Sammeltube gesteckt, um schließlich die komplette Probe auf die Säule zu pipettieren. Es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min. Das Sammeltube mit dem Zentrifugat wurde verworfen, die Säule auf ein neues Sammeltube gesteckt und je 500 µl AW1-Puffer auf die Säule pipettiert. Es wurde erneut 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, das

Zentrifugat verworfen und die Säule auf ein neues Sammelrohr gesteckt. Je 500 µl AW2-Puffer wurden auf jede Säule pipettiert und 3 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sammelrohr mit dem Überstand wurde erneut verworfen. Es war darauf zu achten, dass sich keine Restflüssigkeit in der Säule befand, gegebenenfalls wurde eine erneute Zentrifugation angeschlossen. Nun wurden je 200 µl AE-Puffer auf den Filter der Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt war darauf zu achten, dass die Säule verworfen wurde, und nicht das Rohr, in dem sich nun die gereinigte und gelöste DNA befand.

Die DNA-Proben aus Mbeya wurden bei -18 °C zwischengelagert und auf Trockeneis nach München transportiert. Die Patientenproben aus dem Münchener Tropeninstitut wurden bei zeitnaher cPCR und rtPCR im Rahmen der Akkreditierung zunächst im Kühlschrank und erst dann im Gefrierfach aufbewahrt.

3.2.5 DNA-Extraktion aus Baermann-Überständen / *S. ratti*

Aus L3-Larven der Art *S. ratti*¹ wurde zur Herstellung einer Positivkontrolle sowie zur Verifizierung einer Erfassung dieser Art durch die PCR DNA gewonnen. Dazu wurde das *Gentra Puregene Tissue Kit* von Qiagen verwendet. Dasselbe Verfahren wurde für die Baermann-Überstände der tansanischen Proben angewandt, um die Anwesenheit von *S. stercoralis* zu prüfen (vgl. 4.2.6.2).

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Eis	
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, WI, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
1,5 ml Mikrozentrifugegefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
Probenmaterial	
Ausgangsmaterial ca. 10 mg (<i>Strongyloides ratti</i> -Larven; Baermann-Überstand)	
Reagenzien	
Absorbierendes Reinigungspapier	<i>Sued-med GmbH, D-Bruckmühl</i>
Isopropanol	<i>Hedinger, D-Stuttgart</i>
<u>Im Qiagen-Kit (Gentra Puregene Tissue Kit) enthalten:</u>	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
DNA Hydration Solution	
Cell Lysis Solution (CLS)	
Protein Precipitation Solution	
Puregene Proteinase K	
Geräte	
Thermomixer	<i>Heinrich Haep HLC Haep Labor Consult, D-Bovenden</i>
Vortex Genius 3	<i>IKA Werke GmbH, D-Stauffen</i>
Zentrifuge	<i>Hettich, D-Tuttligen</i>

Tab. 6: Benötigte Labormaterialien für die DNA-Extraktion aus Gewebe

¹ dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Herrn Miyazaki, Japan

Eine kleine Menge Ausgangsmaterial (ca. 10 mg) wurde je in ein 1,5 ml Tube gegeben und mit 300 µl Cell Lysis Solution (CLS) versetzt, dann bei 65 °C für 1 h inkubiert. Es wurden 1,5 µl Proteinase K hinzupipettiert und anschließend bei 55 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl Protein Precipitation Solution (PPS) hinzugegeben, geschüttelt und 5 min auf Eis gestellt. Dann wurde für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt, 300 µl Isopropanol zupipettiert, geschüttelt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Tube auf einem sauberen Reinigungspapier vorsichtig ausgeklopft, ohne dass dabei das Pellet am Boden des Tubes verloren ging. Nun wurden 300 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben, geschüttelt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Tube ausgeklopft und für ca. 15 min bei Raumtemperatur bei offenem Tubendeckel trocknen gelassen. Schließlich wurden 50 µl DNA Hydration Solution hinzugegeben und unter Schütteln für 1 h bei 65 °C und dann bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert, um die DNA zu lösen. Die Probe konnte nunmehr in die PCR eingesetzt werden.

3.2.6 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

3.2.6.1 Grundprinzip der photometrischen Messung

Bei der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration macht man sich die Eigenschaft von RNA, einsträngiger DNA (ssDNA) oder Doppelstrang-DNA (dsDNA) zunutze, Licht einer bestimmten Wellenlänge verstärkt zu absorbieren. Wird eine DNA-Probe in einem speziellen Gerät mit Licht beschickt, so kann hinter der Küvette der absorbierte Teil bestimmt und Rückschlüsse auf die DNA-Konzentration gezogen werden. RNA absorbiert bevorzugt Licht der Wellenlänge 280 nm, DNA das der Wellenlänge 260 nm [108].

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
<i>Aqua dest.</i>	<i>Kerndl GmbH, D-Weissenfeld</i>
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, WI,USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
Tubeständer	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Probenmaterial	
DNA-Template	
Geräte	
GeneQuant Spectrophotometer	<i>GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB</i>
Glasküvette	<i>GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB</i>

Tab. 7: Für die photometrische Messung benötigte Materialien

3.2.6.2 Durchführung der photometrischen Messung im Labor

Vor der ersten Messung war sicherzustellen, dass Zellflächen und Küvette sauber waren. Das Gerät wurde in Betrieb genommen und die Küvette für einen Nullabgleich mit 200 µl *Aqua dest.* befüllt und zur Messung in die Zelle des Spektrometers eingebracht.

Nun wurden nacheinander je DNA-Probe 200 µl des Templates in die Glasküvette pipettiert und bei 260 nm zur Absorptionsmessung in das Messgerät eingebracht. Die Absorption wurde automatisch auch für die Wellenlängen 230 nm und 280 nm registriert. Vor dem Einbringen der folgenden Probe in die Küvette wurde die alte Probe verworfen und die Küvette gründlich mit *Aqua dest.* gereinigt, um verfälschte Messergebnisse zu vermeiden. Nach dem letzten Gebrauch wurden Zelle und Küvette mit einer Alkalilösung (z.B. 0,1 M NaOH) und einer Säurelösung (z.B. 0,1 M HCl) gereinigt.

Die Absorptionswerte bei 260 nm Wellenlänge (A_{260}) wurden notiert und mit der Formel $A_{260} \times \text{FAKTOR} = \mu\text{G/ML KONZENTRATION}$ die Konzentration an DNA in der Probe berechnet. Als Ausgangsfaktor wurde für dsDNA der Faktor 50 verwendet.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.7.1 Grundprinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) dient der in-vitro-Vervielfältigung eines beliebigen, von zwei Primern flankierten DNA- oder RNA-Abschnittes, der bis etwa 3000 bp lang sein kann [109]. Das Verfahren geht auf den US-amerikanischen Biochemiker Kary Mullis zurück, der ab 1983 die PCR entwickelte und 1993 für seine Arbeit mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Die Methode ahmt dabei im Prinzip die natürlicherweise in der Zelle stattfindende DNA-Replikation nach, indem zunächst bei einer Temperatur von ca. 92 °C der Doppelstrang denaturiert wird. Es folgt im nächsten Schritt eine Absenkung der Temperatur auf etwa 50–60 °C, in der sich die Primer anlagern. Dies wird als Annealing bezeichnet. Anschließend folgt die sogenannten Elongation, bei der sich bis dahin freie, komplementäre synthetische Nukleotide (dNTP's) an die beiden Einzelstränge anlagern, sodass in der Folge zwei Doppelstränge entstehen. Aufgrund der geringeren Größe und somit schnelleren Beweglichkeit lagern sich die Nukleotide dabei wesentlich schneller an die Einzelstränge an als die native, während der Denaturierung abgespaltene komplementäre DNA.

Der gesamte Vorgang wird, je nach PCR, etwa 30–40 Mal wiederholt, sodass nach 30 Zyklen bei exponentieller Vervielfältigung der gewünschte Abschnitt in etwa einmilliardenfacher Ausführung vorliegt [109, 110].

Da nach der DNA-Extraktion aus der Stuhlprobe im Template das Erbgut verschiedenster Organismen zu finden ist, hat die PCR zum Ziel, nur den gewünschten

DNA-Abschnitt zu vervielfältigen und genügend Material zu gewinnen, um im Anschluss weitere Untersuchungsschritte wie Nachweis der vervielfältigten DNA mittels Gelelektrophorese oder Klonierung einleiten zu können. Dies gelingt durch Ziel-DNA-spezifische oligonukleotide Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit einer Länge von 18–30 bp, die die Eigenschaft haben, sich an das Zielgenom anzulagern und einen Startpunkt für die Taq-Polymerase zu setzen.

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, WI, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
0,5 ml und 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Natriumhypochlorit	<i>Nalge Nunc Int., Rochester NY, USA</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
Tubeständer versch. Größen	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Probenmaterial	
DNA-Template	
Reagenzien	
<i>Aqua dest.</i>	<i>Kerndl GmbH, D-Weissenfeld</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)-Lösung	<i>Applied Biosystems (Roche), Branchburg, New Jersey, USA</i>
Oligonukleotide (Primer)	<i>Thermo Fisher Scientific, D-Ulm</i>
PCR Gold Puffer®	<i>Applied Biosystems (Roche)</i>
PCR Puffer HotStar® Taq	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
Taq-Polymerase (Ampli Taq Gold®)	<i>Applied Biosystems</i>
HotStar® Taq	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
Geräte	
UNO II Thermocycler	<i>Biometra, D-Göttingen</i>
Tischzentrifuge MCF-2360	<i>LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan</i>
UV-Werkbank	<i>Steag-Laminarflow-Prozesstechnik, D-Pliezhausen</i>
Vortex Genius 3	<i>IKA Werke GmbH, D-Stauffen</i>

Tab. 8: Für die konventionelle PCR benötigte Labormaterialien

3.2.7.2 Primerdesign

Es wurden vier Primerpaare konstruiert (vgl. 4.1.1). Primerpaar 1, bestehend aus dem Forward-Primer Stro-1F und dem Reverse-Primer Stro 1R, wurde als Standard eingesetzt.

3.2.7.3 Durchführung der konventionellen PCR (cPCR) im Labor

Der Mastermix wurde im DNA-freien Raum in einem 1,5 ml Tube hergestellt. Der Arbeitskittel wurde vor Betreten des Raumes abgelegt, die Verarbeitung erfolgte unter Tragen von Handschuhen an der UV-Werkbank. Primer, dNTP's und Taq-Polymerase wurden im Gefrierfach gelagert, während MgCl₂-Lösung und PCR-Puffer im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten. Es empfahl sich, die einzelnen Bestandteile nach dem Auftauen und vor Gebrauch kurz zu schütteln und anzuzentrifugieren. Die temperatursensible Taq-Polymerase war erst am Ende dem Gefrierfach zu entnehmen und dem Mastermix hinzuzugeben. Weder die Taq-

Polymerase selbst noch der fertige Mastermix sollten geschüttelt, sondern nur mit Hilfe der Pipette vorsichtig durchmischt werden.

Nach der Erprobung verschiedener Reaktionsansätze erwies sich folgender Ansatz als ideal (vgl. 4.1.2):

Reagenz	Einzelreaktion (µl)	Konz. Gebrauchslösung	Endkonzentration
AmpliTaqGold	0,10	5 U/l	0,025 U/l
H ₂ O	10,30		
MgCl ₂	2,00	25 mM	2,5 mM
dNTP's	1,60	10 mM	0,8 mM
PCR Puffer II	2,00	10x	1x
Primer Stro 1F	1,00	10 µM	0,5 µM
Primer Stro 1R	1,00	10 µM	0,5 µM
Gesamtvol. Mastermix	18,00		
Template (DNA-Extrakt)	2,00		
Gesamt	20,00		

Tab. 9: Mastermix für die cPCR

Insgesamt 18 µl je Probe wurden nun in ein 0,5 ml Tube überführt, verschlossen und beschriftet. Die Arbeitsfläche wurde mit Natriumhypochlorit gereinigt und das UV-Licht zur Denaturierung eventuell vorhandener DNA für etwa 15 min eingeschaltet. Die 0,5 ml Tubes wurden anschließend im Extraktionsraum mit jeweils 2 µl Template versehen. Bei jedem PCR-Lauf war eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle (*Aqua dest.*) sowie Extraktions- und Inhibitionskontrollen (1 µl Positivkontrolle und 1 µl Template) einzuplanen. Die Tubes wurden erneut verschlossen und in den PCR-Raum transportiert, wo der Ansatz zur PCR-Amplifikation in den UNO II® Thermocycler eingesetzt wurde. Ein entsprechendes Programm mit den für optimal befundenen Zeiten für Denaturierung, Annealing und Elongation war im Vorfeld im Thermocycler erstellt worden. Die Tubes wurden im Thermocycler platziert, der Deckel geschlossen und vorsichtig verschraubt und das Programm gestartet.

3.2.8 Gelelektrophorese

3.2.8.1 Grundprinzip der Gelelektrophorese

Das cPCR-Amplifikat wird auf ein Agarosegel aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die in der Probe vorhandene DNA bzw. RNA wandert aufgrund ihrer polyanionischen Ladung Richtung Anode. Kleinere DNA-Fragmente vollziehen die Wanderung durch das wie ein molekulares Sieb wirkende Gel schneller als größere Abschnitte. Die DNA spaltet sich also im elektrischen Feld der Länge nach auf [111].

Befindet sich die Ziel-DNA in der Probe, so wurde diese während der cPCR millionenfach vervielfältigt und liegt nun als Bande im Gel vor. Diese Bande wird unter UV-Licht durch zuvor hinzugegebenes, mit der DNA interkalierendes Ethidiumbromid sichtbar gemacht und entspricht in ihrer Basenpaar-Länge dem zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnitt. Die Länge des Fragments kann anhand eines

mitlaufenden Referenz-Markern mit bekannten DNA-Molekülgrößen abgeschätzt werden. Zudem ist die Dicke der Bande ein Maß für die Anzahl gleichgroßer Moleküle.

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Abwiegeschälchen	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Erlenmeyer-Kolben	<i>Nalge Nunc International, Rochester NY, USA</i>
Klebeband Durapore®	<i>3M, St. Paul, Minnesota, USA</i>
Nitril-Handschuhe Sempercure®	<i>Semperit Technische Produkte GmbH, Au-Wien</i>
Messzylinder	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
Pipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, WI, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Probenmaterial	
Amplifizierte DNA	
Reagenzien	
Bromphenolblau (Ladepuffer)	<i>Sigma, D-Deisenhofen</i>
100 bp DNA-Leiter	<i>Invitrogen Ltd. Paisley, UK</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma, D-Deisenhofen</i>
GelRed™ Nucleic Acid Stain	<i>Biotium, Inc. Hayward, CA, USA</i>
10 x TAE-Puffer Ultra pure, bzw. TBE-Puffer	<i>Invitrogen Ltd. Paisley, Scotland, UK</i>
SeaKem® LE Agarose	<i>Cambrex, Rockland, ME, USA</i>
Geräte	
Elektrophorese-Gerät 40–0708 (klein), 40–1214 (groß)	<i>PeqLab Biotechnologie GmbH, Portsmouth NH, USA</i>
Grabit®-Software	<i>UVP Products Ltd., Cambridge, UK</i>
Kamm, Gelschlitten	<i>PeqLab Biotechnologie GmbH, Portsmouth NH, USA</i>
Mikrowelle Privileg 8017E	<i>Quelle, D-Fürth</i>
Netzwerkgerät Power-Pac 300	<i>Bio Rad Laboratories, CA, USA</i>
PC und Drucker	
UV-Transilluminator GDS 7500	<i>UVP, Upland CA, USA</i>
Waage: Kern 440–33	<i>Kern&Sohn, D-Balingen</i>

Tab. 10: Für die Gelelektrophorese benötigte Labormaterialien

3.2.8.2 Durchführung der Gelelektrophorese im Labor

Zunächst wurde das 2%ige Agarosegel hergestellt, indem 2 g SeaKem®LE-Agarosepulver abgewogen und in einem Plastikkolben mit 100 ml TBE-Puffer (anfangs auch TAE-Puffer) in der Mikrowelle erhitzt wurden, bis das Pulver vollständig gelöst war (für kleine Gele: 1 g Pulver und 50 ml TBE). Die Lösung kühlte im Anschluss auf etwa 60 °C ab, bevor 3 µl (bzw. 1,5 µl) Ethidiumbromid hinzugegeben wurden. Dieses verteilte sich durch Schwenken des Kolbens gleichmäßig in der Flüssigkeit. Aufgrund der Toxizität von Ethidiumbromid (im Verlauf durch 10 µl bzw. 5 µl GelRed™ ersetzt) war – auch bei der weiteren Verarbeitung des Gels – auf das Tragen von Nitril-Handschuhen zu achten.

Die Agaroselösung wurde in einen mit einem für die späteren „Taschen“ im Gel benötigten Kamm versehenen und an den Rändern mit Klebeband abgedichteten Gelschlitten gegossen. Größere Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt bzw. zum Platzen gebracht. Nach Abkühlung und damit einhergehender Verfestigung des Gels wurden Kamm und Klebebänder entfernt und der Schlitten in die TAE/ TBE-gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht, sodass die Taschen in Rich-

tung Kathode zeigten. In die Taschen wurden neben einem Marker 12 µl PCR-Amplifikat hineinpipettiert, das zuvor jeweils noch mit 2–3 µl Bromphenolblau-Ladepuffer gemischt worden war. Der Ladepuffer sorgt dafür, dass durch die nunmehr erhöhte Dichte das Amplifikat in den Taschen bleibt und dass während der Elektrophorese die von der DNA zurückgelegte Strecke abgeschätzt und das elektrische Feld rechtzeitig ausgeschaltet werden kann, bevor es zu einem „Überlaufen“ des PCR-Produktes kommt.

Außerdem wurden 8 µl des DNA-Leiters in eine der Taschen pipettiert. Der verdünnte Leiter wurde aus *Aqua dest.*, Blaupuffer und Leiter im Verhältnis 8:1:1 hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

Nun wurde das elektrische Feld unter Berücksichtigung der richtigen Polung eingeschaltet (100–120 Volt für große Gele, 60–80 Volt für kleine Gele) und kontrolliert, ob in der Kammer an beiden Seiten kleine Blasen aufstiegen.

Das elektrische Feld wurde nach ausreichender Aufspaltung des PCR-Produktes im Gel, ersichtlich an der durch das Bromphenolblau zurückgelegten Strecke, abgeschaltet und der Gelschlitten entnommen.

Das Gel wurde unter dem UV-Transilluminator betrachtet und mit einer Kamera über das Grabit[®]-Programm abfotografiert und auf dem PC gespeichert.

3.2.9 Real-time-PCR (rtPCR):

3.2.9.1 Grundprinzip der Real-time-PCR

Die rtPCR basiert in ihrer Funktionsweise auf der cPCR mit den drei zyklisch ablaufenden Reaktionsschritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Annealing und Elongation. Sie stellt eine moderne Methode zur in-vitro Vervielfältigung von DNA dar, bei der im Gegensatz zur cPCR bereits während der Replikation durch Zugabe eines Farbstoffes (SYBR[®] Green) zum Reaktionsansatz die Amplifikation der Zielsequenz grafisch am Computerbildschirm dargestellt werden kann. Somit schließt sich kein zweiter Schritt an, wie dies bei der cPCR mittels Gelelektrophorese geschieht, sondern der Nachweis des PCR-Produktes findet durch Interkalierung des Farbstoffes SYBR[®] Green in doppelsträngige DNA direkt im Reaktionsgefäß statt [112].

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
LightCycler [®] Capillaries (20 µl)	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
LightCycler [®] Capping Tool	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
LightCycler [®] Centrifuge Adapters mit Aluminium Cooling-Block	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Natriumhypochlorit	<i>Nalge Nunc Int., Rochester NY, USA</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>

Tubeständer	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Probenmaterial	
DNA-Templates	
Reagenzien	
<i>Im Kit LightCycler FastStart DNA Master Hyb Probe enthalten:</i>	
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
MgCl ₂ Stock-solution 25 mM	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR® Green I	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
<i>Aqua dest.</i>	<i>Kerndl GmbH, D-Weissenfeld</i>
Oligonukleotide (Primer)	<i>Thermo Fisher Scientific, D-Ulm</i>
Geräte	
LightCycler 2.0®	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
LightCycler®-Software 4.05	<i>Roche Diagnostics, Indianapolis, USA</i>
PC und Farbdrucker	
Tischzentrifuge MCF-2360	<i>LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan</i>
UV-Werkbank	<i>Steag Laminarflow-Prozesstechnik GmbH, D-Pliezhausen</i>
Zentrifuge EBA 12	<i>Hettich, D-Tuttligen</i>

Tab. 11: Für die rtPCR benötigte Labormaterialien

3.2.9.2 Durchführung der Real-time-PCR im Labor

Der Mastermix für die rtPCR wurde, vergleichbar der cPCR, im DNA-freien Raum angesetzt (vgl. 3.2.7.3 und Tab. 13). Bei dem FastStart DNA Master SYBR®-Green war darauf zu achten, dass vor erstmaliger Verwendung des Kits aus Tube „1a“ (LC FastStart Enzyme) 10 µl in das Tube „1b“ überführt wurden, welches, mit dem Aufkleber „1“ versehen, nunmehr als der im Reaktionsansatz erwähnte FastStart DNA Master SYBR®-Green-Mix Verwendung fand.

Reagenz	Einzelreaktion (µl)	Konz. Gebrauchslösung	Endkonzentration
Fast Start DNA Master SYBR® Green	1,00	5 U/l	
H ₂ O	6,40		
MgCl ₂ Stock-solution	0,60	25mM	2,5mM
Primer Stro 1-F	0,50	10µM	0,5µM
Primer Stro 1-R	0,50	10µM	0,5µM
Gesamtvol. Mastermix (µl)	9,00		
Template (DNA-Extrakt) (µl)	1,00		
Gesamt	10,00		

Tab. 12: Mastermix für die Real-time-PCR

Je Probe wurden 9 µl des Mastermixes in die LightCycler®-Kapillaren pipettiert. Diese waren zum Kühlen in einem zuvor im Kühlschrank aufbewahrten Aluminiumblock mit speziellen Zentrifugenadaptern platziert worden. Die befüllten Kapillaren wurden samt Block in den Extraktionsraum transportiert. Dort wurde je 1 µl Template hinzugegeben (inklusive Positiv-, Negativ-, Extraktions- und Inhibitionskontrollen), und die Kapillaren mit den mitgelieferten Plastikkappen verschlossen. Anschließend wurden die Kapillaren im PCR-Raum kurz anzentrifugiert (*cave*: keine zu starken Beschleunigungskräfte einstellen, da die Kapillaren sonst möglicherweise zerbersten!), und im Karussell des LightCyclers® platziert. Durch leichten Druck auf die Plastikkappen wurden die Kapillaren im Karussell fixiert und der Deckel des LightCyclers® geschlossen. Am angeschlossenen PC wurde nun das zugehörige Programm

(LightCycler® Software 4.05) geöffnet, die Probenanzahl mit Bezeichnung eingegeben und der Lauf mit 40 Zyklen gestartet. Es empfahl sich, kurz zu warten, um zu verifizieren, ob alle Proben vom Gerät registriert wurden und der Lauf ordnungsgemäß startete. Neben den Amplifizierungskurven wurden automatisch auch die spezifischen Schmelzpunkte registriert. Die Schmelzkurve ergibt sich dabei aus dem Anteil an Guanin-Cytosin-Basenpaaren in der amplifizierten Sequenz. Im Falle der in der vorliegenden Studie durchgeführten rtPCR lag der Schmelzpunkt bei etwa 82,5 °C.

3.2.10 Genom-Sequenzierung

3.2.10.1 Grundprinzip der DNA-Sequenzierung

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Filterpipettenspitzen versch. Größe	<i>Gilson, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Natriumhypochlorit	<i>Nalge Nunc Int., Rochester NY, USA</i>
Pipetten versch. Größe	<i>Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, D-Hamburg</i>
DyeEx Spin Columns 2.0	<i>Qiagen GmbH, D-Hilden</i>
Sterile Skalpelle	<i>Aesculap AG, D-Tuttlingen</i>
Probenmaterial	
Amplifizierte DNA-Templates aus cPCR	
Reagenzien	
<i>Aqua dest.</i>	<i>Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe</i>
Ethanol 96%	<i>AppliChem GmbH, D-Darmstadt</i>
Hi-Di Formamid	<i>Applied Biosystems (Roche), Branchburg, New Jersey, USA</i>
Lichrosolv. Wasser	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Ultrafree-DA Gelextraktionskit Millipore mit Tubes	<i>Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe</i>
Ethanol 70%	<i>AppliChem GmbH, D-Darmstadt</i>
Oligonukleotide (Primer)	<i>Thermo Fisher Scientific, D-Ulm</i>
Geräte	
ABI 3730 DNA Analyser mit ABI optical plates	<i>Applied Biosystems (Roche), Branchburg, New Jersey, USA</i>
Software Dnasis Max 3.0	<i>MiraiBio of Hitachi Solutions Ltd., San Francisco, USA</i>
Tischzentrifuge MCF-2360	<i>LMS Co., Ltd., Tokyo, Japan</i>
UNO II Thermocycler	<i>Biometra, D-Göttingen</i>
UV-Transilluminator	<i>Bachofer, D-Reutlingen</i>
Zentrifuge EBA 12	<i>Hettich, D-Tuttlingen</i>

Tab. 13: Für die Genom-Sequenzierung benötigte Materialien

Bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger (Nobelpreis für Chemie 1980) werden in einer cPCR künstlich hergestellte, fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTP's: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) in den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt eingebaut. Dies führt aufgrund des H-Atoms statt einer OH-Gruppe am 3'-Ende der ddNTP's zum Kettenabbruch an allen Stellen des amplifizierten Abschnitts, an denen statt dATP ein ddATP, statt dTTP ein ddTTP usw. eingebaut wurde. Letztlich erhält man aufgrund der Vielzahl an Replikationszyklen Strangab-

brüche an allen DNA-Abschnitten und kann über Fluoreszenzmessung im automatischen Sequenzierer die genaue Basenabfolge der Sequenz bestimmen.

3.2.10.2 Durchführung der Genom-Sequenzierung im Labor

Zunächst wurde nach dem in 3.2.7 beschriebenen Verfahren eine cPCR (20 µl Gesamtvolumen je Probe), sowie anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt (vgl. 3.2.8). Die Auswertung erfolgte dabei auf einem 1,25% TAE-light-Gel. Dieser Puffer enthält einen geringeren EDTA-Gehalt (0,1 mM), da EDTA durch Komplexbildung von Mg-Ionen das Cycle-Sequencing stört. Auf dem Gel wurde zwischen zwei Proben je eine Tasche freigelassen, um beim Ausschneiden der Banden Verunreinigungen zu minimieren. Die Banden wurden auf dem offenen UV-Transilluminator lokalisiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Jedes ausgeschnittene Gel-Fragment mit dem Amplifikat wurde in ein Ultrafree®-DA-Tube mit Filter überführt und für 10 min bei 5000 g zentrifugiert, um überschüssige Salze, Primer und dNTP's zu entfernen.

Vom Eluat wurden 2 µl mit 1,5 µl PCR-Puffer, 1 µl Primer (im Doppelansatz, entweder mit Forward- oder Reverse-Primer) und 0,5 µl Big Dye 3.1 zu einem Reaktionsansatz von 5 µl Endvolumen gemischt und in den Thermocycler eingesetzt (Programm: „Bu-Seq“: Denaturierung 30 s bei 96 °C, Annealing 15 s bei 50 °C, Elongation 4 min bei 60 °C; 25 Zyklen).

Die Sequenzier-Produkte wurden zur Entfernung von ddNTP's, dNTP's und Salzen mit dem Qiagen-Kit „Dye Ex“ wie folgt aufgereinigt:

- Auffüllen der Sequenzier-Reaktion mit 15 µl ad. auf 20 µl
- Dye Ex Tubes werden 1/4 Drehung aufgedreht, gevortext und unten geöffnet
- Dye Ex Filter auf Dye Ex Tubes setzen
- Dye Ex Tubes bei 2700 rpm für 3 min zentrifugieren
- Dye Ex Tubes verwerfen
- Dye Ex Filter auf neues Eppendorf-Tube setzen
- Sequenzier-Reaktion (20µl) schräg auf das Dye Ex Gel (im Filter) pipettieren
- 3 min bei 2700 rpm zentrifugieren
- Filter verwerfen

Im Eluat befand sich nun das aufgereinigte Produkt, welches gefällt werden musste. Hierzu wurden 60 µl 97% EtOH zum Eluat hinzugegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. In zwei weiteren Schritten wurden jeweils 40 µl 70% EtOH hinzugegeben, für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Dann wurden die Tubes bei Raumtemperatur zum Trocknen gelegt.

Die DNA wurde mit 12 µl LiChrosolv. Wasser und 13 µl HiDi-Formamide zu einem Endvolumen von 25 µl eluiert. Das gesamte Endvolumen wurde in die ABI optical plates einpipettiert. Die Auswertung der Platten erfolgte im ABI 3730 DNA Analyser unter Verwendung der Software Dnasis Max 3.0.

3.2.11 AK-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**3.2.11.1 Grundprinzip des AK-ELISA**

BEZEICHNUNG	FIRMA
Labormaterial	
Abdeckfolien Parafilm*	<i>Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA</i>
Erlenmeyer-Kolben	<i>Schott AG, D-Mainz</i>
Handschuhe Peha-soft	<i>Hartmann, D-Heidenheim</i>
Messzylinder	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
1,5 ml Mikrozentrifugengefäße (mit Deckel)	<i>Kisker-Biotech, D-Steinfurt</i>
Permanent-Marker	<i>Staedtler Mars GmbH, D-Nürnberg</i>
Pipettenspitzen versch. Volumina	<i>Gilson, WI, USA; Eppendorf, D-Hamburg; Biozym, D-Hessisch Oldendorf</i>
Tubeständer	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Verdünnungswannen	<i>Neolab, D-Heidelberg</i>
Probenmaterial	
Serum (aus Mbeya, 200 µl/Studienteilnehmer)	
Reagenzien (bei fehlender Firmenangabe wird das Reagenz im Haus hergestellt)	
Antigene	
Aqua bidest	<i>Kerndl GmbH, D-Weissenfeld</i>
Bromphenolblau 0,5%	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Coating-Puffer (pH 9,6, hergestellt aus 3,1 g Na ₂ CO ₃ , 5,9 g NaHCO ₃ und 0,1 g NaN ₃)	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Inkubationspuffer PBS-BSA 5%	
Konjugat IgG	<i>Dako, Glostrup Dänemark</i>
Negative Kontrollen	
OPD-Substrattabletten (o-Phenylendiamin)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>
PBS-Puffer (pH 7,2, hergestellt aus 72 g NaCl, 14,8 g Na ₂ HPO ₄ , 4,3 g KH ₂ PO ₄ + 10 l Aqua bidest.)	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Positive Kontrollen (low/medium)	
Schwefelsäure (1N H ₂ SO ₄)	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Standardkurven-Kontrollserum	
Substratpuffer (pH 5,0, hergestellt aus 14,2 g Na ₂ HPO ₄ , 21,0 g Zitronensäure (je in 1 l Aqua bidest.) und 100 µl H ₂ O ₂ 30% pro 100 ml Puffer	<i>Merck, D-Darmstadt; Kerndl GmbH, D-Weissenfeld (Aqua bidest.)</i>
Waschpuffer PBS-Tween (Herstellung vgl. PBS-Puffer)	<i>Merck, D-Darmstadt</i>
Geräte	
Ablesegerät Tecan-Spectra Reader	<i>Tecan Group, D-Crailsheim</i>
Einkanalpipetten mit variabler Volumenwahl	<i>Eppendorf, D-Hamburg</i>
Inkubator Abbott Commander	<i>Abbott GmbH Diagnostica, D-Wiesbaden</i>
Kühlschrank, Gefrierschrank	<i>Bosch, Liebherr</i>
Mehrkanalpipetten mit variabler Volumenwahl	<i>Eppendorf, D-Hamburg</i>
Microshaker für Titrationsplatten	<i>Dynatech GmbH, D-Plochingen</i>
Multipette „Transferpette“	<i>Brand GmbH, D-Wertheim</i>
PC und Drucker	
pH-Meter	<i>Sartorius AG, D-Göttingen</i>
Vortex MS2 Minishaker	<i>IKA Werke GmbH, D-Stauffen</i>
Waschgerät für Mikrotiterplatten	<i>Tecan Group, D-Crailsheim</i>
Wasserstrahlpumpe	<i>Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald</i>

Tab. 14: Für den AK-ELISA benötigte Labormaterialien

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zum semiquantitativen Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern im

Patientenserum mittels Farbumschlag. Da die Antikörper erst im Verlauf einer Erkrankung gebildet werden, eignet sich der ELISA nicht zur Akutdiagnostik.

Die IgG-Antikörper binden dabei auf einer mit spezifischem Antigen (löslicher Vollantigen-Extrakt aus Drittlarven von *Strongyloides ratti*) beschichteten ELISA-Platte. Zum entstehenden Antigen-Antikörper-Komplex wird nach einem Waschschrift zur Entfernung überschüssigen Patientenserums ein Konjugat (Anti-Human-Immunglobulin vom Kaninchen konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) hinzugegeben. Nach Herauswaschen des freien Konjugats kann durch Zugabe von Substrat (o-Phenylendiamin) der entstandene Ag-AK-Anti-AK-Enzym-Komplex mittels Farbumschlag nach gelb durch Oxidation in 2,3-Diaminophenazin dargestellt werden. Mit Schwefelsäure als Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag nach orange. Die Farbinintensität wird photometrisch gemessen und steigt mit der Menge an gebundenem Antikörper [111].

3.2.11.2 Durchführung des AK-ELISA im Labor

Von 113 der 125 mit der Baermann-Methode untersuchten tansanischen Stuhlproben wurde mit den zugehörigen Probandenseren im Münchener Tropeninstitut ein ELISA durchgeführt. Die Serumproben waren von den Emini Field-Teams im Rahmen der Haushaltsbesuche abgenommen und bei -18 °C in Mbeya zwischengelagert worden. Derselbe ELISA wurde ebenfalls mit den Seren von Patienten des Tropeninstituts durchgeführt.

Am Tag 1 wurden die Mikrotiterplatten mit einer Antigenverdünnung (mit Coating-Puffer) beschichtet. Hierzu wurden 100 µl Antigenlösung pro Well in die ELISA-Platte pipettiert, abgesehen von den Wells für den Leer-ELISA. Die Beschichtung erfolgte nach folgendem Schema:

- **Standardkurve (Std):** Im Doppelansatz je 100 µl AG (Faktor 100/33/10/1); Std 1 entspricht einem nicht reaktiven Serum
- **Leerwerte:** 4 Wells mit je 100 µl AG
- **Pro Patient:** je 2 Wells mit je 100 µl AG plus 1 Well unbeschichtet (Eigenkontrolle: Leer-ELISA)
- **Positiv-Kontrollen (low/ medium):** je 2 Wells mit je 100 µl AG plus 1 Well unbeschichtet (Eigenkontrolle: Leer-ELISA)
- **Negativ-Kontrolle:** je 2 Wells mit je 100 µl AG plus 1 Well unbeschichtet

Die Platten wurden mit Folien abgedeckt, 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die benötigte Menge Inkubationspuffer (IKP) wurde hergestellt (vgl. Rezepturhandbuch des Tropeninstitutes) und mit Bromphenolblau 0,5% versetzt. Pro 100 ml Puffer wurden 200 µl Bromphenolblau benötigt. Anschließend wurden je 5 µl Patientenserum, 2 Positivkontrollen (medium/low) und eine Negativkontrolle mit 800 µl IKP (1:160) verdünnt. Die Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

Am Tag 2 wurden die ELISA-Platten im Waschgerät gewaschen und auf Filterpapier leicht ausgeklopft. 200 µl IKP wurden in jedes Well pipettiert, die Platte mit Folie abgedeckt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Patien-

tenproben auf Zimmertemperatur gebracht und die Standardkurve laut aktueller Verdünnungsanleitung (FB-QC 8) verdünnt. Die ELISA-Platten wurden erneut im Waschgerät gewaschen, dann je 50 µl Standard, IKP (Leerwert), bzw. Patientenprobe in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Zu jedem Well wurden zusätzlich 50 µl IKP hinzugegeben (Endverdünnung der Serumproben 1:320) und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Platte 4 Mal im Waschgerät gereinigt und auf Filterpapier leicht ausgeklopft. Es wurden 100 µl Konjugat pro Well einpipettiert, dann erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte ein neuerliche 4-malige Reinigung im Waschgerät.

Eine Tablette OPD wurde in 60 ml Substratpuffer aufgelöst, 100 µl des Substrates pro Well einpipettiert und 30 min im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden schließlich 100 µl H₂SO₄ pro Well hinzugegeben, dann wurde die ELISA-Platte mit einem 492-nm-Filter auf dem Tecan-Reader „Spectra“, der an einen PC gekoppelt war, photometrisch abgelesen. Die Auswertung erfolgte dabei nach standardisierten Vorgaben:

- AK-Einheiten (AKE) < 10 = negativ
- AKE 10–14 = grenzwertig
- AKE > 20 = positiv

Über das Programm *SLT Easy-fit* wurden die Werte mit einer Standardkurve abgeglichen.

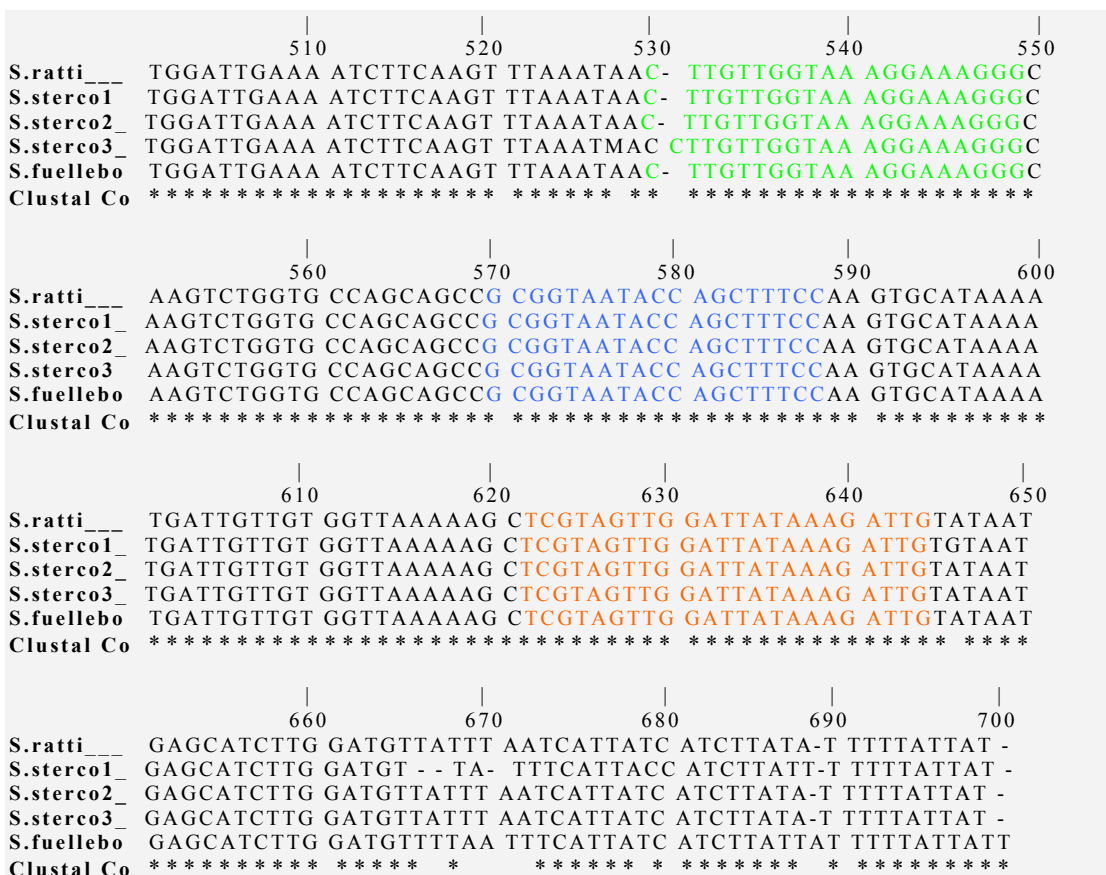
4 Ergebnisse

4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

4.1.1 Primerdesign

Für die Primersuche wurde die im Internet zugängliche *GenBank database* (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI, [113]) im Hinblick auf möglichst deckungsgleiche Genom-Abschnitte verschiedener humanpathogener *Strongyloides*-Arten untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei die beiden Gattungen *S. stercoralis* und *S. fuelleborni*, die als Erreger menschlicher Parasitosen bekannt sind, sowie *S. ratti* als potentiell humanpathogene Gattung.

Als Ziel-Gen wurde ein 18S rRNA-Gen gewählt, um sowohl Sensitivität als auch Spezifität für das Primerdesign zu maximieren. Für eine hohe Sensitivität sprach die Eigenschaft des 18S rRNA-Gens als „*Multiple-Copy*“-Gen. Eine hohe Spezifität war bei einer hohen Anzahl an verschiedenen Einträgen zum 18S-rRNA-Gen im Vergleich zu anderen potentiellen Zielgenen zu erwarten, sowohl für *S. stercoralis*, als auch für *S. fuelleborni* und *S. ratti*. Das computerbasierte Abgleichen der unterschiedlichen Genabschnitte („*Alignment*“) erfolgte mit dem Programm *DNAMAN* (*Lynnon Corp.*). Anschließend wurden die Sequenzen manuell auf geeignete Stellen für die Primerkonstruktion gescreent. Vier Primerpaare wurden konstruiert (Abb. 10).



4 Ergebnisse

		1110		1120		1130		1140		1150
S.ratti	___	AAGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG	GAGTGGAGCC				
S.sterco1	___	AAGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG	GAGTGGAGCC				
S.sterco2	___	AAGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG	GAGTGGAGCC				
S.sterco3	___	AAGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	- CACCACCAG	GAGTGGAGCC				
S.fuellebo	___	AAGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG	GAGTGGAGCC				
Clustal Co		*****	*****	*****	*****	*****				
		1160		1170		1180		1190		1200
S.ratti	___	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA				
S.sterco1	___	TGCGGCTTAA	TTTGNCTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA				
S.sterco2	___	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA				
S.sterco3	___	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA				
S.fuellebo	___	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA				
Clustal Co		*****	*****	*****	*****	*****				
		1210		1220		1230		1240		1250
S.ratti	___	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTAGTGG	TTGGTGGTGC				
S.sterco1	___	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTAGTGG	TTGGTGGTGC				
S.sterco2	___	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTAGTGG	TTGGTGGTGC				
S.sterco3	___	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTAGTGG	TTGGTGGTGC				
S.fuellebo	___	TAAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTAGTGG	TTGGTGGTGC				
Clustal Co		*****	*****	*****	*****	*****				

Abb. 10: Partielle Sequenz des 18S-rRNA-Gens mit Markierung der Primerregionen (grün: Primerpaar Stro 1F, Stro 1R; orange: Primerpaar Stro 2F, Stro 2R; blau: Primerpaar Stro 3F, Stro 3R; violett: Primerpaar Stro 4F, Stro 4R). Reihe 1 zeigt einen Teilabschnitt des Genoms von *S.ratti*, Zeile 5 das von *S. fuelleborni*. In Zeile 2–4 befindet sich der Genabschnitt von *S. stercoralis* aus unterschiedlichen Sequenzierungen. Die Sternchen in der Reihe „Clustal Co“ stehen für Deckungsgleichheit der verschiedenen Genabschnitte beim Alignment.

Bei der Primerkonstruktion wurde beachtet, dass der Guanin-Cytosin-Gehalt der 18–30 Basenpaare langen Primer zwischen 40 und 60% lag, da dies Auswirkungen auf die Annealing-Temperatur des Primers beim Anlagern an die Ziel-DNA hat.

Außerdem wurden die entsprechenden Sequenzen in einen *Blast* [114] mit dem Genom anderer Lebewesen auf Deckungsgleichheit hin untersucht, um die Spezifität der PCR zu gewährleisten. Der *Blast* ergab 100% Spezifität für *Strongyloides*.

Primerpaar / Primer (Sequenz 5' → 3')	BL(bp)	Lokalisation	T1	T2
1 Stro 1F: 5'-CTT GTT GGT AAA GGA AAG GG-3'	227	530-549	58	48,4
Stro 1R: 5'-AAC CCT CTG ATT TAT TCA AAG T-3'		735-756	58	46,3
2 Stro 2F: 5'-TCG TAG TTG GAT TAT AAA GAT TG-3'	176	626-649	60	45,8
Stro 2R: 5'-GTG TTA TTC CAT GCT AGA CC-3'		783-802	60	43,6
3 Stro 3F: 5'-GCG GTA ATA CCA GCT TTC C-3'	310	570-589	58	49,1
Stro 3R: 5'-TAA CGT AGC GAT ACG AAT GC-3'		863-882	58	48,5
4 Stro 4F: 5'-TCG GAA ACG AAA GTC TTT C-3'	185	1065-1083	54	46,9
Stro 4R: 5'-CCA CTA AAT CAT GAA AGA GC-3'		1230-1249	56	44,0

Tab. 15: Für die PCR verwendete Primerpaare mit Sequenz, erwarteter Bandenlänge (BL) in Basenpaaren (bp) und Lokalisation im Gen. T1: Annealing-Temperaturen nach $T = 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$. T2: Annealing-Temperaturen nach der „Nearest Neighbour“-Methode. Die Primer wurden bei *Thermo Fisher Scientific* (Ulm) in Auftrag gegeben.

Die Annealing-Temperaturen der Primer berechneten sich nach der Formel

$\overline{T} = 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$. *Thermo Fisher Scientific* gab für die bestellten Primer abweichende Annealing-Temperaturen an, welche sich durch Berechnung mit der „Nearest-Neighbour“-Methode erklären lassen (Tab. 15) [115].

4.1.2 Erprobung der konventionellen PCR (cPCR)

Verschiedene Variationen der cPCR wurden mit den konstruierten Primern in Hinblick auf eine optimale Zusammensetzung des Mastermixes, der Temperaturen während des Replikationsvorganges und der Zyklen-Anzahl getestet. Zur Erprobung der cPCR und als Positivkontrolle wurde zunächst der DNA-Extrakt aus L3-*Strongyloides-ratti*-Larven verwendet (vgl. 3.2.5). Später kam auch eine MIFC-positive Patientenprobe (SS 1) aus dem Münchener Tropeninstitut zur Verwendung. Als Temperaturoptimum konnte – übereinstimmend mit unseren Berechnungen (vgl. Tab. 15) – eine Annealing-Temperatur von ca. 58 °C ermittelt werden, bei einer idealen MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM und 35 Replikationszyklen im Thermocycler®. Das Temperatur-Optimum wurde zunächst in einem cPCR-Lauf im Doppelansatz mit Annealing-Temperaturen von 45–65 °C mit anschließender Gel-Elektrophorese, dann in einem weiteren cPCR-Doppelansatz mit engerem Temperaturbereich (51,7–63,6 °C) bestimmt (Abb. 11 und 12).

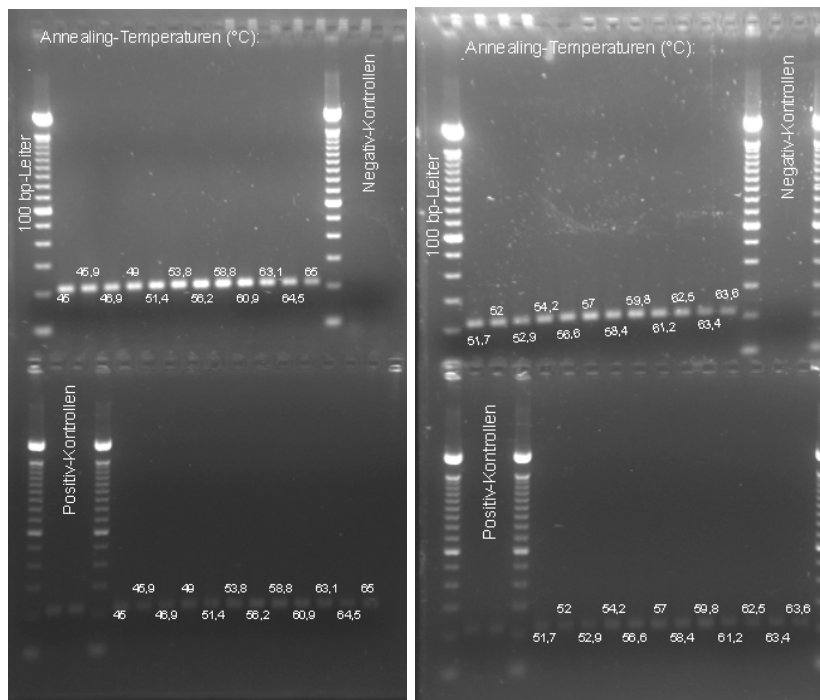


Abb. 11 (links), Abb. 12 (rechts):¹ Ermittlung des Temperaturoptimums im Doppelansatz für Primerpaar 1 (Stro 1F, Stro 1R) auf 0,5 x TBE-Gel mit 0,03‰ Ethidiumbromid unter Verwendung des *S. ratti*-Templates, zunächst bei weiterem (Abb. 11), dann bei engerem Temperaturbereich (Abb. 12). Ein Optimum zeigt sich bei einer Annealing-Temperatur von ca. 58 °C.

Die Auswertung erfolgte jeweils auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03‰ Ethidiumbromid, welches sich in der Abbildung der Banden bei einer erwarteten Bandenlänge von 176 bp bis 310 bp im Vergleich zum TAE-Gel als günstiger erwies. TAE-Gel hat eine niedrigere Pufferkapazität als TBE und zeigt im Allgemeinen eine bessere Auflösung für größere DNA-Fragmente. TBE-Gel hingegen wird von vielen Wissenschaftlern bei erwarteter kurzer Bandenlänge bevorzugt [116].

Alle Primerpaare lieferten klare Banden auf dem Gel. Primerpaar 1 wurde aufgrund besonders deutlicher Ergebnisse in der Folge als Standard eingesetzt (Abb. 13).

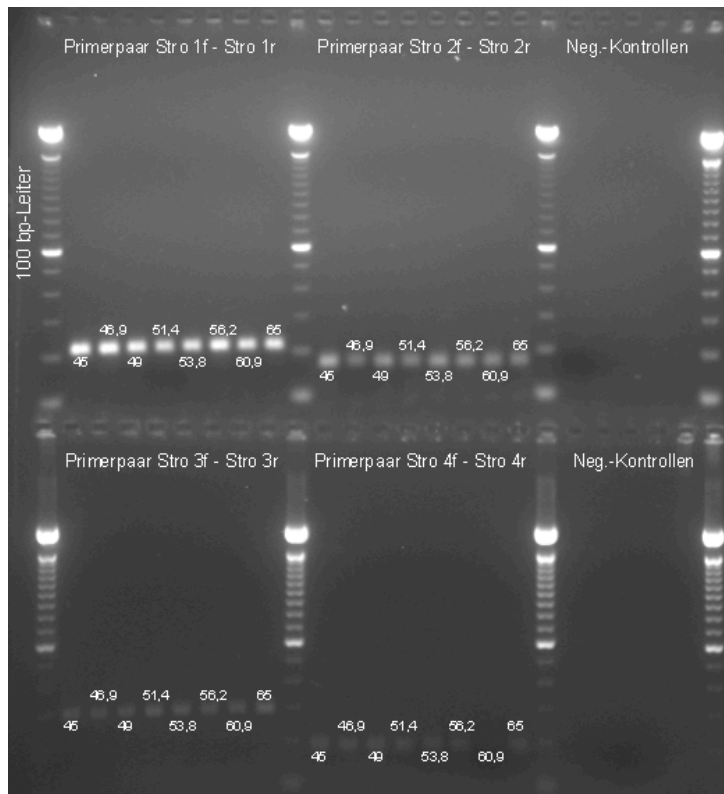


Abb. 13:¹ Primerpaare 1–4 (vgl. Tab. 17) bei verschiedenen Annealing-Temperaturen und Auswertung auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03‰ Ethidiumbromid. Alle Primerpaare zeigen klar positive Ergebnisse. Besonders deutliche Banden finden sich für Primerpaar 1 (Stro 1F, Stro 1R).

Eine Kreuzreaktion der Primer mit Hakenwurm-DNA in der PCR wurde durch den Einsatz eines DNA-Templates aus einer Stuhlprobe mit im MIFC-Verfahren diagnostizierten Hakenwurmbefall ausgeschlossen (vgl. Abb. 14).

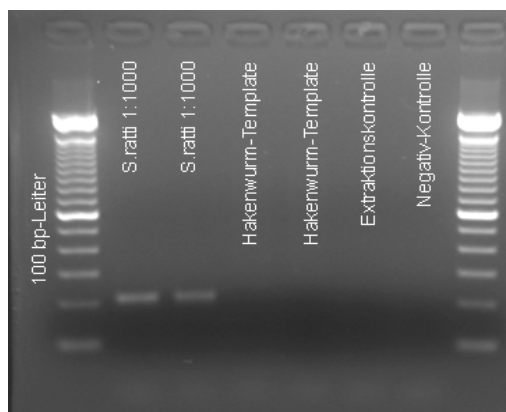


Abb. 14:¹ Das PCR-Ergebnis für Hakenwurm-DNA beim Einsatz von Primerpaar 1 (Stro 1F, Stro 1R) war negativ. Die Auswertung erfolgte auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03‰ Ethidiumbromid.

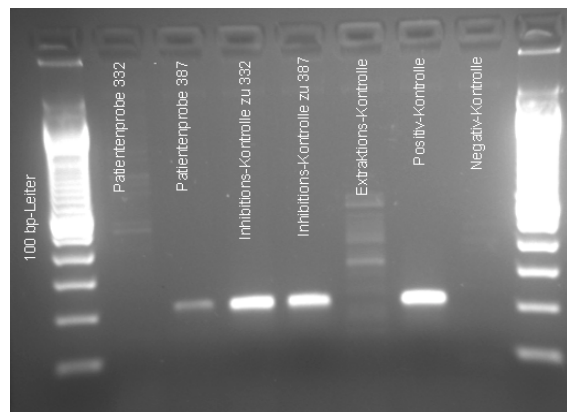


Abb. 15:¹ Negative (392) und positive Patientenprobe (387) mit zugehörigen Inhibitionskontrollen in der cPCR. Als Positivkontrolle wurde die Patientenprobe SS 1 eingesetzt. Auswertung auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03‰ Ethidiumbromid. Die Probe 387 hatte eine positive Serologie (ELISA) bei negativem mikroskopischem Befund nach MIFC.

4.2 Ergebnisse Proben Tansania

4.2.1 Baermann-Sediment

Mit der Baermann-Filtermethode wurden in Mbeya 583 Stuhlproben von 567 Teilnehmern untersucht (16 Doppeluntersuchungen), wobei 273 Proben (von 257 Teilnehmern) aus der Emini-Site Mlowo, 211 aus Santyilia und 99 Proben aus Isongole stammten. Die Teilnehmer waren im Durchschnitt 24,4 Jahre alt, 300 Partizipanten waren weiblichen, 260 männlichen Geschlechts. Von den fehlenden 7 Teilnehmern konnte das Geschlecht im Nachhinein nicht eindeutig nachvollzogen werden.

Die diagnostizierten Infektionen sind in Abbildung 16 dargestellt.

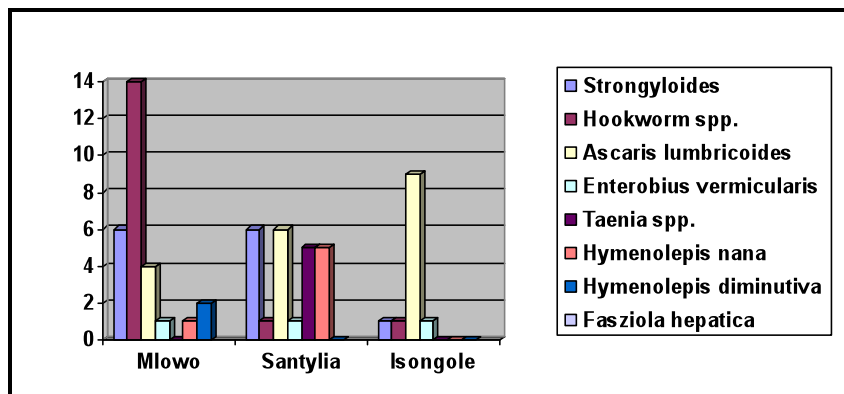


Abb. 16: Mit dem Baermann-Sediment diagnostizierte Helminthiasis. Eine signifikante Verteilung der Strongyloides-Infektionen nach den 3 untersuchten Sites konnte auf einem 5%-Signifikanzniveau nicht festgestellt werden.

Die 13 mit der Baermann-Methode detektierten strongyloidenhaltigen Stuhlproben unterschieden sich deutlich in der Quantität der Larven: Während in zwei Proben mehr als zehn *Strongyloides*-Larven zu finden waren, konnten in den restlichen Baermann-Überständen teilweise nur 1–2 Larven unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Von 7 der 13 Baermann-Überstände wurde aus einem Teil des Sedimentes DNA extrahiert und der PCR zugeführt (vgl. 4.3.3.2).

Es waren 11 Frauen und 2 Männer betroffen (OR 5,41, 95% CI 1,10–26,51). Der Chi-Quadrat-Test ergab einen signifikant höheren Anteil an Erkrankungen unter Frauen ($p = 0,037$). Die Altersverteilung zeigt Tabelle 16.

Alter	Anzahl total (n)	Baermann positiv (n)	OR mit 95% CI	p-Wert (nach $\chi^2(1)$)
0–10	32 (28,3)	5	base	
11–20	31 (27,4)	0	n.d.	
21–40	24 (21,2)	4	1,08 (0,25–4,54)	0.916
41–60	19 (16,8)	2	0,64 (0,11–3,65)	0.611
> 60	7 (6,2)	2	2,16 (0,32–14,40)	0.426

Tab. 16: Altersverteilung der Patienten mit Strongyloidiasis: Es zeigte sich keine signifikante Bevorzugung einer Altersstufe auf dem 5%-Signifikanzniveau. Aufgelistet sind 107 Proben, die in der Baermann-Sedimentation untersucht und der DNA-Extraktion zugeführt wurden.

4.2.2 MIFC

Mit der MIFC wurden in Mbeya 153 Stuhlproben untersucht, davon 90 aus Mlowo, 46 aus Santyilia und 17 aus Isongole. Es wurde keine Stuhlprobe positiv auf Strongyloidiasis getestet. Jedoch wurden andere Helminthiasis mit der MIFC diagnostiziert (Abb. 17). Eine statistische Auswertung für Nicht-*Strongyloides*-Infektionen wurde nicht durchgeführt.

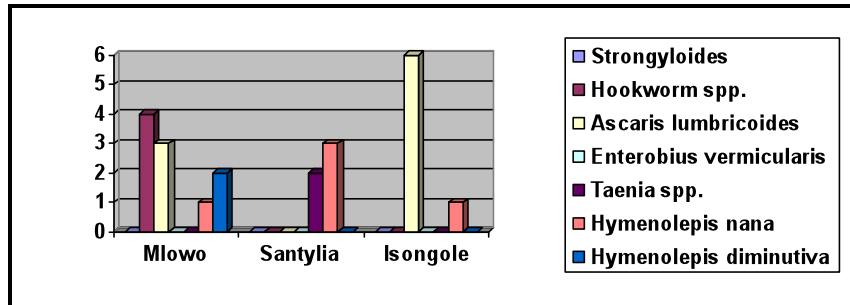


Abb. 17: Mit dem MIFC-Verfahren diagnostizierte Helminthiasis nach Emini-Sites.

4.2.3 Kato-Katz-Verfahren

Im Rahmen der Emini-Studie wurden in Mbeya 575 Stuhlproben (566 Überschneidungen mit der Baermann-Methode) auch mittels Kato-Katz-Technik auf Wurminfektionen untersucht, davon 257 aus Mlowo, 219 aus Santyilia und 99 aus Isongole. Hierbei wurden keine Strongyloiden gefunden, es wurden aber andere Helminthiasis diagnostiziert (Abb. 18). Eine statistische Auswertung für Nicht-*Strongyloides*-Infektionen wurde nicht durchgeführt.

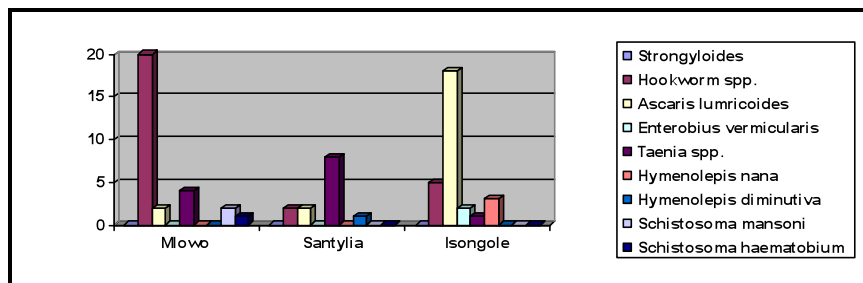


Abb. 18: Mit dem Kato-Katz-Verfahren diagnostizierte Helminthiasis nach Emini-Sites.

4.2.4 Vergleich von Baermann, MIFC und Kato-Katz für unterschiedliche Helminthiasis

Einen Überblick über den Vergleich zwischen Baermann-Sedimentation, MIFC und Kato-Katz-Methode geben Tabellen 17 und 18. Erläuterungen folgen im Text.

	Baermann n / 567 (%)	Kato-Katz n / 575 (%)	MIFC n / 153 (%)	All positive n / 577 (%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	20 (3,53)	22 (3,83)	10 (6,54)	36 (6,24)
<i>Enterobius spp.</i>	3 (0,53)	3 (0,52)	0	6 (1,04)
<i>Hookworm</i>	17 (3,00)	25 (4,35)	4 (2,61)	37 (6,41)
<i>Hymenolepis spp.</i>	8 (1,41)	4 (0,70)	7 (4,58)	14 (2,43)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	13 (2,29)	0	0	13 (2,25)
<i>Taenia spp.</i>	6 (1,06)	12 (2,09)	2 (1,31)	16 (2,77)

Tab. 17: Diagnostizierte Helminthiasis mit Prävalenzen in Baermann-Sediment, Kato-Katz-Methode und MIFC sowie Gesamtprävalenz.

Matched pairs Difference P-Value	Baermann-Kato-Katz n / 566 ^a , m / 566 ^b Difference (95% CI), P ^c	Baermann-MIFC n / 143 ^a , m / 143 ^b Difference (95% CI), P ^c	Kato-Katz - MIFC n / 152 ^a , m / 152 ^b Difference (95% CI), P ^c
<i>Strongyloides stercoralis</i>	13 / 566, 0 / 566 P < 0,001	6 / 143, 0 / 143 0,01 < P < 0,025	0 / 152
<i>Hookworm spp.</i>	27 / 566, 7 / 566 0,012 (-0,006–0,030) 0,1 < P < 0,25	7 / 143, 1 / 143 0,035 (-0,001–0,071) P ^d	11 / 152, 1 / 152 0,046 (0,003–0,089) 0,025 < P < 0,05
<i>Ascaris lumbricoides</i>	24 / 566, 9 / 566 0,004 (-0,013–0,021) P > 0,5	7 / 143, 4 / 143 0,035 (-0,001–0,071) P ^d	5 / 152, 6 / 152 0,020 (-0,009–0,049) P ^d
<i>Taenia spp.</i>	14 / 566, 2 / 566 0,011 (-0,002–0,024) 0,1 < P < 0,25	4 / 143, 0 / 143 0	1 / 152, 2 / 152 ~ 0 P ^d
<i>Hymenolepis spp.</i>	10 / 566, 1 / 566 0,007 (-0,004–0,018) 0,1 < P < 0,25	5 / 143, 3 / 143 0,021 (-0,010–0,052) P ^d	5 / 152, 2 / 152 0,033 (0,004–0,062) P ^d
<i>Enterobius ver- micularis</i>	3 / 566, 0 / 566 0	1 / 143, 0 / 143 ~0 P ^d	1 / 152, 0 / 152 ~0 P ^d

Tab. 18: Vergleich der Methoden Baermann, Kato-Katz und MIFC mit dem McNemar Chi-Quadrat-Test unter Angabe der Differenz mit 95%-Konfidenzintervall und p-Wert.

a = nicht übereinstimmende Paare/ alle Paare

b = übereinstimmende Paare/ alle Paare

c = p-Wert im McNemar Chi-Quadrat-Test; Signifikanzniveau 5%

d = absolute Anzahl diskordanter Paare < 10

4.2.4.1 *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis war ausschließlich im Baermann-Sediment positiv. Dabei fanden sich in 13 von 567 einmalig mit dem Baermann-Verfahren untersuchten Probandenproben *Strongyloides*-Larven (Prävalenz 2,29%). Bei einer Gesamtzahl von 577 mit allen drei Methoden untersuchten Stuhlproben ergab sich eine Gesamtprävalenz von 2,25%. Im Vergleich der Baermann-Sedimentation mit der Kato-Katz-Methode berechnete sich eine Differenz von 0,021 (95% CI 0,009–0,033) und nach dem McNemar Chi-Quadrat-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zugunsten der Baermann-Methode. Auch beim Vergleich des überlegenen Baermann-Verfahrens mit der MIFC war der p-Wert mit $0,01 < P < 0,025$ auf einem 5%-Niveau signifikant. Die Differenz lag bei 0,042 (0,008–0,076).

4.2.4.2 *Hookworm spp.*

Im Baermann-Sediment waren 17 von 567 Stuhlproben positiv für *Hookworm spp.* (Prävalenz 3,00%). Mit der Kato-Katz-Methode wurden in 25 von 575 Fällen Hakenwurmeier gefunden, was einer Prävalenz von 4,35% entspricht. Mittels MIFC wurde in 4 von 153 Proben ein Hakenwurmbefall diagnostiziert (Prävalenz 2,61%). Der Vergleich des Baermann-Sediments mit der Kato-Katz-Methode im McNemar Chi-Quadrat-Test ergab mit einem P-Wert $0,1 < p < 0,25$ und einer OR = 0,6 (95% CI 0,2–1,5) keinen signifikanten Unterschied. Die Differenz ergab 0,012 (-0,006–0,030). Hingegen zeigte sich beim Vergleich der MIFC mit der Kato-Katz-Methode

bei einem p-Wert von $0,05 > p > 0,025$ ein signifikantes Ergebnis zugunsten der Kato-Katz-Methode. Die Differenz berechnete sich auf 0,046 (0,003–0,089). Beim Vergleich der Baermann-Sedimentation mit der MIFC lag die absolute Zahl diskordanter Paare unter 10. Somit konnte der McNemar-Test für diese Gegenüberstellung nicht berechnet werden.

4.2.4.3 *Ascaris lumbricoides*

Die Baermann-Sedimentation zeigte für *Ascaris lumbricoides* eine Prävalenz von 3,53% bei 20 positiven von 567 untersuchten Stuhlproben. Mit der Kato-Katz-Methode waren 22 von 575 Proben (Prävalenz 3,83%) und in der MIFC 10 von 153 Proben positiv (Prävalenz 6,54%). Baermann-Sedimentation und Kato-Katz wiesen mit $p > 0,05$ im McNemar Chi-Quadrat-Test keinen signifikanten Unterschied auf (Differenz 0,004 (-0,013–0,021)). Beim Vergleich von MIFC und Kato-Katz bzw. MIFC und Baermann-Sediment wurde aufgrund der kleinen Anzahl diskordanter Paare kein p-Wert ermittelt.

4.2.4.4 *Taenia spp.*

Für *Taenia spp.* errechnete sich in der Baermann-Sedimentation bei sechs positiven Proben von 567 untersuchten eine Prävalenz von 1,06%. Mit der Kato-Katz-Methode errechnete sich die Prävalenz mit 2,09% fast doppelt so hoch. Hier waren 12 von 575 untersuchten Stuhlproben positiv für *Taenia spp.* In der MIFC war in 2 von 153 Proben eine *Taenia*-Infestation diagnostiziert worden (Prävalenz 1,31%). Der Vergleich zwischen Baermann-Methode und Kato-Katz zeigte eine Differenz von 0,011 (-0,002–0,024) und im McNemar Chi-Quadrat-Test eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $0,25 > p > 0,1$, also keinen signifikanten Unterschied. Für die Berechnung des McNemar-Tests bei der Gegenüberstellung von Baermann-Sedimentation und MIFC bzw. Kato-Katz-Methode und MIFC reichte die Anzahl diskordanter Paare nicht aus.

4.2.4.5 *Hymenolepis spp.*

Mit der Baermann-Sedimentation wurden in 567 Stuhlproben 8 Infestationen mit *Hymenolepis nana* und *Hymenolepis diminutiva* diagnostiziert. Dies entsprach einer Prävalenz von 1,41%. Im Kato-Katz-Verfahren lag die Prävalenz bei 0,70%. Hier waren 4 von 575 untersuchten Proben positiv. Die höchste Prävalenz zeigte die MIFC mit einer Prävalenz von 4,58% (7 positive Proben von 153 untersuchten). Im Vergleich der Baermann-Sedimentation mit der Kato-Katz-Methode errechnete sich eine Differenz von 0,007 (-0,004–0,018) und eine Wahrscheinlichkeit im McNemar Chi-Quadrat-Test von $0,25 > p > 0,1$. Auf einem 5%-Signifikanzniveau ergab sich also kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden. Für die Gegenüberstellung von Baermann-Sedimentation und MIFC bzw. Kato-Katz-Methode und MIFC wurde aufgrund der geringen Zahl diskordanter Paare kein p-Wert ermittelt.

4.2.4.6 *Enterobius vermicularis*

Für *Enterobius vermicularis* berechnete sich die Prävalenz in der Baermann-Sedimentation mit 0,53% (3 positive Proben von 567 untersuchten), in der Kato-Katz-Methode mit 0,52% (3 von 575 Stuhlproben wiesen *Enterobius*-Eier auf). Mit der MIFC konnten in 153 Stuhlproben keine *Enterobius*-Infestationen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Methoden mit Berechnung des McNemar-Tests erübrigte sich aufgrund der geringen Anzahl diskordanter Paare.

4.2.4.7 Ermittlung eines Zusammenhangs von Doppelinfektionen

Zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs von Doppelinfestationen durch die verschiedenen diagnostizierten Helminthiasis wurde ein Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt. Für das gewählte Signifikanzniveau von 5% lag der kritische Wert bei 3,84 (Tab. 19).

	<i>Hymenolepis</i> <i>spp.</i>	<i>Taenia</i> <i>spp.</i>	<i>Enterobius</i> <i>vermicularis</i>	<i>Ascaris</i> <i>lumbricoides</i>	<i>Strongyloides</i> <i>stercoralis</i>
Hookworm <i>spp.</i>	$\chi^2(1) =$ 0,9831 p = 0,321	$\chi^2(1) =$ 1,127 p = 0,288	$\chi^2(1) =$ 0,4154 p = 0,519	$\chi^2(1) =$ 6,7273 p = 0,009	$\chi^2(1) =$ 0,0363 p = 0,849
Hymenolepis <i>spp.</i>		$\chi^2(1) =$ 1,0163 p = 0,313	$\chi^2(1) =$ 0,1508 p = 0,698	$\chi^2(1) =$ 0,9548 p = 0,329	$\chi^2(1) =$ 0,3307 p = 0,565
Taenia <i>spp.</i>			$\chi^2(1) =$ 0,1729 p = 0,678	$\chi^2(1) =$ 0,0000 p = 0,999	$\chi^2(1) =$ 0,3793 p = 0,538
Enterobius <i>vermicularis</i>				$\chi^2(1) =$ 1,1269 p = 0,288	$\chi^2(1) =$ 0,1398 p = 0,709
Ascaris lum- <i>bricoides</i>					$\chi^2(1) =$ 0,885 p = 0,34

Tab. 19: Chi-Quadrat-Wert mit 1 Freiheitsgrad ($\chi^2(1)$) und p-Wert (Signifikanzniveau 5%, entsprechend $p < 0,05$) für die Korrelation der diagnostizierten Helminthiasis im Sinne einer Doppelinfektion

Zwischen Infestationen mit *Ascaris lumbricoides* und *Hookworm spp.* zeichnete sich ein deutlicher Zusammenhang ab. Bei sechs Doppelinfektionen ergab sich ein Chi-Quadrat-Wert von 6,7273, der auf einem 5%-Niveau signifikant ist.

Demhingegen zeigte sich für Hakenwürmer und *Strongyloides*-Infektionen ein Chi-Quadrat-Wert von 0,0363 ($p > 0,05$). Somit konnte kein Zusammenhang für die beiden Infestationen gezeigt werden.

Beim Vergleich von *Ascaris lumbricoides* und *Strongyloides stercoralis* ergab sich ein Chi-Quadrat-Wert von 0,885 ($p > 0,05$). Folglich war keine Korrelation zwischen beiden Erkrankungen ersichtlich.

Auch *Hymenolepis spp.* und Strongyloiden zeigten keine Assoziation im Rahmen einer möglichen Doppelinfektion ($\chi^2(1) = 0,3307$, $p > 0,05$). Selbiges wurde für einen möglichen Zusammenhang von Infestationen mit *Taenia spp.* und einer Strongyloidiasis festgestellt ($\chi^2(1) = 0,3793$, $p > 0,05$). Für *Enterobius vermicularis* und *Strongyloides* errechnete sich ein Chi-Quadrat-Wert von 0,1398 ($p > 0,05$). Auch hier war also keine Korrelation von Doppelinfektionen zu ermitteln. Auch alle weiteren Kombinationsmöglichkeiten zeigten keinen signifikanten Zusammenhang im Sinne einer Doppelinfektion (Tab. 19).

4.2.5 AK-ELISA Proben Tansania

Von 113 der 125 Probanden, deren Stuhlproben mit der Baermann-Methode untersucht und der DNA-Extraktion zugeführt wurden, entnahmen die Field-Teams auch Serumproben. Diese wurden mittels AK-ELISA auf Strongyloidiasis getestet.

Die Auswertung erfolgte nach standardisierten Vorgaben gemäß der Routinediagnostik am Münchener Tropeninstitut (AK-Einheiten (AKE) < 10 = negativ, AKE $10-14$ = grenzwertig, AKE > 20 = positiv). Über ein Computerprogramm (SLT Easy-fit[®]) wurden die Werte mit einer Standardkurve abgeglichen (Tab. 20).

ELISA	Total n (%)	Baermann pos n (%)	OR (mit 95% CI)	p-Wert (nach $\chi^2(1)$)
Negativ	96	10	base	
grenzwertig	8	1	2,0 (0,18-22,07)	0,571
positiv	9	2	2,14 (0,35-13,02)	0,411

Tab. 20: ELISA-Ergebnisse der Serumproben aus Mbeya

Somit konnte auf einem 5%-Niveau ($p < 0,05$) kein signifikanter Zusammenhang zwischen positivem Baermann-Resultat und AK-ELISA zum Nachweis von *Strongyloides* gezeigt werden.

Die mittels cPCR positiv getestete DNA-Probe 2580M15 (vgl. 4.2.6.1) fiel sowohl im ELISA als auch im Baermann-Verfahren positiv aus.

4.2.6 Konventionelle PCR (cPCR) Proben Tansania

4.2.6.1 cPCR mit Stuhlproben

Insgesamt wurden die DNA-Extrakte von 125 Stuhlproben aus der Region Mbeya in die cPCR eingesetzt. Darunter befanden sich auch die 13 mit der Baermann-Methode diagnostizierten Stuhlproben mit Strongyloidiasis.

Nur eine der 125 Proben führte in der PCR zu einer deutlichen Bande auf dem Gel. Dabei handelte es sich um eine der zwei Proben, bei denen im Baermann-Sediment eine große Anzahl an Strongyloides-Larven festgestellt worden war (Abb. 19). Eine Zugabe von Q-Solution bzw. DMSO zum Mastermixansatz oder eine Veränderung der MgCl₂-Konzentration bzw. der Einsatz einer größeren Menge Templates führte zu keinem abweichendem Ergebnis, ebenso wenig ein Wechsel von AmpliTaq Gold® auf HotStar® Taq. Auch unter Verwendung der Primerpaare 2–4 zeigte sich kein anderes Resultat. Die Banden waren bei einer Auswertung auf TBE-Gel kräftiger sichtbar als auf TAE-Gel.

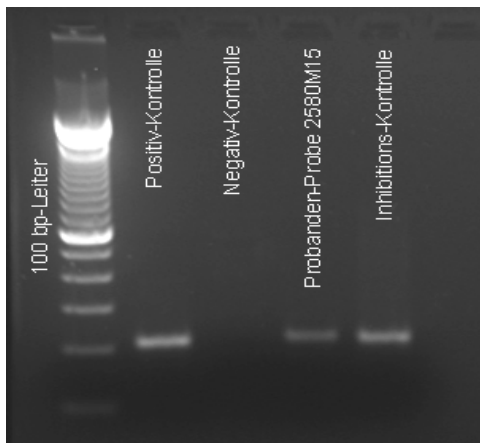


Abb. 19:¹ Positive Probandenprobe 2580M15 bei Auswertung auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03% Ethidiumbromid.

4.2.6.2 cPCR mit Baermann-Sediment

Von 7 der 13 auf Strongyloiden positiven Stuhlproben konnte in Mbeya ein Teil des Baermann-Sedimentes weggefroren werden. Hiervon wurde die DNA extrahiert (vgl. 3.2.5) und eine cPCR durchgeführt. Diese war bei teils schwachen Banden für 6 von 7 Proben positiv (Abb. 20, 21). So konnte für einen Teil der Proben sichergestellt werden, dass in der Mikroskopie keine Verwechslung mit Hakenwürmern oder einer genomisch differierenden *Strongyloides*-Subspezies stattgefunden hatte.

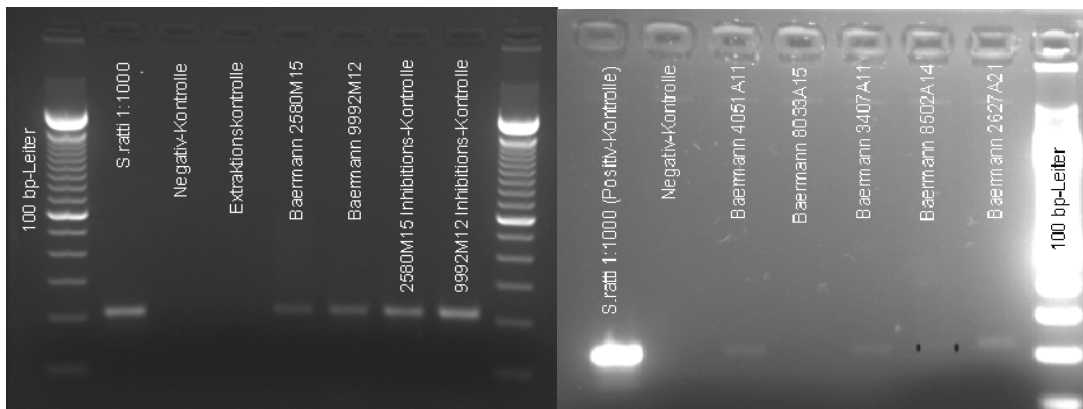


Abb. 20 (links), 21 (rechts):¹ Die DNA-Extraktionen aus 6 von 7 Baermann-Überständen zeigten ein positives PCR-Ergebnis mit Primerpaar 1 (Stro 1F, Stro 1R). Nur Probandenprobe 8033A15 fiel negativ aus. Auswertung auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03% Ethidiumbromid.

4.2.7 Real-time-PCR (rtPCR) Proben Tansania

Die 125 DNA-Extraktionen aus Mbeya wurden im Anschluss in München auch mit der rtPCR auf Strongyloides untersucht. Dabei war keine Probe Strongyloides-positiv. Auch die in der cPCR positiv ausgefallene Probe 2580M15 zeigte in der rtPCR ein negatives Ergebnis.

4.2.8 Sequenzierung Proben Tansania

Eine Sequenzierung erfolgte für das cPCR-Amplifikat der positiven Probandenprobe 2580M15. Alignment und „Blast“ [117] ergaben 100% Übereinstimmung mit den in der Gendatenbank hinterlegten Sequenzen für das *S. stercoralis* 18S rRNA-Gen (partielle Sequenz mit 215 bp). Die Referenznummern für die jeweiligen Sequenzen lauten: AB453316.1, AB453315.1, AB453314.1, AF279916.2, und AJ417023.1.

4.2.9 Messung des DNA-Gehaltes der Proben

4.2.9.1 DNA-Nachweis mittels Gel-Elektrophorese

Um sicherzugehen, dass in den DNA-Extraktionen aus den in Mbeya gesammelten Stuhlproben genügend DNA vorhanden war, wurde ein Agarose-Gel-Lauf mit dem unamplifizierten Template dreier Proben gestartet, worunter sich 2 Proben (2580M15 und 9992M12), die im Baermann-Verfahren viele *Strongyloides*-Larven aufgewiesen hatten, und eine für *Hookworm spp.* positive Probe (9992M11) befanden. Dabei zeigten sich nach Anfärbung mit Ethidiumbromid bis auf eine Ausnahme deutliche Schlieren als Zeichen des DNA-Gehaltes (Abb. 22).

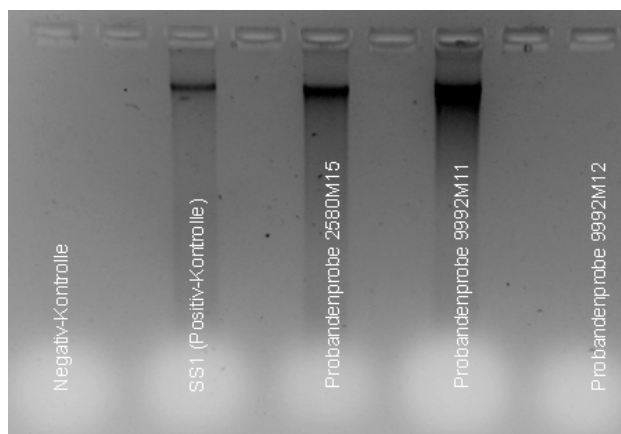


Abb. 22:¹
DNA-Nachweis mittels Agarose-Gel-Elektrophorese ohne vorherige Amplifikation des Templates. Die Proben 2580M15 und 9992M11 weisen deutliche Schlieren auf, während Probe 9992M12 negativ ausfällt. Auswertung auf einem 0,5 x TBE-Gel mit 0,03% Ethidiumbromid.

4.2.9.2 Photometrische Messung des DNA-Gehaltes

Es erfolgte zudem eine photometrische Messung des DNA-Gehaltes für alle 125 Proben mit dem GeneQuant[®]-Photometer. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Konzentration (in µg/ml) an Doppelstrang-DNA in den Templates ermittelt. Im Großteil der Proben lag eine ausreichende DNA-Konzentration vor.

4.2.10 Interviews und Untersuchungen

Von 113 der 125 mit der Baermann-Methode und der PCR auf Strongyloidiasis untersuchten Studienteilnehmern wurden im Rahmen der Haushaltsbesuche durch die tansanischen Emini-Field-Teams auf der Landessprache Kiswahili oder den lokalen Stammessprachen Interviews und Untersuchungen durchgeführt.

Die für die vorliegende Arbeit interessanten Daten wurden im Hinblick auf das klinische Erscheinungsbild der Strongyloidiasis ausgewählt. Die Probanden wurden nach Registrierung von Alter und Geschlecht nicht nur nach generellen gesundheitlichen Problemen, sondern auch spezifischer zu folgenden Symptomen befragt:

- Wässriges oder blutiges Erbrechen
- Wässriger, blutiger oder schwarzer Stuhlgang
- Bauchschmerzen und deren Häufigkeit
- Trockener oder produktiver Husten
- Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust
- Hautläsionen und Pruritus im Sinne einer Larva-Migrans-Symptomatik

Bei der körperlichen Untersuchung wurde unter anderem auf Zeichen von Mangelernährung geachtet, die aber bei keinem Probanden zu beobachten war.

Von den im Rahmen der Emini-Studie erhobenen Labordaten fand der HIV-Status Berücksichtigung (Tab. 21, S. 59).

4 Ergebnisse

Symptome / Laborstatus		total n (%)	Baermann pos n (%)	OR (95% CI)	p-Wert (nach $\chi^2(1)$)
HIV	positiv	11 (9,7)	0		
	negativ	102 (90,3)	13 (12,8)	n.d.	
Gesundheitliche Probleme	ja	11 (9,8)	3 (27,3)	4,06 (0,75–21,91)	0,104
	nein	101 (90,2)	10 (9,9)	base*	
Erbrechen	nein	60 (53,6)	5 (8,3)	base*	
	wässrig	47 (42,0)	7 (14,9)	2,57 (0,70–9,46)	0,155
	blutig	5 (4,4)	1 (20,0)	5,63 (0,41–77,42)	0,197
Durchfall	nein	50 (44,6)	3 (6,0)	base*	
	wässrig	55 (49,1)	9 (16,4)	3,39 (0,81–14,12)	0,094
	blutig	4 (3,6)	0	n.d.	
	schwarz	3 (2,7)	1 (33,3)	17,75 (0,85–369,72)	0,063
Bauchschmerzen	nein	46 (41,1)	4 (8,7)	base*	
	ja	66 (58,9)	9 (13,6)	1,48 (0,40–5,48)	0,554
Husten	nein trocken	43 (38,4) 17 (15,2)	5 (11,6) 0	base* n.d.	
	produktiv	52 (46,4)	8 (15,4)	1,54 (0,44–5,43)	0,501
Fieber	nein	29 (25,9)	2 (6,9)	base*	
	ja	83 (74,1)	11 (13,3)	1,99 (0,40–10,01)	0,403
Nachtschweiß	nein	110 (98,2)	13 (11,8)	n.d.	
	ja	2 (1,8)	0		
Hautläsionen	nein	93 (83,0)	8 (8,6)	base*	
	ja	19 (17,0)	5 (26,3)	4,12 (0,98–17,42)	0,054
Juckreiz	nein	85 (75,9)	8 (9,4)	base*	
	ja	27 (24,1)	5 (18,5)	1,80 (0,44–7,31)	0,410
Gewichtsverlust	nein	107 (95,5)	13 (12,2)	n.d.	
	ja	5 (4,5)	0		

Tab. 21: Überblick über die verschiedenen Symptome/ Labordaten. Im Vergleich werden die Zahlen des Gesamtkollektivs (n = 113) mit den Daten der im Baermann-Verfahren positiven Probanden (n = 13) dargestellt. Letztere waren auch im Gesamtkollektiv enthalten. Als Signifikanzniveau wird 5% (entsprechend $p < 0,05$) angenommen.

4.3 Ergebnisse Patientenproben München

Von den 34 Patienten mit typischer klinischer Symptomatik einer Strongyloidiasis bzw. mit Eosinophilie und/ oder positiver Serologie für *Strongyloides* wiesen sechs Patienten (19%) *Strongyloides*-Larven in mindestens einer Stuhlprobe auf. Nur 44% der Stuhlproben von diesen sechs Patienten zeigten dabei einen positiven Mikroskopiebefund, während die PCR für alle Proben positiv war (vgl. 4.3.1 und 4.3.2). Eine Genom-Sequenzierung bestätigte *Strongyloides stercoralis* in allen Fällen, auch bei den mikroskopisch negativen Proben. Die durchgeführten cPCR- und rtPCR-Untersuchungen dienten der Akkreditierung der Methode zur Routineanwendung (Workflow vgl. Abb. 23).

Bei den Patienten mit nachgewiesener Strongyloidiasis handelte es sich größtenteils um Reiserückkehrer, teilweise aber auch um Personen, die aus tropischen Ländern stammen (Tab. 22). Sie beklagten sich über teils urtikarielle Hautveränderungen mit Pruritus (67% der Patienten), Diarrhö und Übelkeit (33%), Atemwegsbeschwerden und Husten (17%) sowie Fieber (17%). Insgesamt 83% der Patienten ohne feststellbare Strongyloidiasis wiesen ebenfalls mindestens eines dieser Symptome auf, wobei die Verteilung der Symptome ähnlich wie bei der positiven Gruppe war.

Bei einem *Strongyloides*-positiven Patienten war eine asymptomatische HIV-Infektion bekannt. Dieser hatte keine klinischen Zeichen einer Strongyloidiasis, jedoch eine Eosinophilie und eine hochpositive Serologie (> 100 IU/ml).

Bei keinem Patienten wurde ein Hyperinfektionssyndrom festgestellt. In allen mikroskopisch positiven Proben wurde nur eine geringe Anzahl an Larven nachgewiesen.

MIFC	ELISA		cPCR		rtPCR		Eosinophilie		Immunglobulin E		Klinische Erscheinung (Anzahl der Nennungen)	Reiseland/ Herkunftsland	Geschlecht (m/f)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-				
n														
5	+	4	1	5	0	5	0	5	0	3	0	a (4); b (4)	Thailand (2) Brasilien (1) Indien (1)	f: 5 m: 0
5	-	4	1	5	0	5	0	5	0	4	0	a (3); b (1); c (1)	Thailand (1) Brasilien (1) Nigeria (1) Ghana (1)	f: 3 m: 2

Tab 22: Vergleich von MIFC/Baermann Ergebnissen, ELISA, cPCR, rtPCR und Eosinophilie/ Immunglobulin E für die Diagnose von *Strongyloides stercoralis* in Patientenproben des Münchener Tropeninstituts. Klinisches Erscheinungsbild: a) Hautveränderungen, Pruritus, Urticaria; b) Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen; c) Husten, Atembeschwerden

Die durchschnittliche Eosinophilie lag bei 27% (range 6–69%) in der *S. stercoralis*-positiven Gruppe, verglichen mit 9% (range 0–30%) in der negativen Gruppe. Insgesamt 66% der Patienten in der positiven Gruppe zeigten erhöhte Immunglobulin-E-Werte (Durchschnitt 166 IU/ml, range: < 100–326 IU/ml). Hingegen wiesen nur 38% der negativen Patienten pathologische Werte auf (Durchschnitt 124 IU/ml, range < 100–559).

Nur 4 Patienten (67%) mit *Strongyloides* hatten positive Serum-Antikörper (Durchschnitt 38,5 IU/ml, range 8–100 IU/ml). In der negativen Gruppe lag der durchschnittliche Titer bei 15,4 IU/ml (range 1–41 IU/ml). Davon waren 11 (44%) positiv, 6 (24%) grenzwertig positiv, und 8 (32%) negativ. Insgesamt zeigte der AK-Elisa eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 56% (grenzwertig positive Ergebnisse wurden als negativ gezählt). Der positive Vorhersagewert lag bei 25%.

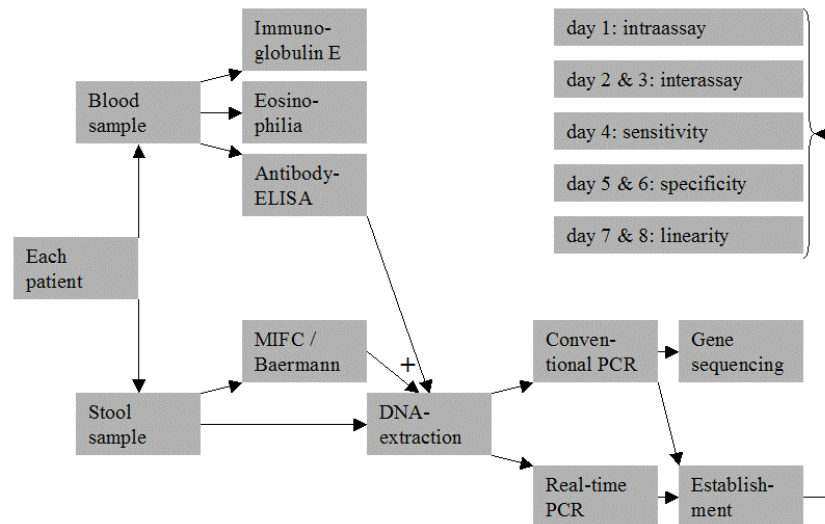


Abb. 23:¹ Workflow zur Akkreditierung der rtPCR und der cPCR

4.3.1 Akkreditierung der Real-time-PCR (rtPCR)

4.3.1.1 Intraassay und Interassay der rtPCR

An Tag 1 wurde in einer Dreifachbestimmung ein rtPCR-Lauf mit einer positiven (SS1) und einer negativen Probe (Labor-ID 4940.09) durchgeführt (Intraassay). Es bestätigte sich jeweils der 3-fach positive bzw. negative Nachweis. Die Schmelzkurven wurden während aller rtPCR-Läufe automatisch im LightCycler[®] registriert und zeigten für die positiven Proben Schmelztemperaturen zwischen 82,4 und 83,4 °C an.

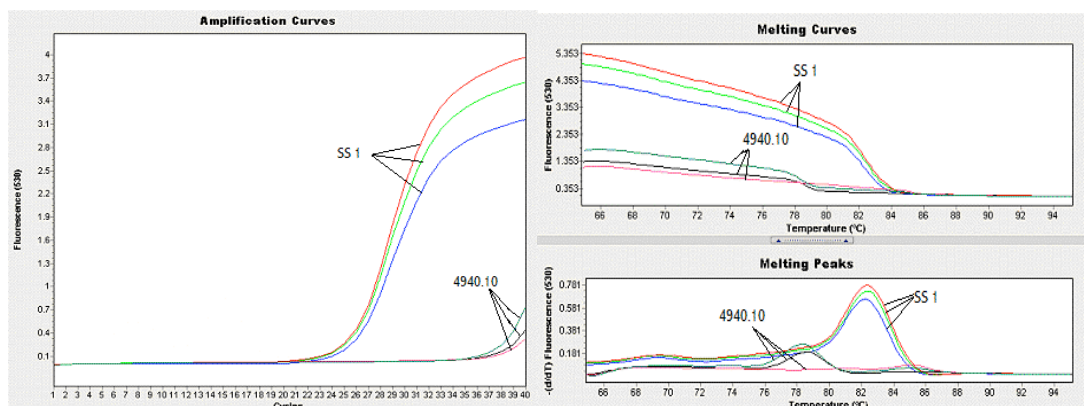


Abb. 24:¹ Amplifizierungs- und Schmelzkurven für *Strongyloides stercoralis*-positive (SS 1) und negative (4940.10) DNA-Templates in Dreifachbestimmung im Rahmen des Intraassays (Tag 1)

An Tag 2 und 3 folgte ein Interassay mit einer Einfachbestimmung der positiven und negativen Probe von Tag 1. An beiden Tagen wurden die Erwartungswerte mit positiven Ergebnissen für Probe SS1 und negativen Ergebnissen für Probe 4940.10 erfüllt (100% Konkordanz). Die positive Patientenprobe SS1 war aus einer in der MIFC für *S. stercoralis* positiven Stuhlprobe extrahiert worden. Die negative Probe 4940.10 stammte von einem Patienten mit Mikrosporidien.

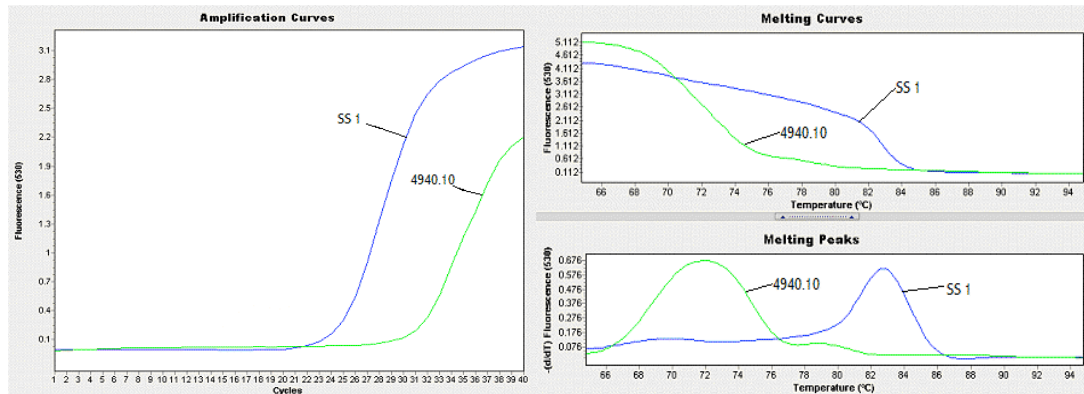


Abb. 25:¹ Amplifizierungs- und Schmelzkurven von positivem (SS 1) und negativem (4940.10) DNA-Template in der *Strongyloides*-rtPCR im Rahmen des Interassays. Für SS 1 zeigt sich ein charakteristischer Peak bei ca. 82,5 °C. Die Ergebnisse für Tag 2 und Tag 3 waren vergleichbar.

4.3.1.2 Sensitivität der rtPCR

An Tag 4 folgte eine rtPCR mit 10 *Strongyloides*-positiven Proben in MIFC oder AK-ELISA. Alle Proben zeigten positive Ergebnisse in der rtPCR (100% Sensitivität), wobei in 4 Fällen grenzwertige Ergebnisse mit unsaubereren Schmelzkurven auftraten. Für alle Proben wurde nach Durchführung einer cPCR eine Genom-Sequenzierung durchgeführt, um die Anwesenheit von *Strongyloides* auch im Falle negativer Mikroskopiebefunde zu sichern. In der Sequenzierung zeigten alle Proben 100% *S. stercoralis*.

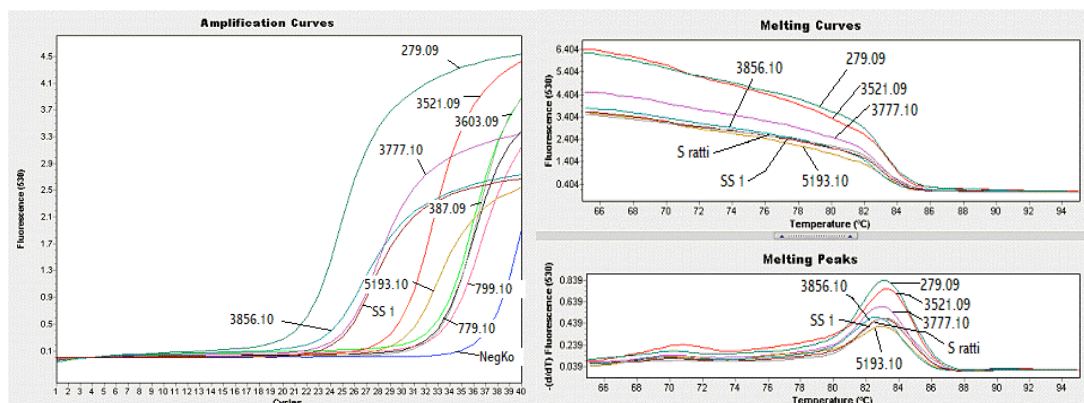


Abb. 26:¹ Links: Amplifizierungskurven der 10 positiven *Strongyloides*-Proben im Rahmen der Sensitivitätsmessung. Im Vergleich die Amplifizierungskurve einer Negativkontrolle (*Aqua dest.*) Rechts: Schmelzkurven der klar positiven Proben in der rtPCR (3856.10, SS 1, 279.09, 3521.09, 3777.10, 5193.10) mit dem charakteristischen Peak in der Schmelzkurve bei ca. 82,5 °C.

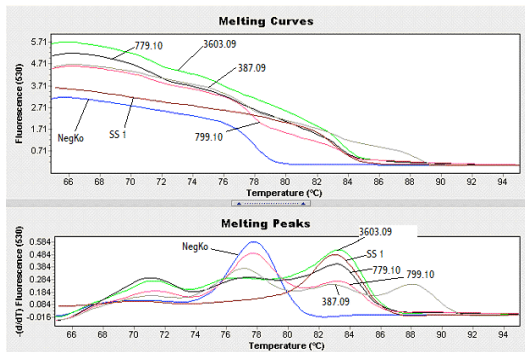


Abb. 27:¹ Positive Proben mit unsauberen Schmelzkurven in der rtPCR. Die Schmelzkurven zeigen für die Proben 3603.09, 779.10, 799.10 und 387.09 klare Peaks bei der zu erwartenden Schmelztemperatur von ca. 82,5 °C, daneben aber noch weitere Peaks. Zum Vergleich das Ergebnis der Negativkontrolle (*Aqua dest.*).

4.3.1.3 Spezifität der rtPCR

An Tag 5 wurde eine rtPCR mit 20 *Strongyloides*-negativen DNA-Proben durchgeführt. Hierbei wurde auf Templates von Patienten mit Mikrosporidien oder Rickettsien zurückgegriffen. Alle Proben zeigten negative Ergebnisse in der rtPCR (100% Spezifität).

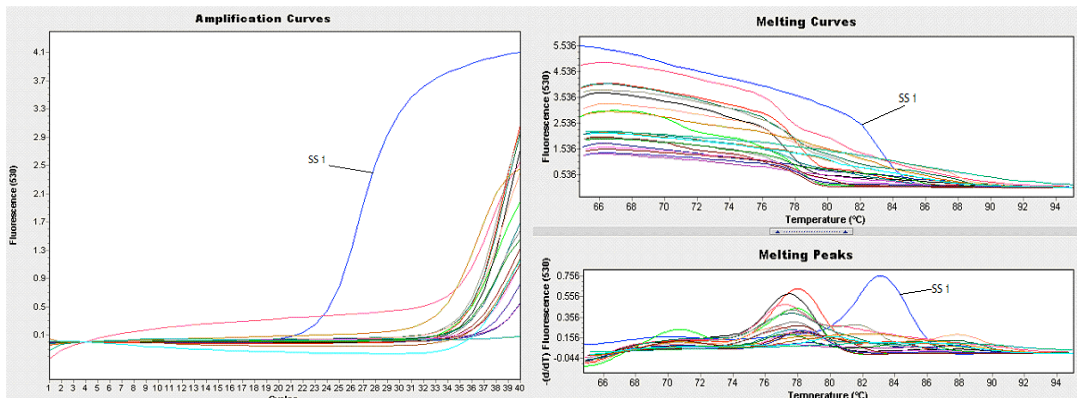


Abb. 28:¹ Amplifizierungs- und Schmelzkurven für *Strongyloides*-positive (SS 1) und -negative Proben (nicht näher bezeichnet) im Rahmen der Spezifitätsmessung an Tag 5. Nur für die positive Probe SS 1 zeigt sich ein charakteristischer Peak bei ca. 82,5 °C.

Weitere rtPCR-Läufe zur Spezifität folgten an Tag 6 mit 6 DNA-Proben aus Patientenstühlen mit *Hookworm spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Schistosoma mansoni*, *Trichostrongylus* und *Enterobius vermicularis*. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt (100% Spezifität).

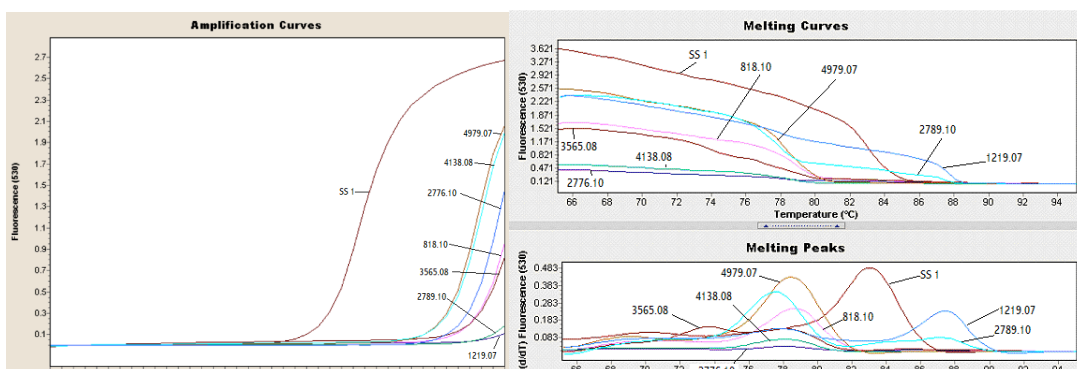


Abb. 29:¹ Amplifizierungs- und Schmelzkurven für die potentiell kreuzreaktiven Proben von Patienten mit *Enterobius vermicularis* (3565.08), *Hookworm spp.* (1219.07), *Schistosoma mansoni* (4979.07), *Taenia spp.* (4138.08), *Trichostrongylus* (2789.10) und *Trichuris trichiura* (2776.10), im Rahmen der Spezifitätsmessung. Einzig die Probe SS 1 zeigt den charakteristischen Peak bei ca. 82,5 °C.

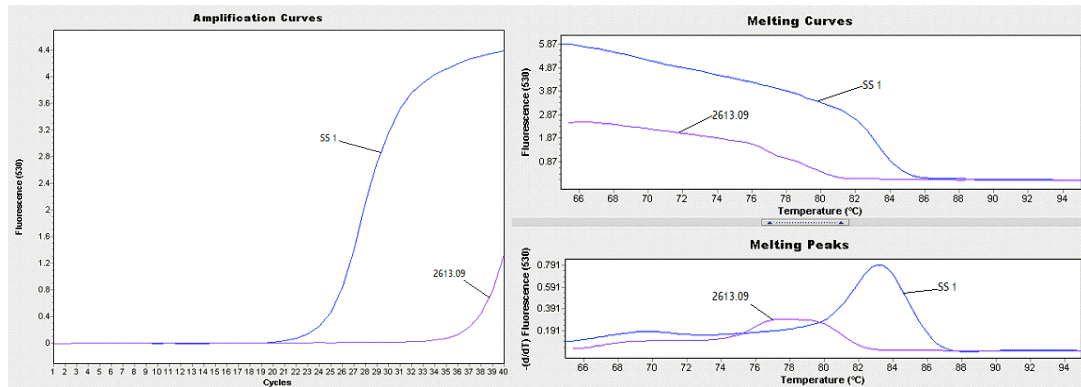


Abb. 30:¹ Amplifizierungs- und Schmelzkurven für die *Strongyloides*-positive Probe SS 1 und die Probe 2613.09 (*Ascaris lumbricoides*) im Rahmen der Spezifitätsmessung. Die rtPCR zeigt ein negatives Resultat für 2613.09. Nur für SS 1 ist ein charakteristischer Peak bei ca. 82,5 °C erkennbar.

4.3.1.4 Linearität der rtPCR

An Tag 7 und 8 wurde die Linearität in der rtPCR mit einer Verdünnungsreihe zweier positiver Proben (SS1 und 279.09) nachgewiesen. Die Verdünnungen der DNA-Templates wurden mit je 45 µl *Aqua dest.* und 5 µl Template hergestellt und als 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} -Verdünnungen in die rtPCR eingesetzt. Für SS1 wurden positive Ergebnisse bis zur 10^{-2} -Verdünnung nachgewiesen. Für die Probe 279.09 wurden positive Ergebnisse bis zur 10^{-3} -Verdünnung beobachtet.

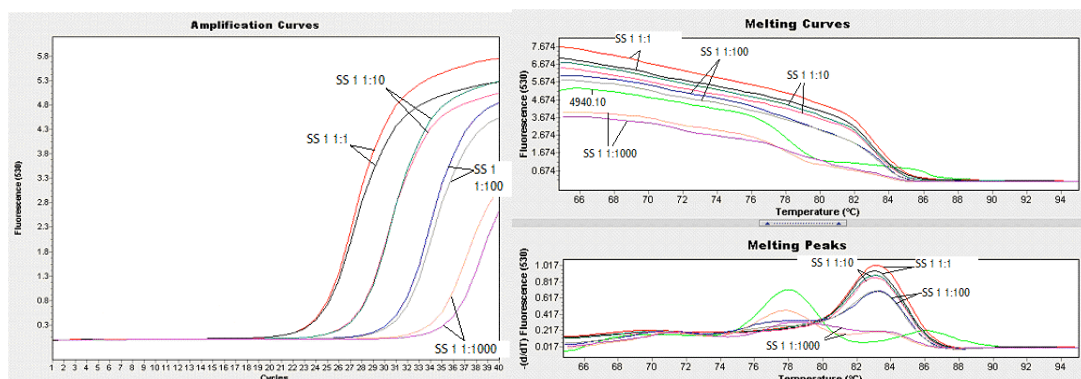


Abb. 31:¹ Verdünnungsreihe mit SS 1 im Rahmen der Linearitätsmessung. Es zeigen sich positive Ergebnisse bis zur Verdünnung $1:10^{-2}$, übereinstimmend mit den charakteristischen Peaks in der Schmelzkurve bis zur Verdünnung 10^{-2} .

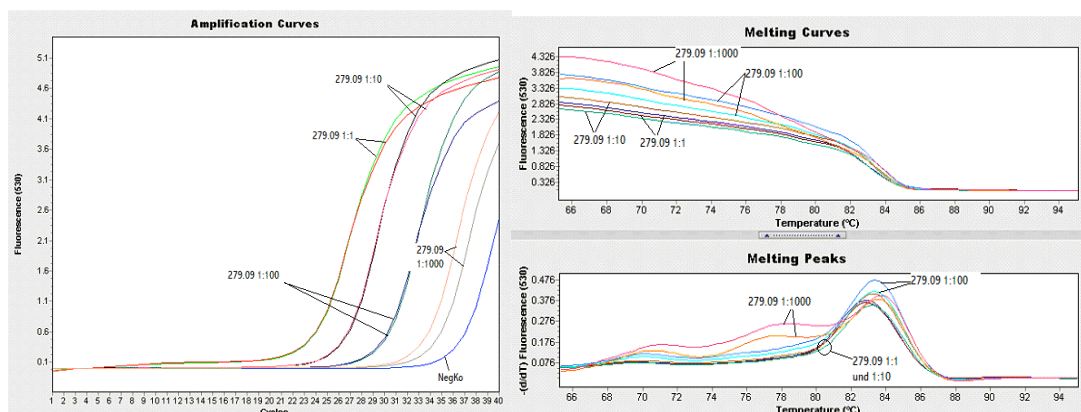


Abb. 32:¹ Im Rahmen der Linearitätsmessung zeigt die Probe 279.09 positive Amplifizierungsergebnisse bis zur Verdünnung 10^{-3} mit charakteristischen Peaks in der Schmelzkurve bei ca. 82,5 °C.

4.3.1.5. Matrix-Effekt der rtPCR

Schließlich wurde an Tag 9 der *Matrixeffekt* getestet, indem eine positive (SS1) und eine negative Probe im Verhältnis 1:1 (also je 0,5 µl) in die rtPCR eingesetzt wurden. Es zeigte sich ein positives Ergebnis für die Matrixprobe.

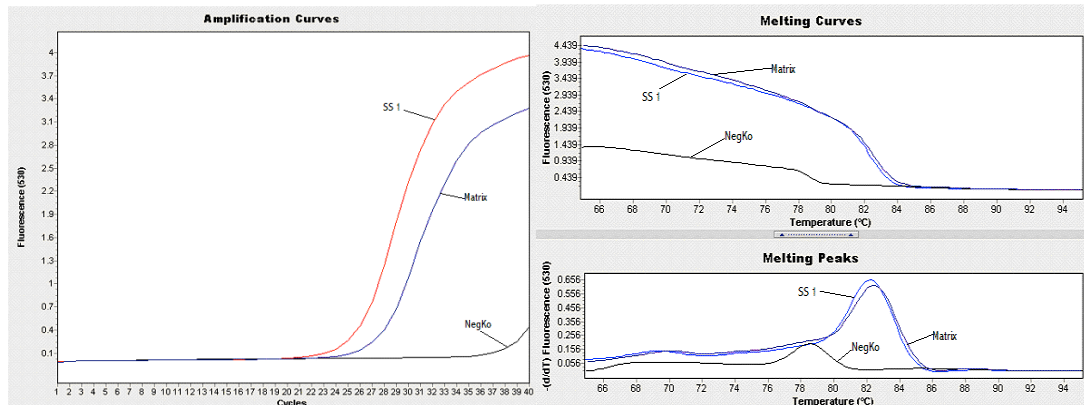


Abb. 33:¹ Positive Amplifizierungskurven für SS 1 und die Matrixprobe (SS 1 und 4940.10 im Verhältnis 1:1 als Template eingesetzt). Im Vergleich die Negativkontrolle (*Aqua dest.*). Charakteristische Peaks in der Schmelzkurve finden sich für SS 1 und die Matrixprobe.

4.3.2 Akkreditierung der konventionellen PCR (cPCR)

Der Workflow zur Akkreditierung der cPCR, die in Zweifelsfällen der rtPCR zur Ergebnissicherung folgen kann, entsprach dem Workflow der rtPCR (vgl. Abb. 23). Die Durchführung der cPCR erfolgte wie in 3.2.7.3. beschrieben. Die anschließende Agarose-Gelelektrophorese auf einem 0,5% TBE-Gel folgte dem in 3.2.8.2. erläuterten Schema. Hintergrund der cPCR-Akkreditierung waren die grenzwertig positiven rtPCR-Ergebnisse.

4.3.2.1 Intraassay und Interassay der cPCR

An Tag 1 bis 3 wurde in einer Dreifachbestimmung bzw. in 2 weiteren Einzelbestimmungen mit einer positiven (SS 1) und einer negativen Probe (4940.10) jeweils die erwarteten Resultate nachgewiesen (100% Konkordanz).

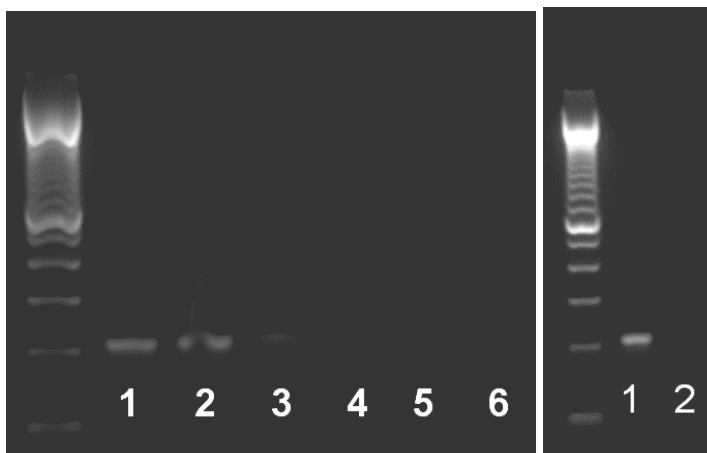


Abb. 34 (links):¹ 3x positiver Nachweis für die *Strongyloides*-positive Probe SS 1 (Markierungen 1–3), und 3 x negativer Nachweis für die Mikrosporidien-Probe 4940.10 (4–6) im Rahmen des Intraassays an Tag 1.

Abb. 35 (rechts):¹ Positiver Nachweis für SS 1 (Markierung 1) und negatives Ergebnis für 4940.10 (Markierung 2) im Rahmen des Interassays an Tag 2. Für Tag 3 (Wiederholung des Interassays) zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

4.3.2.2 Sensitivität der cPCR

Dieselben 10 *Strongyloides*-positiven Proben in MIFC oder ELISA, die in die rtPCR eingesetzt wurden, fanden auch in der cPCR Verwendung zur Sensitivitätsbestimmung. Alle Proben wiesen positive Ergebnisse auf (100% Sensitivität, Abb. 36, 37).



Abb. 36:¹
cPCR-Ergebnisse im Rahmen der Sensitivitätsbestimmung an Tag 4.

1 = SS 1 (Positivkontrolle)
2 = 4940.10
3 = Negativkontrolle (*Aqua dest.*)
4 = 3521.09
5 = 779.10
6 = 279.09
7 = 3856.10
8 = 457.10
9 = 818.10

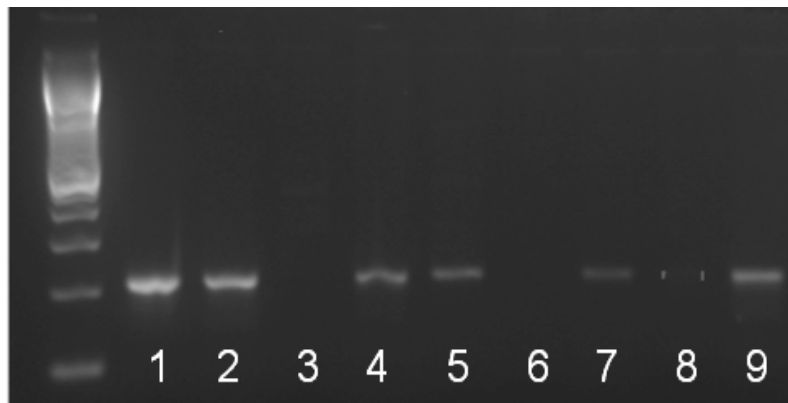


Abb. 37:¹
cPCR-Ergebnisse im Rahmen der Sensitivitätsbestimmung an Tag 4 (Teil 2).

1 = *S. ratti*
2 = SS 1 (Positivkontrolle)
3 = Negativkontrolle (*Aqua dest.*)
4 = 3603.09
5 = 799.10
6 = 822.09 (negatives Ergebnis)
7 = 387
8 = 3777.10
9 = 5193.10

4.3.2.3 Spezifität der cPCR

An Tag 5 und 6 erfolgte die Spezifitätsbestimmung der cPCR mit 20 negativen und 7 potentiell kreuzreaktiven Proben. Alle Proben wiesen ein negatives Ergebnis in der cPCR auf (Abb. 38, 39).



Abb. 38:¹ Agarose Gel-Elektrophorese nach cPCR im Rahmen der Spezifitätsbestimmung an Tag 5: Alle 20 *Strongyloides*-negativen Proben (b-u) zeigen im Gegensatz zu SS 1 keine charakteristische Bande.

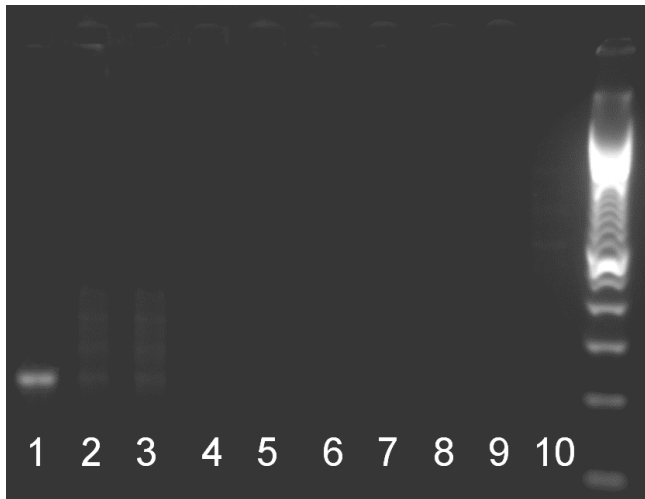


Abb. 39:¹

Spezifitätsbestimmung an Tag 6 im Rahmen der cPCR-Akkreditierung. Alle potentiell kreuzreaktiven Proben (4-10) zeigen keine charakteristischen Banden. Im Gegensatz dazu 279.09 in 10^{-2} und 10^{-3} -Verdünnung (1-3).

- 4 = 2613.07 (*Ascaris lumbricoides*)
- 5 = 2776.10 (*Trichuris trichiura*)
- 6 = 3565.08 (*Enterobius vermicularis*)
- 7 = 2789.10 (*Trichostrongylus*)
- 8 = 4979.07 (*Schistosoma mansoni*)
- 9 = 4138.08 (*Taenia saginata*)
- 10 = 8156M12 (*Hookworm spp.*)

4.3.2.4 Linearität der cPCR

Wie bei der rtPCR wurde an Tag 7 und 8 die Linearität der cPCR mit einer Verdünnungsreihe der Proben SS 1 und 279.09 ermittelt. Wie bei der rtPCR wurden für Template SS 1 klare Banden bis zur Verdünnungsstufe 10^{-2} , für 279.09 bis 10^{-3} beobachtet (Abb. 40).

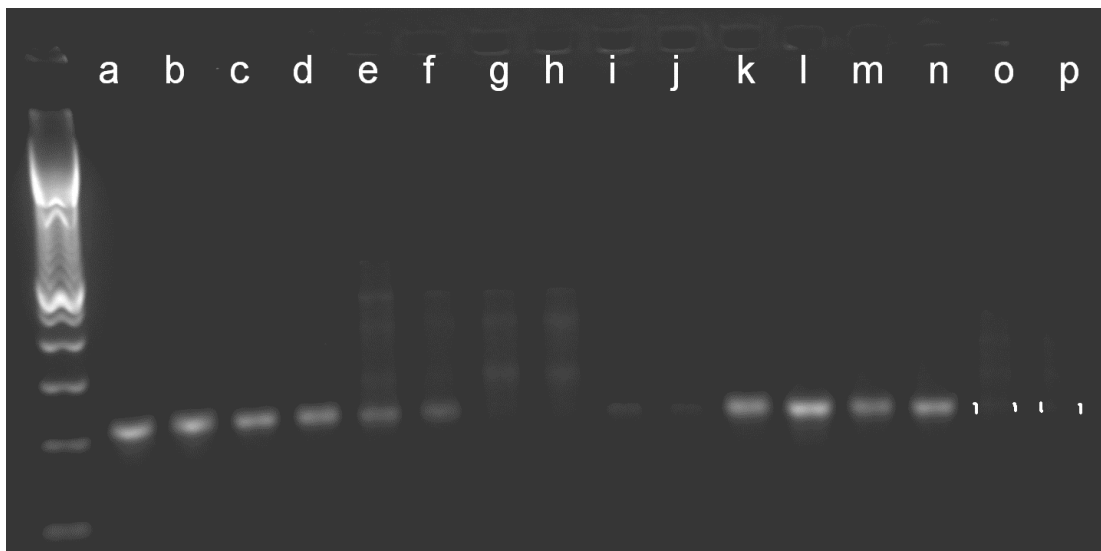


Abb. 40:¹ Bestimmung der Linearität an Tag 7 und 8 (vergleichbare Ergebnisse). Für SS 1 sind klare Banden bis zur Verdünnung 10^{-2} zu erkennen, für 279.09 bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} .

5 Diskussion

5.1 Epidemiologische Aspekte

Weltweit etwa zwei Milliarden Menschen sind mit Helminthen infiziert [64]. Der Großteil der Betroffenen lebt in tropischen und subtropischen Ländern in einfachen Verhältnissen. Nach Schätzungen der WHO sind von diesen zwei Milliarden Personen etwa 30 bis 100 Millionen von Strongyloidiasis, der Infektion mit dem Zwergfadenwurm *S. stercoralis*, betroffen [66]. Die ungenauen Angaben sind unter anderem darauf zurückzuführen, dass die von der WHO zu epidemiologischen Feldstudien über Helminthen empfohlene Kato-Katz-Methode zur Diagnose der Strongyloidiasis ungeeignet ist [17]. Zudem werden Wurminfektionen selbst in der Fachwelt nach wie vor unterschätzt und spielen als Forschungsgegenstand neben anderen, in tropischen Ländern vorkommenden Erkrankungen wie Malaria oder Aids eine untergeordnete Rolle. Dabei wiesen Chan *et al.* bereits vor einigen Jahren darauf hin, dass die negativen gesundheitlichen Auswirkungen von Wurmerkrankungen zu sinkenden schulischen Leistungen führen. Der volkswirtschaftliche Schaden in zahlreichen Entwicklungsländern sollte als genauso gravierend eingeschätzt werden wie der von Malaria oder Tuberkulose verursachte [65].

Breit angelegte Entwurmungskampagnen werden deshalb in vielen Ländern von den Gesundheitsbehörden, oft in Zusammenarbeit mit der WHO, in regelmäßigen, meist einjährigen Abständen v.a. unter Schulkindern durchgeführt. Allerdings genügt die für die meisten Wurminfektionen ausreichende Einzeldosis der eingesetzten Anthelminthika in der Regel nicht zur erfolgreichen Therapie der Strongyloidiasis, welche erfahrungsgemäß eine Gabe über 3–7 Tage erfordert [96]. So konnten Sousa-Figueiredo *et al.* unlängst zeigen, dass eine einmalige präventive anthelminthische Chemotherapie mit Praziquantel und Albendazol nicht zu einer Verminderung der Prävalenz von *Strongyloides* führt [118]. Zur Entwicklung sinnvoller Interventionsstrategien ist unerlässlich, zukünftig verstärkt Informationen über die Ausmaße und geographische Verteilung der Strongyloidiasis zu erlangen [119].

5.2 Strongyloidiasis und Diagnostik

5.2.1 Stand der Dinge

Die Strongyloidiasis verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch oder geht mit uncharakteristischen Magen-Darm-Beschwerden einher [43]. Allerdings kann es im Rahmen einer Immunschwäche zum lebensbedrohlichen Hyperinfektionssyndrom kommen [40, 49, 52, 53].

Der Zusammenhang zwischen HIV-Infektion und Ausprägung einer Strongyloidiasis ist nach wie vor unklar. In der vorliegenden Studie wies keiner der 13 tansanischen Probanden mit positivem Baermann-Befund eine Ko-Infektion mit HIV auf, und nur

bei einem *Strongyloides*-positiven Patienten aus dem Münchener Tropeninstitut war eine HIV-Infektion bekannt. Auch Walson *et. al.* beschrieben in einer in Kenia durchgeführten Studie eine relativ geringe Prävalenz von *Strongyloides* unter HIV-Positiven von 1,3% [120]. Dennoch bleibt zu befürchten, dass aufgrund der Pandemie von HIV/Aids die Zahl der Patienten mit Hyperinfektionssyndrom stark ansteigen könnte, zumal die Prävalenz von Strongyloidiasis bei HIV-Positiven nach den Ergebnissen anderer Studien teils deutlich über derjenigen der Normalbevölkerung liegt [98, 121, 122].

Die derzeitigen Diagnosemöglichkeiten sind unbefriedigend und werden den von *Strongyloides* ausgehenden Auswirkungen und Gefahren nicht gerecht. Eosinophilie und erhöhtes Serum-Immunglobulin E sind bei Patienten mit Strongyloidiasis häufig [13, 68]. Dies wurde mit den Patientenproben aus München im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt. Hier zeigte sich in allen Fällen eine Eosinophilie und in 66% der Fälle ein erhöhtes Immunglobulin E. Dennoch sind beide nur als unspezifische Zeichen zu werten, die im Rahmen einer Vielzahl von Parasitosen vorkommen und dem Kliniker lediglich als Hinweis auf eine Strongyloidiasis dienen können.

Weder die zur Verfügung stehenden Filtermethoden MIFC, Baermann und Harada-Mori, noch Agar-Platten-Kulturen oder immunologische Verfahren (AK-ELISA) bieten eine ausreichende Sensitivität bzw. Spezifität [7, 82, 97]. In der vorliegenden Studie lag die Sensitivität des AK-ELISA mit den Münchener Patientenproben für eine akute *Strongyloides*-Infektion bei 67%, die Spezifität bei 56%. Nur vier Patienten (16%) zeigten Titer über 25 IU/ml. Davon waren drei in Endemiegebieten aufgewachsen (Afghanistan, Bolivien, Kenia) und einer hatte 25 Jahre lang in Indien gelebt. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass grenzwertig oder schwach positive Titer im AK-ELISA auf stattgehabte Infektionen, aber auch auf Kreuzreaktionen, falsch-positive oder falsch-negative Resultate hinweisen können. Eine negative Serologie schließt eine Infektion nicht aus, vor allem bei immunkompromittierten Patienten. Hohe Titer scheinen relativ verlässlich auf eine stattgehabte oder akute Infektion hinzuweisen.

Als Diagnoseverfahren der ersten Wahl wird von den meisten Autoren die Baermann-Sedimentation genannt, allerdings gelingt der Nachweis nur bei 60–70% der Infizierten. Bei einmaliger Stuhluntersuchung ist von einer noch geringeren Sensitivität auszugehen [37].

Da die bisherigen Diagnosemöglichkeiten also mangelhaft sind, hat sich die vorliegende Arbeit zur Aufgabe gestellt, mit der PCR eine zuverlässigere Methode zu entwickeln.

Für eine zunehmende Anzahl tropischer Erkrankungen wurden zuletzt PCR-Methoden in der Diagnostik erprobt, darunter für *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma haematobium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidien*,

Ancylostoma duodenale und *Necator americanus* durch Ten Hove *et al.* und Verweij *et al.* [123-125]. Sie konnten nachweisen, dass die rtPCR eine sehr sensitive und spezifische Methode zur Diagnose der genannten Erreger darstellt.

Zuletzt erprobten Verweij *et al.* auch eine rtPCR auf *S. stercoralis* mit DNA-Isolaten aus Stuhlproben einer Studienpopulation im Norden Ghanas [126]. In diesem Gebiet war aus früheren Studien mit Filtermethoden eine hohe *Strongyloides*-Prävalenz von etwa 11,6% bekannt [24]. In der PCR arbeiteten sie mit drei verschiedenen Primerpaaren, die auf unterschiedliche Genomabschnitte konstruiert worden waren (*S. stercoralis*-specific repeated sequence; Cytochrome c oxidase subunit I gene; 18S rRNA gene). Dabei erwies sich das auf das 18S rRNA-Gen konstruierte Primerpaar bei insgesamt vielversprechenden Ergebnissen als 10–100 Mal sensitiver als die beiden übrigen Paare.

5.2.2 Diagnostik in der vorliegenden Arbeit

5.2.2.1 Baermann-, Kato-Katz-Methode und MIFC im Vergleich

In der vorliegenden Studie wurden 583 Stuhlproben von 567 verschiedenen Probanden aus Mbeya mit der Baermann-Sedimentation auf *Strongyloides* untersucht, wovon 13 Proben positiv waren. Von diesen 583 Proben wurden 566 auch mit der Kato-Katz-Methode und 143 mit der MIFC verarbeitet. Beide Methoden führten zwar zur Diagnose anderer Helminthiasis, es wurde jedoch keine Strongyloidiasis diagnostiziert. Auf einem 5%-Signifikanzniveau zeigte sich eine Überlegenheit der Baermann-Sedimentation gegenüber dem Kato-Katz-Verfahren ($p < 0,001$) bzw. der MIFC ($0,01 < p < 0,025$).

In zahlreichen anderen Studien wird die Baermann-Sedimentation neben der Agar-Platten-Methode als zuverlässigste Methode beschrieben [17, 72, 76-78]. Die MIFC scheint den beiden genannten Methoden unterlegen zu sein [77, 79], was eventuell auf die relativ großen und potentiell larvenhaltigen Stuhlbestandteile, die von der Stoffgaze zurückgehalten werden, zurückzuführen ist [73].

Für die im Münchener Tropeninstitut gesammelten Patientenstühle kam vorwiegend die in der Routinediagnostik verwendete MIFC zum Einsatz. Sie zeigte eine Sensitivität von 44% zur Detektierung von *Strongyloides*-Larven bei Patienten mit akuter Infektion.

5.2.2.2 Prävalenz von Strongyloidiasis in der Mbeya-Region

Geht man von einer Sensitivität des Baermann-Verfahrens von 100% aus, so errechnet sich die Prävalenz von *Strongyloides* in der Region Mbeya mit 2,25%. Die tatsächliche Prävalenz dürfte in etwa doppelt so hoch liegen, da mit dem Baermann-Verfahren pro Studienteilnehmer nur eine Stuhlprobe untersucht wurde und davon ausgegangen werden muss, dass die Sensitivität der Methode deutlich weniger als 100% erreicht.

Die Rate liegt damit höher als die Zahlen aus Studien, die für zahlreiche afrikanische Länder eine Prävalenz von unter 1% zeigen [23]. Jedoch deckt sich das

Ergebnis mit den Angaben mehrerer, vorwiegend jüngerer Studien, die eine deutlich höhere Prävalenz in afrikanischen Ländern vermuten lassen. In Nordghana beispielsweise errechneten Yelifari *et al.* und Verweij *et al.* eine Prävalenz von mehr als 11% [24, 126]. Zuletzt konnten Glinz *et al.* unter Schulkindern verschiedener Regionen der Elfenbeinküste Prävalenzen von 4–48% feststellen [25].

Möglicherweise liegt auch in der Mbeya-Region die Prävalenz von Strongyloidiasis noch deutlich höher als oben beschrieben. Die Baermann-Methode gilt als am zuverlässigsten, wenn der Stuhl frisch, d.h. innerhalb der ersten Stunde nach Absetzen, verarbeitet wird. Aufgrund der Struktur des Emini-Projektes mit verzögerter Lieferung des Materials aus den oft entlegenen Projektdörfern war eine Verarbeitung der Proben aber meist erst am Folgetag möglich. Dies könnte zu einem teilweisen Absterben der Larven in den Stuhlproben mit entsprechend negativem Baermann-Befund geführt haben. Andererseits gelten *Strongyloides*-Larven als relativ widerstandsfähig, auch wenn bei längerem Transport mit einer Umwandlung der rhabditiformen in filariforme Larven gerechnet werden muss [38].

5.2.2.3 Geschlechtsspezifische Aspekte der Strongyloidiasis

Bei den Baermann-positiven tansanischen Probandenproben zeigte sich ein signifikant höherer *Strongyloides*-Befall von Frauen auf einem 5%-Niveau. Es waren elf Frauen und zwei Männer betroffen (OR 5,41 (CI 95%: 1,10–26,51), $p = 0,037$).

Möglicherweise hat dies damit zu tun, dass Frauen in Tansania im Gegensatz zu Männern weniger häufig Schuhe besitzen und sich beim Barfußlaufen mit *Strongyloides* infizieren. Es ist bekannt, dass Strongyloiden über schlammigen Erdboden auf den barfußlaufenden Menschen übertragen werden [21] und gerade die Feldarbeit als klassischer Aufgabenbereich der Frauen könnte zu einem überwiegenden Befall des weiblichen Geschlechts führen. Unter Umständen verwenden Frauen auch häufiger als Männer die oft unhygienischen Holzlatrinen und infizieren sich dort mit dem Zwergfadenwurm.

Inwieweit eine geschlechtsspezifische genetische Disposition besteht, bleibt unklar. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da in anderen Settings konträre Ergebnisse festgestellt wurden. So wiesen Steinmann *et al.* in der Yunnan-Provinz in China einen überwiegenden Befall von Männern mit *Strongyloides* nach (18,3% vs. 6,1%; $p = 0,011$) [17]. Yori *et al.* beschrieben in einer in Peru durchgeführten Studie ebenfalls einen bevorzugten Befall von Männern (relatives Risiko 1,64; CI 95%: 1,00–2,71) [21].

Auch für die Patientenproben aus dem Münchener Tropeninstitut waren in acht von zehn Fällen weibliche Personen betroffen.

5.2.2.4 Weitere Helmintiasis und Doppelinfektionen

Beim Nachweis von *Hookworm spp.* ergab sich eine signifikante Überlegenheit ($0,05 > p > 0,025$) der Kato-Katz-Methode gegenüber der MIFC auf einem 5%-Niveau.

Es konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen *Ascaris lumbricoides*-Infektionen und Infestationen mit *Hookworm spp.* aufgezeigt werden. Bei 6 Doppelinfektionen betrug der Chi-Quadrat-Wert 6,7273 ($p = 0,009$). Unter Umständen ist dies darauf zurückzuführen, dass beide Spezies im Rahmen der Feldarbeit häufiger als andere Helminthiasis auf denselben Wirt übertragen werden. Während die Larven von *Hookworm spp.* wie bei *Strongyloides* über kontaminierten Erdboden aufgenommen werden, ist die Übertragung von *Ascaris lumbricoides* in der Regel fäkal-oral und häufig mit dem Düngen durch verunreinigte Jauche assoziiert. Im Gegensatz zu einer Studie von Yori *et al.*, in der ein Zusammenhang von *Hookworm*- und *Strongyloides*-Infestationen beschrieben wurde [21], konnte in der vorliegenden Studie hier keine Assoziation festgestellt werden.

5.2.2.5 Konventionelle PCR und Real-time-PCR Proben Tansania

Von 125 Proben, darunter die 13 Baermann-Positiven, wurden in Mbeya DNA-Extraktionen vorgenommen. Die Extraktion erfolgte mit der Vor-Lysierung einer größeren Probenmenge durch DTT, KOH, HCl und Tris-HCl, um im Anschluss etwa 200 µg der vorlysierten Probe in das Qiagen-Standardprotokoll einzusetzen.

Nur eine der 13 Baermann-positiven Probandenproben zeigte auch in der cPCR ein positives Ergebnis. In der rtPCR konnte keine Probe auf *Strongyloides* positiv getestet werden. Damit lagen die Ergebnisse in der PCR mit den tansanischen Proben deutlich hinter den Erwartungen zurück.

Die Annahme, es könne sich bei den in Mbeya diagnostizierten *Strongyloides* um eine Subspezies mit abweichendem Genom und folglich negativem PCR-Ergebnis mit den auf das 18S-rRNA-Gen konstruierten Primern handeln, ist angesichts der Tatsache unwahrscheinlich, dass die PCR mit den aus Baermann-Überständen gewonnenen DNA-Templates positive Ergebnisse lieferte. Es ist anzunehmen, dass in den Baermann-Überständen eine wesentlich höhere Menge an *Strongyloides*-DNA vorlag. Nach Lyse der darin befindlichen Larven und Extraktion der DNA dürfte die Konzentration im Gegensatz zu den nativen Stuhlproben für ein positives PCR-Ergebnis ausreichend gewesen sein. Unterstützt wird diese These durch das positive PCR-Resultat der Probandenprobe aus Tansania. Diese wies nach dem Baermann-Verfahren lichtmikroskopisch eine hohe Konzentration an rhabditiformen *Strongyloides*larven auf. In allen weiteren Proben waren bis auf eine andere Ausnahme im gesamten Baermann-Überstand nur wenige Larven vorzufinden. Möglicherweise war die Menge an *Strongyloides*-DNA in den entsprechenden Extraktionen schlichtweg nicht ausreichend für ein positives PCR-Ergebnis.

Keine der durchgeführten Maßnahmen zur Optimierung der PCR führte zu einem anderen Ergebnis (Zugabe von Q-Solution bzw. DMSO zum Mastermixansatz, Veränderung der MgCl₂-Konzentration, Einsatz einer größeren Menge Templates, Wechsel von AmpliTaq Gold[®] auf HotStar[®] Taq, Verwendung der anderen Primerpaare).

Als lichtmikroskopisch schwer von *S. stercoralis* unterscheidbarer und in einigen Gebieten Afrikas und Papua Neuguineas vorkommender Erreger käme auch *S. fuelborni* in Frage [127]. Sein Genom war jedoch in Abgleich mit dem Genom von *S. stercoralis* beim Alignment im Rahmen des Primerdesigns berücksichtigt worden, sodass selbst bei einer Verwechslung unter dem Mikroskop ein positives PCR-Ergebnis zu erwarten gewesen wäre (Abb. 10 Ergebnisteil).

Untersucherabhängig kann lichtmikroskopisch zudem eine Verwechslung mit Hakenwurmlarven stattfinden. Im Allgemeinen werden bei Hakenwurmbefall die Eier mit der Fäzes ausgeschieden, jedoch schlüpfen die Larven seltener auch bereits während der Darmpassage und sind dann nur schwer von *Strongyloides*-Larven zu unterscheiden. Diese Verwechslungsgefahr war in einer Region wie Mbeya mit hoher Prävalenz für Hakenwürmer entsprechend größer. Zusätzlich ist es durch die teilweise verzögerte Anlieferung der Fäzes-Proben in das Hauptlabor nach Mbeya mit entsprechendem Verzug beim Verarbeiten mit der Baermann-Sedimentation möglicherweise zu einem zwischenzeitlichen Schlüpfen von Hakenwurmlarven aus den Eiern gekommen [128].

Die konstruierten Primer waren im Vorfeld negativ auf eine Kreuzreaktion mit Hakenwurm-DNA getestet worden, sodass sich das negative PCR-Ergebnis mit den tansanischen Proben erklären ließe. Es sprechen jedoch die positiven PCR-Resultate mit den aus den Baermann-Überständen gewonnenen Templates zumindest für 7 der 13 positiven Proben gegen eine Verwechslung mit Hakenwürmern.

Eventuell könnte das Ergebnis auch auf eine fehlerhafte Verarbeitung der Stuhlproben oder eine inadäquate Lagerung der DNA im Anschluss an die Extraktion zurückzuführen sein. Die Stuhlproben wurden nach Lieferung durch die Field-Teams in das MMRP-Gebäude meist am selben Tag mit der Baermann-Methode, dem Kato-Katz-Verfahren und der MIFC verarbeitet, der Rest in den Kotgefäßen anschließend im Kühlschrank bei 7 °C über Nacht aufbewahrt. Die Proben wurden dann je nach Untersuchungsergebnis verworfen oder bei -18 °C gelagert. Die gesammelten tiefgekühlten Proben wurden gegen Ende des Forschungsaufenthaltes in Mbeya nach mehreren Wochen Lagerung der DNA-Extraktion zugeführt. Die Extraktion erfolgte identisch dem zuvor in München erfolgreich erprobten Verfahren, nämlich der Lyse größerer Stuhlmengen mit DDT, KOH, HCl und Tris-HCl und dem anschließenden Einsatz einer etwa je 200 µg großen Menge der nunmehr vorverarbeiteten Proben in das Qiagen Standard-Protokoll. Anschließend wurden die gewonnenen DNA-Templates bei -18 °C zwischengelagert, ehe sie auf Trockeneis nach München transportiert und dort in die PCR eingesetzt wurden.

Möglicherweise führte die verwendete Lysemethode mit DTT, KOH, HCl und Tris-HCl nicht zu einer ausreichend zuverlässigen Zersetzung der relativ robusten Larvenhülle mit entsprechender DNA-Freigabe in Lösung. Das folgliches Fehlen von *Strongyloides*-DNA im Template wäre eine Erklärung für das enttäuschende PCR-

Ergebnis mit den tansanischen Proben. Dagegen spricht allerdings die Zuverlässigkeit des Verfahrens bei den Patientenproben aus München.

Diskutiert werden muss auch die Verwendung schadhafter Reagenzien bei der DNA-Extraktion in Mbeya oder ein eventuell zu starker DNA-Abbau während der relativ langen Lagerungszeit der Templates von bis zu sechs Monaten zwischen Extraktion und PCR. So war möglicherweise keine ausreichende Menge an *Strongyloides*-DNA mehr in den Proben vorhanden, zumal bei größtenteils geringer Larvenanzahl von vornherein wenig Ausgangsmaterial vorhanden gewesen sein mag. Es ist außerdem anzunehmen, dass unter den in Mbeya herrschenden Lagerungsbedingungen bereits DNA-Abbau stattgefunden hat. Häufige Stromausfälle in Mbeya und der lange Transportweg nach München mit Unterbrechungen in der Kühlkette könnten zu DNA-Abbau geführt haben. Zwar verfügt das MMRP-Gebäude über Generatoren, die im Falle eines Stromausfalls die Energieversorgung der Labors und damit der Tiefkühltruhen sicherstellen, es kam jedoch mehrmals vor, dass dies nicht nahtlos funktionierte.

Die rtPCR in München wurde weitere sechs Monate nach der cPCR durchgeführt. Die negativen Ergebnisse können hier auch im Rahmen der Degradierung der Proben über einen solch langen Lagerungszeitraum erklärt werden.

5.2.2.6 Konventionelle PCR und Real-time PCR Proben München

Im Gegensatz zu den Proben aus Mbeya zeigten sowohl cPCR als auch rtPCR zuverlässige Ergebnisse für die Patientenproben aus dem Münchener Tropeninstitut und einen deutlichen Hinweis auf Überlegenheit gegenüber den Routinemethoden MIFC und Serum-ELISA (bei einer relativ geringen Anzahl an Proben). Das Baermann-Verfahren kam für diese Proben größtenteils nicht zum Einsatz.

Die positiven PCR-Resultate sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die Patienten mit deutlichen Symptomen einer Strongyloidiasis vorstellten und zum Zeitpunkt der Stuhluntersuchung eine große Anzahl an Larven ausschieden. Unterstrichen wird diese Annahme durch die Erkenntnisse von Genta *et al.* und Heyworth *et al.*, die ein erleichtertes Auffinden von *Strongyloides*-Larven bei klinisch auffälliger Strongyloidiasis und bei Hyperinfektionssyndrom beschrieben [49].

Die Reiseanamnese der *Strongyloides*-Positiven zeigte Aufenthalte in Thailand, Brasilien, Indien, Nigeria und Ghana. Ein Patient war HIV-positiv. Klinisch fielen die Patienten durch teils urtikarielle Hautveränderungen mit Juckreiz (67%), Diarrhö und Übelkeit (33%), Husten und Atembeschwerden (17%) sowie Fieber (17%) auf.

Wie oben beschrieben waren die Primer auf eine partielle Sequenz eines 18sRNA-Gens von *S. stercoralis* konstruiert worden. Sowohl rtPCR als auch cPCR wiesen eine Sensitivität und Spezifität von 100% auf und waren dabei anderen *Strongyloides*-PCR's mit Patientenproben überlegen [129]. Es muss jedoch die relativ kleine Anzahl an Proben berücksichtigt werden. Die Primer zeigten – übereinstimmend mit den Ergebnissen von Verweij *et al.* – verlässliche Resultate [126]. Das Ziel-Gen scheint somit für die Diagnostik geeignet zu sein.

In der rtPCR zeigten 4 von 10 Proben grenzwertig positive Ergebnisse mit unsauberen Schmelzkurven. Diese vier Proben wiesen neben dem charakteristischen Peak bei ca. 82,5 °C weitere Peaks in der Schmelzkurve bei unterschiedlichen Temperaturen auf.

In der cPCR zeigten alle Proben charakteristische Banden mit einer Länge von ca. 227 bp entsprechend dem mit Primerpaar 1 amplifizierten Abschnitt. Der Vorteil der cPCR scheint dabei darin zu bestehen, dass selbst schwache Banden unter dem UV-Licht detektiert werden können, während bei der rtPCR im LightCycler® Ausschussparameter schwieriger zu definieren sind.

Die unklaren rtPCR-Ergebnisse und relativ schwachen Banden in der cPCR in vier Fällen haben möglicherweise mit einer geringen Anzahl ausgeschiedener Larven im Stuhl zu tun. Offenbar korrelieren die PCR-Ergebnisse mit der Intensität der Infektion [123, 125]. Der Unterschied zwischen klarem cPCR-Ergebnis im Vergleich zu den unsauberen rtPCR-Resultaten in vier Fällen mag auch auf die Menge an eingesetztem Template (1 µl in die rtPCR, 2 µl in die cPCR) zurückzuführen sein.

Die hohe Sensitivität der PCR in der vorliegenden Arbeit hat möglicherweise mit der Vor-Lysierung der Stuhlproben im Rahmen der DNA-Extraktion zu tun. Diese erlaubt die Verarbeitung größerer Stuhlmengen (bis zu 20 g und mehr), womit die Chance steigen dürfte, auch bei einer kleinen Anzahl an ausgeschiedenen *Strongyloides*-Larven eine solche in der Lyse zu erfassen. Die DNA-Extraktion mittels konventioneller Methoden im Vergleich mit der in dieser Studie verwendeten Vor-Lysierung sollte Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen sein.

5.3 Schlussfolgerungen

Die PCR als neue Diagnosemöglichkeit für Strongyloidiasis und andere parasitäre Erkrankungen scheint unter optimalen Bedingungen, also in erster Linie schneller Verarbeitungsmöglichkeit des Materials und adäquater Lagerung der DNA-Templates, eine vielversprechende und zukunftsweisende Methode zu sein.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PCR ebenso wie der standardmäßig zur Diagnostik eingesetzten Filtermethoden Grenzen auferlegt sind, die mit der Menge an ausgeschiedenen Larven im Stuhl korrelieren. Es ist bekannt, dass die Anzahl an Larven im Kot bei Patienten mit Strongyloidiasis stark variieren kann und oft keine Larven gefunden werden [7]. Deshalb wird für die Diagnostik mit der Baermann-Anreicherung in der Regel eine Stuhluntersuchung an drei verschiedenen Tagen empfohlen. Eine ähnliche Problematik könnte sich für die PCR abzeichnen, bei der zudem im Normalfall viel geringere Mengen an Stuhl eingesetzt werden als bei den Koprokulturverfahren [130]. Hier scheint die in dieser Studie verwendete Vor-Lysierung größerer Stuhlmengen vor der eigentlichen DNA-Extraktion mit der Standard Qiagen-Methode empfehlenswert, um auch bei Geringausscheidern Larven mit größerer Sicherheit zu lysieren.

Insgesamt bietet sich mit der rtPCR für *S. stercoralis* in entsprechend ausgestatteten Labors offenbar ein sehr empfehlenswertes und im Vergleich zu mikroskopischen Untersuchungstechniken zeitsparendes diagnostisches Verfahren. Der Vorteil der vorgestellten rtPCR im Gegensatz zu Multiplex-PCRs liegt in den deutlich geringeren Kosten. Weiterhin ist bei grenzwertigen rtPCR-Ergebnissen die Durchführung einer cPCR zur Diagnosesicherung zu empfehlen.

Die Verwendung der PCR in epidemiologischen Studien hängt von der Ausstattung der Labors vor Ort ab und könnte in Zukunft eine immer wichtigere Rolle spielen. Global betrachtet sollte die Forschung an Helminthen intensiviert werden, letztlich auch, um zum Erreichen der Millennium-Entwicklungsziele der Vereinten Nationen beizutragen. Denn nach wie vor gelten Wurminfektionen als unterschätzt in Bezug auf die negativen sozialen und ökologischen Auswirkungen in Entwicklungsländern [65].

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Strongyloides spp. sind Helminthen, die den Menschen über den Erdboden infizieren (Geohelminthen, engl. „soil-transmitted helminths“) und weltweit 30–100 Millionen Personen, vor allem in tropischen und subtropischen Ländern, befallen [7]. Genaue Zahlen fehlen aufgrund unzureichender Diagnosemethoden in epidemiologischen Studien [131] und der Vernachlässigung von Geohelminthen als Forschungsgegenstand, obwohl die negativen volkswirtschaftlichen Auswirkungen teils mit denen von Malaria oder Tuberkulose gleichgesetzt werden [65]. Aufgrund zunehmender Reiseaktivität in Endemiegebiete nimmt die Zahl an Strongyloidiasis auch in Industrieländern zu. Häufig verläuft die Erkrankung asymptomatisch oder mit uncharakteristischen gastrointestinalen Beschwerden [43]. Es kann jedoch im Rahmen einer Immunschwäche – auch noch Jahrzehnte nach einer Infektion – zum lebensgefährlichen Hyperinfektionssyndrom kommen [39, 49, 52, 53].

Ziele der Arbeit

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer *Strongyloides*-PCR als zuverlässige Routinemethode zur Diagnostik. Bisherige Verfahren wie Baermann-Sedimentation, Merthiolat-Jod-Formalin-Konzentration (MIFC), Agar-Platten-Methode, Harada-Mori-Filterpapiermethode, Kato-Katz-Technik oder der Nachweis von Antikörpern mittels ELISA zeigen allesamt eine unbefriedigende Sensitivität und Spezifität [17, 72, 73, 80]. Jüngste Veröffentlichungen ergaben vielversprechende Ergebnisse für eine *Strongyloides*-PCR [126], allerdings erreichten Studien mit Patientenproben keine Sensitivität von 100% [129]. Daher sollte eine PCR-Methode zum Nachweis von *Strongyloides* DNA aufgebaut und mit den bisher verfügbaren Diagnostikmethoden verglichen werden.

Zudem sollte die vorliegende Studie einen Überblick über die Prävalenz von *Strongyloides* und anderen Helminthen in der Region Mbeya in Tansania geben und einen Vergleich von Baermann-Sedimentation, MIFC und Kato-Katz-Technik zur Diagnostik verschiedener Helminthiasis ziehen.

Methoden

Die für die vorliegende Studie verwendeten Stuhl- und Serumproben wurden im Zeitraum von August bis Dezember 2008 in der tansanischen Region Mbeya im Rahmen eines Populations-bezogenen epidemiologischen Forschungsprojekts (EMINI-Projekt) gesammelt. 567 Stuhlproben wurden einmalig mit der Baermann-Sedimentation auf *Strongyloides* und andere Geohelminthen untersucht. Davon wurden 566 Proben auch mit der Kato-Katz-Methode (gesamt 577) und 143 mit der MIFC (gesamt 153) verarbeitet. Zudem wurden in den besuchten Haushalten Befra-

gungen zu relevanten Symptomen durchgeführt. Von 125 untersuchten Stuhlproben wurden nach Vor-Lysierung mit DTT, KOH, HCl und Tris-HCl sowie anschließender Weiterverarbeitung mit der Qiagen-Methode DNA-Extraktionen zum Einsatz in cPCR und rtPCR gewonnen. Für diese PCR wurden *Strongyloides*-spezifische Primer auf einen 18sRNA-Genabschnitt konstruiert.

Außerdem wurde mit den Serumproben von 113 der 125 Probanden ein ELISA-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen *Strongyloides*-Antigene (AK-ELISA) durchgeführt.

Parallel zu den tansanischen Proben wurden im Zeitraum 2008 bis 2011 Stuhlproben von Patienten des Tropeninstituts mit *Strongyloides*-positivem Mikroskopiebefund nach MIFC, positivem AK-ELISA oder Eosinophilie gesammelt. DNA wurde extrahiert (s.o.) und mittels cPCR und rtPCR amplifiziert. Eine Genomsequenzierung schloss sich der cPCR zur Bestätigung der Diagnose an.

Zudem wurden 20 Kontrollstühle von Patienten mit Mikrosporidien und 7 Stühle von Patienten mit potentiell kreuzreaktiven Wurminfestationen (*Hookworm spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichostrongylus*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Enterobius vermicularis* und *Schistosoma mansoni*) untersucht. Für alle Proben wurden die Werte für Eosinophilie und Serum-IgE mit den Standard-Labormethoden des Tropeninstituts ermittelt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Vier Primerpaare wurden auf eine partielle Sequenz eines 18S-*S. stercoralis* rRNA-Gen mit der BioEdit®-Software designt. Alle Primer zeigten 100% Spezifität für *Strongyloides spp.* im Blast [117], einschließlich *S. stercoralis*, *S. fuelleborni* und *S. ratti*. Eine im Vorfeld durchgeführte cPCR zeigte die besten Ergebnisse auf einem 1,5% TBE-Gel mit 0,03% Ethidiumbromid für Primerpaar 1 bei einer Annealing-Temperatur von 58 °C. Der 18 µl Mastermix bestand aus 10,30 µl H₂O, 1 µl 10 µM Stro 1F und Stro 1R (Endkonzentration 0,5µM), 2 µl 10 x PCR-buffer, 2 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration 2,5 mM), 1,60µl 10 mM dNTP-Mix (Endkonzentration 0,8mM) und 0,1µl 5 U/µl AmpliTaqGold (Endkonzentration 0,025 U/µl).

Für die tansanischen Proben war die Baermann-Sedimentation in 13 Fällen positiv für *S. stercoralis*. Frauen waren signifikant stärker als Männer betroffen (OR 5,41, CI 95% 1,10–26,51, p = 0,037). Die Prävalenz für die Region Mbeya errechnete sich mit 2,25%. Kato-Katz und MIFC führten nicht zur Diagnose einer Strongyloidiasis. Es wurden aber mit allen Methoden andere Helminthiasis festgestellt: 37 Mal *Hookworm spp.* (davon 17 mit Baermann, 25 mit Kato-Katz und 4 mit MIFC; Gesamtprävalenz 6,41%), 36 Mal *Ascaris lumbricoides* (20, 22, 10; 6,24%), 16 Mal *Taenia spp.* (6, 12, 2; 2,77%), 6 Mal *Enterobius vermicularis* (3, 3, 0; 1,04%), 14 Mal *Hymenolepis spp.* (8, 4, 7; 2,43%) und 1 Mal *Fasciola hepatica* (im Baermann). Für die Diagnostik von *Hookworm spp.* zeigte sich eine Überlegenheit der Kato-Katz gegenüber der MIFC (0,05 > p > 0,025). Ein signifikanter Zusammenhang von Doppelinfektionen konnte für *Hookworm spp.* und *Ascaris lumbricoides* nachgewiesen

werden ($\chi^2(1) = 6,7273$, $p = 0,009$). Die cPCR war in nur einem Fall positiv, die rtPCR für alle Proben negativ. Eine fehlerhafte DNA-Extraktion und/oder mangelhafte Bedingungen beim Probentransport von Tansania nach München werden als Ursache hierfür vermutet.

Aus dem Tropeninstitut wurden insgesamt 34 Proben von Patienten mit positiver Mikroskopie (MIFC), positivem AK-ELISA oder mit Eosinophilie auf *Strongyloides* untersucht. Von 11 Proben mit positiven Ergebnissen für *Strongyloides* in MIFC (44% Sensitivität) oder AK-ELISA (Sensitivität 67%, Spezifität 56%) waren in der cPCR alle und in der rtPCR 10 Proben positiv. Die 10 in cPCR und rtPCR positiven Proben wurden für die Akkreditierung beider Methoden zur Routinediagnostik eingesetzt. Zudem wurden 20 Mikrosporidien-Kontrollstühle und 7 Stühle von Patienten mit potentiell kreuzreaktiven Wurminfestationen (Hookworm *spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichostrongylus*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Enterobius vermicularis* und *Schistosoma mansoni*) in die PCR eingesetzt.

Die rtPCR zeigte grenzwertig positive Resultate in 40%. Die Spezifität lag bei 100%. Es fand sich keine Kreuzreaktivität mit anderen Helminthen. Die Akkreditierungskriterien gemäß Standard-Workflow wurden sowohl für cPCR als auch für rtPCR alle erfüllt. Die Gen-Sequenzierung zeigte *S. stercoralis* für alle Proben.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die etablierte rtPCR eine hochspezifische und sehr sensitive Methode zur Diagnostik der Strongyloidiasis darstellt, die schnell durchzuführen und kostengünstiger als Multiplex-PCRs ist. In unklaren rtPCR-Fällen kann eine cPCR als Bestätigungsverfahren durchgeführt werden. Auch bei Patienten mit negativer Mikroskopie oder Serologie sollte bei verdächtiger Klinik und Eosinophilie eine Infektion mit *Strongyloides* bedacht werden.

7 Danksagung

Mein Dank gebührt meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Nicole Berens-Riha, die das Projekt für mich ausgewählt und mich stets unterstützt hat.

Außerdem meinem Doktorvater und Schirmherren des Projekts, Herrn Prof. Dr. Löscher.

Besonders herzlich möchte ich auch Frau Erna Fleischmann danken, die unermüdlich im Labor wuselte und auf all meine Fragen immer eine gute Antwort parat hatte. Danke an Frau PD. Dr. med. Gisela Bretzel für die Einführung in die Laborarbeit und die freundliche Unterstützung bei der Akkreditierung der PCR.

Danke an alle anderen Mitarbeiter im Tropeninstitut München, die mich in jeglicher Weise unterstützt haben, sowie an Herrn PD. Dr. med. Dr. rer. Nat. Heinz Rinder vom LGA für die hilfreiche Unterstützung bei der Entwicklung der PCR.

Für meine Zeit in Tansania gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Inge Kroidl, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie dem lieben tansanischen Team, mit dem zusammenzuarbeiten eine große Freude war. Außerdem Herrn Dr. Hölscher für die freundliche finanzielle Unterstützung und Herrn Dr. Elmar Saathoff für seine Begleitung in Tansania, gerade am Anfang.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
AG	Antigen
AK	Antikörper
AKE	Antikörpereinheiten
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
cPCR	konventionelle PCR (Polymerase Kettenreaktion)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure (engl. double-stranded Deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Emini	Establishment of the infrastructure for the Evaluation and Monitoring of the Impact of New Interventions
<i>Et al.</i>	Lat.: und andere (<i>et alii</i>), Bez. für Koautoren
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde (soweit nicht anders vermerkt)
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
IKP	Inkubationspuffer
KOH	Kaliumhydroxid
M	Molar (molare Konzentration)
m	Meter
MIF	Merthiolat-Iod-Formalin-Lösung
MIFC-Anreicherung	Merthiolat-Iod-Formalin-Konzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMRP	Mbeya Medical Research Programme
nm	Nanometer
OR	Odds Ratio
p	p-Wert, Wahrscheinlichkeitswert
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
Rpm	rotations per minute
rtPCR	Real-time-PCR (Polymerase Kettenreaktion)
S.	<i>Strongyloides</i>
T	Thymin
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan -Borat- Ethylendiamintetraacetat
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure
U	Unit (Einheit der Enzyaktivität), oder Umdrehung bei Zentrifugation
WHO	World Health Organisation
x	mal
$\chi^2(1)$	Chi-Quadrat mit einem Freiheitsgrad

9 Literaturverzeichnis

1. Darwin, Charles, in *The Times*, London. 1881.
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6247>. Aufgerufen am 15.12.2010.
3. Caspary, W., Kist, M., Stein, J.: *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes: Klinik, Diagnostik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin 2006. ISBN 3540413596. S.377
4. Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag, Stuttgart 2005. S. 240.
5. Speare, R. (1989) *Identification of species of Strongyloides*. Grove DI. (ed) *Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man* Volume, 11-83
6. Lynne Shore Garcia, David A. Bruckner: *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Press. 4. Edition, S. 286)
7. Siddiqui, A. A. and Berk, S. L., *Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection*. Clin Infect Dis, 2001. 33(7): p. 1040-7.
8. Chan, M. S., Medley, G. F., Jamison, D., and Bundy, D. A., *The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections*. Parasitology, 1994. 109 (Pt 3): p. 373-87.
9. Kyronseppa, H. J. and Goldsmid, J. M., *Studies on the intestinal parasites in African patients in Owamboland, South West Africa*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1978. 72(1): p. 16-21.
10. Ashford, R. W., Barnish, G., and Viney, M. E., *Strongyloides fuelleborni kellyi: infection and disease in Papua New Guinea*. Parasitol Today, 1992. 8(9): p. 314-8.
11. Segarra-Newnham, M., *Manifestations, diagnosis, and treatment of Strongyloides stercoralis infection*. Ann Pharmacother, 2007. 41(12): p. 1992-2001.
12. Koga-Kita, K., *Intestinal parasitic infections and socioeconomic status in Prek Russey Commune, Cambodia*. Nippon Koshu Eisei Zasshi, 2004. 51(11): p. 986-92.
13. Berk, S. L., Verghese, A., Alvarez, S., Hall, K., and Smith, B., *Clinical and epidemiologic features of strongyloidiasis. A prospective study in rural Tennessee*. Arch Intern Med, 1987. 147(7): p. 1257-61.
14. Johnston, F. H., Morris, P. S., Speare, R., McCarthy, J., Currie, B., Ewald, D., Page, W., and Dempsey, K., *Strongyloidiasis: a review of the evidence for Australian practitioners*. Aust J Rural Health, 2005. 13(4): p. 247-54.
15. Walzer, P. D., Milder, J. E., Banwell, J. G., Kilgore, G., Klein, M., and Parker, R., *Epidemiologic features of Strongyloides stercoralis infection in an endemic area of the United States*. Am J Trop Med Hyg, 1982. 31(2): p. 313-9.
16. Löscher, T./Burchard, G.-D.: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 4.Auflage 2010. Thieme Verlag Stuttgart. S. 785.
17. Steinmann, P., Zhou, X. N., Du, Z. W., Jiang, J. Y., Wang, L. B., Wang, X. Z., Li, L. H., Marti, H., and Utzinger, J., *Occurrence of Strongyloides stercoralis in Yunnan Province, China, and Comparison of Diagnostic Methods*. PLoS Negl Trop Dis, 2007. 1(1): p. e75.
18. Sithithaworn, P., Sukavat, K., Vannachone, B., Sophonphong, K., Ben-Embarek, P., Petney, T., and Andrews, R., *Epidemiology of food-borne trematodes and other parasite infections in a fishing community on the Nam Ngum reservoir, Lao PDR*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006. 37(6): p. 1083-90.
19. Machado, E. R. and Costa-Cruz, J. M., *Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlandia city, state of Minas Gerais, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998. 93(2): p. 161-4.
20. Gamboa, M. I., Kozubsky, L. E., Costas, M. E., Garraza, M., Cardozo, M. I., Susevich, M. L., Magistrello, P. N., and Navone, G. T., *[Associations between geohelminths and socioenvironmental conditions among different human populations in Argentina]*. Rev Panam Salud Publica, 2009. 26(1): p. 1-8.

21. Yori, P. P., Kosek, M., Gilman, R. H., Cordova, J., Bern, C., Chavez, C. B., Olortegui, M. P., Montalvan, C., Sanchez, G. M., Worthen, B., Worthen, J., Leung, F., and Ore, C. V., *Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon*. Am J Trop Med Hyg, 2006. 74(1): p. 97-102.
22. Bava, A. J. and Troncoso, A. R., *Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with AIDS*. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic), 2009. 8(4): p. 235-8.
23. Babiker, M. A., Ali, M. S., and Ahmed, E. S., *Frequency of intestinal parasites among food-handlers in Khartoum, Sudan*. East Mediterr Health J, 2009. 15(5): p. 1098-104.
24. Yelifari, L., Bloch, P., Magnussen, P., van Lieshout, L., Dery, G., Anemana, S., Agongo, E., and Polderman, A. M., *Distribution of human Oesophagostomum bifurcum, hookworm and Strongyloides stercoralis infections in northern Ghana*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2005. 99(1): p. 32-8.
25. Glinz, D., N'Guessan, N. A., Utzinger, J., and N'Goran, E. K., *High prevalence of Strongyloides stercoralis among school children in rural Cote d'Ivoire*. J Parasitol. 96(2): p. 431-3.
26. Brown, R. C. and Girardeau, H. F., *Transmammary passage of Strongyloides sp. larvae in the human host*. Am J Trop Med Hyg, 1977. 26(2): p. 215-9.
27. Herrera, J., Marcos, L., Terashima, A., Alvarez, H., Samalvides, F., and Gotuzzo, E., *[Factors associated with strongyloides stercoralis infection in an endemic area in Peru]*. Rev Gastroenterol Peru, 2006. 26(4): p. 357-62.
28. Kawai, K., Saathoff, E., Antelman, G., Msamanga, G., and Fawzi, W. W., *Geophagy (Soil-eating) in relation to Anemia and Helminth infection among HIV-infected pregnant women in Tanzania*. Am J Trop Med Hyg, 2009. 80(1): p. 36-43.
29. Safer, D., Brenes, M., Dunipace, S., and Schad, G., *Urocanic acid is a major chemoattractant for the skin-penetrating parasitic nematode Strongyloides stercoralis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(5): p. 1627-30.
30. Arthur, R. P. and Shelley, W. B., *Larva currens; a distinctive variant of cutaneous larva migrans due to Strongyloides stercoralis*. AMA Arch Derm, 1958. 78(2): p. 186-90.
31. Smith, J. D., Goette, D. K., and Odom, R. B., *Larva currens. Cutaneous strongyloidiasis*. Arch Dermatol, 1976. 112(8): p. 1161-3.
32. Mehlhorn, H. Eichenlaub, D. Löscher, T.: *Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen*. Gustav Fischer Verlag. 2. Auflage 1995.
33. Mansfield, L. S., Niamatali, S., Bhopale, V., Volk, S., Smith, G., Lok, J. B., Genta, R. M., and Schad, G. A., *Strongyloides stercoralis: maintenance of exceedingly chronic infections*. Am J Trop Med Hyg, 1996. 55(6): p. 617-24.
34. Genta, R. M., *Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis*. Clin Microbiol Rev, 1992. 5(4): p. 345-55.
35. Mahon, Connie R., Lehman, Donald C., and Manuselis, George, *Textbook of diagnostic microbiology*. 3rd ed. 2007, [St. Louis, Mo.]: Saunders Elsevier. xix, 1211 p.
36. Lynne Shore Garcia, David A. Bruckner, *Diagnostic Medical Parasitology*. 1997: ASM Press. 4. Edition. S. 937.
37. Kayser, F. Bienz, K. Eckert, J.: *Medizinische Mikrobiologie*: Thieme Verlag, Stuttgart, 9.Auflage 1998.
38. Neumeister, B./Geiss, H.K./Braun, R.W./Kimmig, P.: *Mikrobiologische Diagnostik*, 2. Auflage 2009. Thieme Verlag Stuttgart, S. 1026.
39. Roxby, A. C., Gottlieb, G. S., and Limaye, A. P., *Strongyloidiasis in transplant patients*. Clin Infect Dis, 2009. 49(9): p. 1411-23.
40. Robson, D., Beeching, N. J., and Gill, G. V., *Strongyloides hyperinfection syndrome in British veterans*. Ann Trop Med Parasitol, 2009. 103(2): p. 145-8.
41. Wolfgang F. Caspary, Manfred Kist, Jürgen Stein *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*. 2006, Berlin: Springer. 558.
42. Keiser, P. B. and Nutman, T. B., *Strongyloides stercoralis in the Immunocompromised Population*. Clin Microbiol Rev, 2004. 17(1): p. 208-17.
43. Al-Sajee, D. M. and Al-Hamdani, A., *A case of gastric and duodenal strongyloidiasis*. Sultan Qaboos Univ Med J. 10(2): p. 262-5.

44. Bhatt, B. D., Cappell, M. S., Smilow, P. C., and Das, K. M., *Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to Strongyloides stercoralis infection*. Am J Gastroenterol, 1990. 85(8): p. 1034-6.
45. Liu, H. C., Hsu, J. Y., and Chang, K. M., *Strongyloides stercoralis hyperinfection presenting with symptoms mimicking acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*. J Chin Med Assoc, 2009. 72(8): p. 442-5.
46. Woodring, J. H., Halfhill, H., 2nd, Berger, R., Reed, J. C., and Moser, N., *Clinical and imaging features of pulmonary strongyloidiasis*. South Med J, 1996. 89(1): p. 10-9.
47. Grove, D. I., *Human strongyloidiasis*. Adv Parasitol, 1996. 38: p. 251-309.
48. Concha, R., Harrington, W., Jr., and Rogers, A. I., *Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome*. J Clin Gastroenterol, 2005. 39(3): p. 203-11.
49. Heyworth, M. F., *Parasitic diseases in immunocompromised hosts. Cryptosporidiosis, isosporiasis, and strongyloidiasis*. Gastroenterol Clin North Am, 1996. 25(3): p. 691-707.
50. Higenbottam, T. W. and Heard, B. E., *Opportunistic pulmonary strongyloidiasis complicating asthma treated with steroids*. Thorax, 1976. 31(2): p. 226-33.
51. Kuberski, T. T., Gabor, E. P., and Boudreaux, D., *Disseminated strongyloidiasis. A complication of the immunosuppressed host*. West J Med, 1975. 122(6): p. 504-8.
52. Marques, C. C., da Penha Zago-Gomes, M., Goncalves, C. S., and Pereira, F. E., *Alcoholism and Strongyloides stercoralis: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of Strongyloides larvae in the stools*. PLoS Negl Trop Dis. 4(6): p. e717.
53. Rose, C. E., Paciullo, C. A., Kelly, D. R., Dougherty, M. J., and Fleckenstein, L. L., *Fatal Outcome of Disseminated Strongyloidiasis despite Detectable Plasma and Cerebrospinal Levels of Orally Administered Ivermectin*. J Parasitol Res, 2009. 2009.
54. Palau, L. A. and Pankey, G. A., *Strongyloides hyperinfection in a renal transplant recipient receiving cyclosporine: possible Strongyloides stercoralis transmission by kidney transplant*. Am J Trop Med Hyg, 1997. 57(4): p. 413-5.
55. Einsiedel, L. and Fernandes, L., *Strongyloides stercoralis: a cause of morbidity and mortality for indigenous people in Central Australia*. Intern Med J, 2008. 38(9): p. 697-703.
56. Agarwal, V. K., Khurana, H. S., Le, H. X., Mathisen, G., and Kamangar, N., *30-year-old HIV-positive female with diffuse alveolar hemorrhage*. J Intensive Care Med, 2009. 24(3): p. 200-4.
57. Meamar, A. R., Rezaian, M., Mohraz, M., Hadighi, R., and Kia, E. B., *Strongyloides stercoralis hyper-infection syndrome in HIV+/AIDS patients in Iran*. Parasitol Res, 2007. 101(3): p. 663-5.
58. J. S. Keystone/ P.E. Kozarsky/ D.O. Freedman/H.D. Nothdurft, B.A. Connor: *Travel Medicine*. 2. Auflage 2008. Mosby Elsevier. Philadelphia. S. 262.
59. Copelovitch, L., Sam Ol, O., Taraquinio, S., and Chanpheaktra, N., *Childhood nephrotic syndrome in Cambodia: an association with gastrointestinal parasites*. J Pediatr. 156(1): p. 76-81.
60. Qu, Z., Kundu, U. R., Abadeer, R. A., and Wanger, A., *Strongyloides colitis is a lethal mimic of ulcerative colitis: the key morphologic differential diagnosis*. Hum Pathol, 2009. 40(4): p. 572-7.
61. Cruz, R. J., Jr., Vincenzi, R., and Ketzer, B. M., *Duodenal obstruction - an unusual presentation of Strongyloides stercoralis enteritis: a case report*. World J Emerg Surg. 5: p. 23.
62. Milder, J. E., Walzer, P. D., Kilgore, G., Rutherford, I., and Klein, M., *Clinical features of Strongyloides stercoralis infection in an endemic area of the United States*. Gastroenterology, 1981. 80(6): p. 1481-8.
63. Marcos, L. A., Terashima, A., Dupont, H. L., and Gotuzzo, E., *Strongyloides hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008. 102(4): p. 314-8.
64. WHO, *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis*. 2004, World Health Organisation: Geneva.

65. Chan, M. S., *The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on*. Parasitol Today, 1997. 13(11): p. 438-43.
66. Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J. J., and Magnussen, P., *Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases?* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. 103(10): p. 967-72.
67. Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., and Hotez, P. J., *Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm*. Lancet, 2006. 367(9521): p. 1521-32.
68. Repetto, S. A., Duran, P. A., Lasala, M. B., and Gonzalez-Cappa, S. M., *High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections*. Am J Trop Med Hyg. 82(6): p. 1088-93.
69. Uparanukraw, P., Phongsri, S., and Morakote, N., *Fluctuations of larval excretion in Strongyloides stercoralis infection*. Am J Trop Med Hyg, 1999. 60(6): p. 967-73.
70. Nielsen, P. B. and Mojon, M., *Improved diagnosis of strongyloides stercoralis by seven consecutive stool specimens*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1987. 263(4): p. 616-8.
71. Anamnart, W., Pattanawongsa, A., Intapan, P. M., and Maleewong, W., *Albendazole Stimulates the Excretion of Strongyloides stercoralis Larvae in Stool Specimens and Enhances Sensitivity for Diagnosis of Strongyloidiasis*. J Clin Microbiol.
72. Hernandez-Chavarria, F. and Avendano, L., *A simple modification of the Baermann method for diagnosis of strongyloidiasis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001. 96(6): p. 805-7.
73. Intapan, P. M., Maleewong, W., Wongsaroj, T., Singthong, S., and Morakote, N., *Comparison of the quantitative formalin ethyl acetate concentration technique and agar plate culture for diagnosis of human strongyloidiasis*. J Clin Microbiol, 2005. 43(4): p. 1932-3.
74. M, Cheesbrough, *"Parasitological Tests". District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 1*. 1998: Cambridge: Cambridge University Press. pp. 220-221.
75. de Kaminsky, R. G., *Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of Strongyloides stercoralis infection*. J Parasitol, 1993. 79(2): p. 277-80.
76. Salazar, S. A., Gutierrez, C., and Berk, S. L., *Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1995. 23(4): p. 141-5.
77. Jongwutiwes, S., Charoenkorn, M., Sitthichareonchai, P., Akaraborvorn, P., and Putapornpip, C., *Increased sensitivity of routine laboratory detection of Strongyloides stercoralis and hookworm by agar-plate culture*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1999. 93(4): p. 398-400.
78. Glinz, D., Silue, K. D., Knopp, S., Lohourignon, L. K., Yao, K. P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N'Goran, E. K., and Utzinger, J., *Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for Schistosoma mansoni and soil-transmitted helminths*. PLoS Negl Trop Dis. 4(7): p. e754.
79. Arakaki, T., Iwanaga, M., Kinjo, F., Saito, A., Asato, R., and Ikeshiro, T., *Efficacy of agar-plate culture in detection of Strongyloides stercoralis infection*. J Parasitol, 1990. 76(3): p. 425-8.
80. Sukhavat, K., Morakote, N., Chaiwong, P., and Piangjai, S., *Comparative efficacy of four methods for the detection of Strongyloides stercoralis in human stool specimens*. Ann Trop Med Parasitol, 1994. 88(1): p. 95-6.
81. Gyorkos, T. W., Genta, R. M., Viens, P., and MacLean, J. D., *Seroepidemiology of Strongyloides infection in the Southeast Asian refugee population in Canada*. Am J Epidemiol, 1990. 132(2): p. 257-64.
82. Conway, D. J., Atkins, N. S., Lillywhite, J. E., Bailey, J. W., Robinson, R. D., Lindo, J. F., Bundy, D. A., and Bianco, A. E., *Immunodiagnosis of Strongyloides stercoralis infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1993. 87(2): p. 173-6.
83. Biggs, B. A., Caruana, S., Mhrshahi, S., Jolley, D., Leydon, J., Chea, L., and Nuon, S., *Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful?* Am J Trop Med Hyg, 2009. 80(5): p. 788-91.
84. van der Feltz, M., Slee, P. H., van Hees, P. A., and Tersmette, M., *Strongyloides stercoralis infection: how to diagnose best?* Neth J Med, 1999. 55(3): p. 128-31.

85. Sudarshi, S., Stumpfle, R., Armstrong, M., Ellman, T., Parton, S., Krishnan, P., Chiodini, P. L., and Whitty, C. J., *Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for Strongyloides stercoralis in travellers compared with immigrants in a non-endemic country*. Trop Med Int Health, 2003. 8(8): p. 728-32.
86. Drug, V., Haliga, R., Akbar, Q., Mihai, C., Cijevschi Prelipcean, C., and Stanciu, C., *Ascites with Strongyloides stercoralis in a patient with acute alcoholic pancreatitis and liver cirrhosis*. J Gastrointestin Liver Dis, 2009. 18(3): p. 367-9.
87. Boscolo, M., Gobbo, M., Mantovani, W., Degani, M., Anselmi, M., Monteiro, G. B., Marocco, S., Angheben, A., Mistretta, M., Santacatterina, M., Tais, S., and Bisoffi, Z., *Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up*. Clin Vaccine Immunol, 2007. 14(2): p. 129-33.
88. Archibald, L. K., Beeching, N. J., Gill, G. V., Bailey, J. W., and Bell, D. R., *Albendazole is effective treatment for chronic strongyloidiasis*. Q J Med, 1993. 86(3): p. 191-5.
89. Marti, H., Haji, H. J., Savioli, L., Chwaya, H. M., Mgeni, A. F., Ameir, J. S., and Hatz, C., *A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of Strongyloides stercoralis and other soil-transmitted helminth infections in children*. Am J Trop Med Hyg, 1996. 55(5): p. 477-81.
90. Goswami, N. D., Shah, J. J., Corey, G. R., and Stout, J. E., *Persistent eosinophilia and Strongyloides infection in Montagnard refugees after presumptive albendazole therapy*. Am J Trop Med Hyg, 2009. 81(2): p. 302-4.
91. Torres, J. R., Isturiz, R., Murillo, J., Guzman, M., and Contreras, R., *Efficacy of ivermectin in the treatment of strongyloidiasis complicating AIDS*. Clin Infect Dis, 1993. 17(5): p. 900-2.
92. Daubenton, J. D., Buys, H. A., and Hartley, P. S., *Disseminated strongyloidiasis in a child with lymphoblastic lymphoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. 20(3): p. 260-3.
93. Adenusi, A. A., *Cure by ivermectin of a chronic, persistent, intestinal strongyloidosis*. Acta Trop, 1997. 66(3): p. 163-7.
94. Ramanathan, R. and Nutman, T., *Strongyloides stercoralis Infection in the Immuno-compromised Host*. Curr Infect Dis Rep, 2008. 10(2): p. 105-110.
95. Speare, R. and Durrheim, D., *Mass treatment with ivermectin: an underutilized public health strategy*. Bull World Health Organ, 2004. 82(8): p. 562.
96. Organisation, World Health, *Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers*. 2006, Geneva, Switzerland: World Health Organisation, Preventive Chemotherapy and Transmission Control (PCT), Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD).
97. Knopp, S., Mohammed, K. A., Stothard, J. R., Khamis, I. S., Rollinson, D., Marti, H., and Utzinger, J., *Patterns and risk factors of helminthiasis and anemia in a rural and a peri-urban community in Zanzibar, in the context of helminth control programs*. PLoS Negl Trop Dis. 4(5): p. e681.
98. Getaneh, A., Medhin, G., and Shimelis, T., *Cryptosporidium and Strongyloides stercoralis infections among people with and without HIV infection and efficiency of diagnostic methods for Strongyloides in Yirgalem Hospital, southern Ethiopia*. BMC Res Notes. 3: p. 90.
99. Organisation, World Tourism, *Global Forecast and Profiles of Market Segments*, ed. v. Tourism: 2020 Vision. 2001: World Tourism Organisation, Madrid, Spain.
100. <http://de.wikipedia.org/wiki/Tansania>. Aufgerufen am 30.9.2010.
101. Schonfeld, M., Barreto Miranda, I., Schunk, M., Maduhu, I., Maboko, L., Hoelscher, M., Berens-Riha, N., Kitua, A., and Loscher, T., *Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of Plasmodium falciparum in south-west Tanzania*. Malar J, 2007. 6: p. 2.
102. <http://www.mmrp.org/>. Aufgerufen am 10.05.2011
103. Bauer, Christian, *Praktikum der veterinärmedizinischen Parasitologie*. 1998, Giessen: Ferbersche B. S. 216.
104. Josef Boch, Rudolf Supperer, Thomas Schnieder, *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6 ed. 2006: Parey Bei Mvs. S. 785.

105. Marti, H. and Escher, E., [SAF--an alternative fixation solution for parasitological stool specimens]. *Schweiz Med Wochenschr*, 1990. 120(40): p. 1473-6.
106. Xiao, X., Wang, T., Ye, H., Qiang, G., Wei, H., and Tian, Z., *Field evaluation of a rapid, visually-read colloidal dye immunofiltration assay for Schistosoma japonicum for screening in areas of low transmission*. *Bull World Health Organ*, 2005. 83(7): p. 526-33.
107. <http://www.who.int/bulletin/volumes/83/7/526.pdf>. Aufgerufen am 16.10.2010.
108. David P. Clark, Nanette J. Pazdernik *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1. Auflage 2009.
109. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. 239(4839): p. 487-91.
110. J. D. Watson, Kary B. Mullis, Richard A. Gibbs, Francois Ferre, *The Polymerase Chain Reaction*. 2009: Springer Verlag.
111. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller, *Medical Microbiology*. 6 ed. 2009, Philadelphia, USA: Mosby Elsevier. 960.
112. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., and Zoric, N., *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. 27(2-3): p. 95-125.
113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Aufgerufen am 15.6.2010.
114. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Aufgerufen am 17.6.2008.
115. Rychlik, W., Spencer, W. J., and Rhoads, R. E., *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18(21): p. 6409-12.
116. Brody, J. R. and Kern, S. E., *History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis*. *Anal Biochem*, 2004. 333(1): p. 1-13.
117. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Aufgerufen am 5.12.2010.
118. Sousa-Figueiredo, J. C., Day, M., Betson, M., Rowell, C., Wamboko, A., Arinaitwe, M., Kazibwe, F., Kabatereine, N. B., and Stothard, J. R., *Field survey for strongyloidiasis in eastern Uganda with observations on efficacy of preventive chemotherapy and co-occurrence of soil-transmitted helminthiasis/intestinal schistosomiasis*. *J Helminthol*: p. 1-9.
119. Stephenson, L. S., Latham, M. C., and Ottesen, E. A., *Malnutrition and parasitic helminth infections*. *Parasitology*, 2000. 121 Suppl: p. S23-38.
120. Walson, J. L., Stewart, B. T., Sangare, L., Mbogo, L. W., Otieno, P. A., Piper, B. K., Richardson, B. A., and John-Stewart, G., *Prevalence and correlates of helminth co-infection in Kenyan HIV-1 infected adults*. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(3): p. e644.
121. Croker, C., Reporter, R., Redelings, M., and Mascola, L., *Strongyloidiasis-related deaths in the United States, 1991-2006*. *Am J Trop Med Hyg*. 83(2): p. 422-6.
122. Corti, M., Palmero, D., and Eiguchi, K., *Respiratory infections in immunocompromised patients*. *Curr Opin Pulm Med*, 2009. 15(3): p. 209-17.
123. ten Hove, R. J., Verweij, J. J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L., and van Lieshout, L., *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of Schistosoma mansoni and S. haematobium infection in stool samples collected in northern Senegal*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008. 102(2): p. 179-85.
124. ten Hove, R., Schuurman, T., Kooistra, M., Moller, L., van Lieshout, L., and Verweij, J. J., *Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. 13(10): p. 1001-7.
125. Verweij, J. J., Brienen, E. A., Ziem, J., Yelifari, L., Polderman, A. M., and Van Lieshout, L., *Simultaneous detection and quantification of Ancylostoma duodenale, Necator americanus, and Oesophagostomum bifurcum in fecal samples using multiplex real-time PCR*. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. 77(4): p. 685-90.
126. Verweij, J. J., Canales, M., Polman, K., Ziem, J., Brienen, E. A., Polderman, A. M., and van Lieshout, L., *Molecular diagnosis of Strongyloides stercoralis in faecal samples using real-time PCR*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009. 103(4): p. 342-6.
127. Genta, R. M., *Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease*. *Rev Infect Dis*, 1989. 11(5): p. 755-67.

128. Ash, Lawrence R./Orihel, Thomas C.: Atlas of human parasitology. 5. Auflage 2007. American Society for Clinical Pathology Press. Chicago. S. 226.
129. Basuni, M., Muhi, J., Othman, N., Verweij, J. J., Ahmad, M., Miswan, N., Rahumatullah, A., Aziz, F. A., Zainudin, N. S., and Noordin, R., *A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths*. Am J Trop Med Hyg. 84(2): p. 338-43.
130. Neumeister, B./Geiss, H.K./Braun, R.W./Kimmig, P.: Mikrobiologische Diagnostik, 2. Auflage 2009. Thieme Verlag Stuttgart, S. 196.
131. Knopp, S., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Steinmann, P., Stothard, J. R., Rollinson, D., Marti, H., and Utzinger, J., *Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. 2(11): p. e331.

10 Verwendete Fragebögen

10.1 Untersuchen Teenager und Erwachsene

EMINI
Questionnaire Survey No. 3 – Clinical Examination – Teenagers & Adults (from 12th Birthday onwards)

1.1	Interviewer Name and ID number	
1.2	Date of Examination	Day: [] Month: [] Year: []
1.3	Household Number	[] [] [] [] [] [] [] []
1.4	Full Name of Participant	
1.5	Participant ID	
1.6	Sex of participant	Male 1 Female 2
1.7	Is Participant present?	Present 1 Not Present 2 -End

Present and past medical history

2.1	Ja, unatumia dawa zozote mara kwa mara? Do you take any medicine regularly?	If yes, please specify: _____	Yes 1 No 2	-2.2 -2.3
2.2	Hizo dawa unapata wapi? From where do you get the medicine?	Hospital / Medical Doctor Health Centre / Dispensary Private Clinic Pharmacy Traditional healer Family / friends / home remedy Other	1 2 3 4 5 8 9	
2.3	Umpata changa yoyote mwaka jana? Have you received a vaccination last year?		Yes 1 Refused 88 Don't know 99	-2.4 -2.5 -2.5
2.4	Ni changu gani ulipata mwaka jana? Which vaccinations did you get last year? (Please prompt and circle) 1 for yes, 2 for no, 99 for don't know	Tetanus / Tetanus: 1 Danda koo / Diphtheria: 2 Pala / Polio: 3 Sura / Measles: 4 Ya kifua kikuu / BCG / Tuberculosis: 5 Uti wa Mpingo / Malaria: 6 Ya ugonjwa wa ini / Hepatitis: B 1 Njai Small Pox: 2 Zigine / Other: 1 Kama adiyu, fafana / If others, specify: _____	1 2 3 4 5 6 1 2 99	

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 1 of 9

2.5	Je, unatumia dawa zifutazo mara kwa mara? Do you take one of the following regularly? (please prompt) 1 for yes, 2 for no, 88 for refused or don't know	Dawa ya kupunguza masumivu / Painkiller 1 Dawa ya kukimisha chini / Laxatives 2 Dawa ya miingazi / Sleeping pills 1 Sigara / Cigarettes 1 Tumbaku ayingine / Other tobacco 1 Kahawa / Coffee 1 Chai / Tea 1 Fombe / Alcohol 1	1 2 88 1 2 88 1 2 88 1 2 88 1 2 88 1 2 88 1 2 88	
2.6	Je unatumia dawa zozote za malaria kwa wakati uliopo? Did you take any Malaria medicine during the last four weeks?		Yes 1 Refused / Don't know 99	-2.7 -2.11
2.7	Ujithiba pekeeiko ayumbani? Did you treat yourself at home?		Yes 1 Refused / Don't know 99	-2.9 -2.9
2.8	Je iligunduliwa una malaria baada ya kupima damu? Was Malaria diagnosis confirmed by a blood slide?		Yes 1 Refused / Don't know 99	
2.9	Dawa gani ya malaria uliyotumia? Which Malaria medicine did you take?	Chloroquine 1 SP 2 Dawa mpya ya kina / Ahi / CoArtem 3 Dawa ya asili / Traditional medicine 4 Ziginezo / Other 5		
2.10	Ni kili ulitumia ya mwiticho? When did you take the last dose?	wiki 0 hadi 2 / 0 to 2 weeks ago wiki 2 hadi 4 / 2 to 4 weeks ago		
2.11	Umetumia dawa aina ya Septine kwa wakati uliopo? Did you take any Septin during the last two weeks?		Yes 1 Refused / Don't know 99	
2.12	Je ulipata koma katika masaa 24 yaliyopita? Did you have fever during the last 24 hours?		Yes 1 Refused / Don't know 99	
2.13	Mwaka jana uliibwa kichocho? Have you been treated for schistosomiasis during the last year?		Yes 1 Refused / Don't know 99	
2.13a	Je mwaka jana ulipata tiba yoyote ya mizizi? Have you been treated for intestinal worms last year?		Yes 1 Refused / Don't know 99	-2.13b -2.14
2.13b	Ni aina gani ya mizizi uliibwa? What type of worm treatment was this? (please prompt and circle)	Madawa kutoka vituo vya afya / Medicine from Health facility 1 Madawa kutoka duka la madawa / Medicine from Drug Pharmacy 2 Madawa kutoka wageni wa jadi / Medicine from Traditional Healer 3 Madawa yaliyotayaliwa ayumbani / Home remedy 4 Other 5 Refused / Don't know 99		
2.14	Kwa sasa unamatizea yoyote ya kiafya? Do you currently have any health problems?	Hyu: please specify: _____	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 2 of 9

Je kuna nyakati unapata dalili zifutazo? Au unazokwa isaa? Do you sometimes have any of the following symptoms? Do you have these presently? (please prompt and tick all that apply)	Hajawahi / Never	Mara chache / Rarely	Mara kwa mara / Frequently	Kwa sasa / Presently	Amekata / Hujit / Refused / don't know
3.1 Kutapika / Vomiting	1	2	3	4	88
3.2 Kutapika damu / Vomiting blood	1	2	3	4	88
3.3 Kukarisha maji / Watery Diarrhoea	1	2	3	4	88
3.4 Kukarisha damu / Bloody Diarrhoea	1	2	3	4	88
3.5 Choo chenut / Black stool	1	2	3	4	88
3.6 Mawimbi ya maboko / Abdominal pain	1	2	3	4	88
3.7 Mawimbi wakati wa kuhosha / Pain when urinating	1	2	3	4	88
3.8 Kichocho / Blood in urine	1	2	3	4	88
3.9 Kikohoni kihawa / Dry cough	1	2	3	4	88
3.10 Kikohoni chenye makocho / Productive cough	1	2	3	4	88
3.11 Kukohoni damu / Coughing blood	1	2	3	4	88
3.12 Kupumua kwa shida / Difficulty in breathing	1	2	3	4	88
3.13 Mawimbi ya kifua / Chest pain	1	2	3	4	88
3.14 Uvundo unawepo mdomoni / Oral thrush	1	2	3	4	88
3.15 Vidonda vidonda / Mouth sores	1	2	3	4	88
3.16 Kuwasa kwa shida / Difficulty swallowing	1	2	3	4	88
3.17 Homu / Fever	1	2	3	4	88
3.18 Kuvimba jacho wika / Sweating at night	1	2	3	4	88
3.19 Mawimbi / Fainting	1	2	3	4	88
3.20 Mawimbi yanagofwa vipale / Skin lesions or rashes	1	2	3	4	88
3.21 Kuwathira / Itching	1	2	3	4	88
3.22 Kukosa hawa ya kula / Loss of appetite / poor eating	1	2	3	4	88
3.23 Kupungua uzito / Loss of weight	1	2	3	4	88
3.24 Gasi na kitiya ya mteu uligunduliwa mikono / Numbness or burning in hands or feet	1	2	3	4	88
3.25 Kuvimba kwa mstet (kiligandu, kawapasi, nyonga) / Lymph node swellings (cervical, axillary, inguinal)	1	2	3	4	88
3.26 Kuwimbi kichwa / Headache	1	2	3	4	88
3.27 Kiwagwanu / Diarrhoea	1	2	3	4	88
3.28 Kukohoni wizi / Incontinence	1	2	3	4	88
3.29 Depedeza / Convulsions	1	2	3	4	88

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 3 of 9

Hospitalisation

4.1	Je unawahi kulirwa kwa mwanapo ya sababu zifutazo mwaka jana? Were you hospitalized for any of the following reasons last year? (Please prompt and circle)	Kukarisha / Diarrhoea 1 Malaria au koma / Malaria or Fever 1 Kukohoni / Cough 1 Ajali au khalara / Accident with hospitalisation (specify) 1	2 99 2 99 2 99 2 99	
4.2	1 = Yes, 2 = No, 99 = don't know	Upunaji / Operations (specify) _____	1 2 99	
4.3	Je uliogezwa damu mwaka jana? Did you get a blood transfusion last year?	Kulirwa kwa sababu ya matatizo mengineyo / Hospitalisation for other reasons (specify) _____	1 2 99	
4.4	1 = Yes, 2 = No, 99 = don't know			
4.5	Je uliogezwa maji mwaka jana? Did you get an intravenous infusion last year?		1 2 99	
	1 = Yes, 2 = No, 99 = don't know			

Sexually transmitted infections

5.1	Je unadhibi yoyote kati ya kizi kwazwa? Au kwa wakati uliopo? Do you have any of the following symptoms at present? Did you have any of them in the past? 1 = Now, 2 = Yes, presently, 3 = Not presently but in the past, 88 = refused / don't know	Vidonda vya nyere masumivu / Genital ulcers 1 Vidonda viziyo na masumivu zote za kizi / Genital ulcers 1 Kutoa ukafu / Genital discharges 1 Viote zote za kizi / Genital warts 1 Malungenge zote za kizi / Blines on genitals 1 Kuvimba mitoki / Swollen lymph nodes in the groin 1 Mawimbi wakati wa kuhosha / Painful urination 1	1 2 3 88 1 2 3 88 1 2 3 88 1 2 3 88 1 2 3 88 1 2 3 88 1 2 3 88	If all of these = 1 or 2 go to 6.1 or 6.3 for F to 7.1
5.2	Only if any of the above was 2 or 3: Je uliywajije ulipogata matatizo yaliyowazwa kapa jana? What did you do when you had the above problem? (please do not prompt!)	Seek help at traditional healer / Use home remedy Seek help at government health institution / Seek help at private health institution Buy drugs at pharmacy Do nothing Other Refused / Don't know	1 2 3 4 5 6 7 88	

Menses and Pregnancy (females only, for males continue with Q. 7.1)

6.1	Kwa sasa unachapata siku zako za mwezi? Do you presently have your period?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	-7.1 -6.2 -6.2
6.2	Mara ya mwiticho kupata siku zako ilikuwa lini? When was your last monthly period? (Enter 99 for any date not certain)	Siku / Day: [] Mwezi / Month: [] Mwaka / Year: []	

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 4 of 9

10 Verwendete Fragebögen

6.3	Unadhani ni unajamzito kwa sana? Do you think you are currently pregnant?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	-6.3 -7.1 -7.1
6.4	Unawahi kapata tatizo lolote tangu upate ujumbe? Have you had any complaints since you are pregnant?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	-6.4 -6.5 -6.5
6.5	Ni tatizo gani unategosta au unalo kati ya kaya yafuatayo: Which of the following complaints do you or did you have? If/for yes If/for no 99 for refused or don't know	Nausea / vomiting 1 Abdominal pain 2 Per vaginal bleeding 3 Per vaginal discharge 4 High blood pressure 5 Swelling of limbs 6 Vaginal yeast 7 Others 8	1 2 99 1 2 99 1 2 99 1 2 99 1 2 99 1 2 99 1 2 99
6.6	Kuna dawa yoyote unatumia tangu wawe ujumbe? Have you taken any medicine since you are pregnant?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	1 2 99
6.7	Je unahodhariri kiasi kwa muda? Do you regularly attend antenatal care?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	1 2 99

Physical Examination, General (males AND females)

7.1	Weight		kg
7.2	Height		cm
7.3	Mid Upper Arm Circumference		cm
7.4	Temperature (Ear)		°C
7.5	Systolic blood pressure		mm HG
7.6	Diastolic blood pressure		mm HG

General appearance

	1 = Absent	2 = Patho	3 = not examined	
8.1	Pallor / Anemia	1	2	3
8.2	Dehydration	1	2	3
8.3	Icterus	1	2	3
8.4	Cyanosis	1	2	3
8.5	Pain	1	2	3
8.6	Clubbing	1	2	3
8.7	Dryness	1	2	3
8.8	Mentally retarded	1	2	3
8.9	Deaf	1	2	3
8.10	Dumb	1	2	3
8.11	General appearance, other. Please specify:			

Eyes

	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined
--	------------	-----------	------------------

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 5 of 9

9.1	Any abnormalities of the eyes? (If patho please select diagnosis (-9.2), if normal please go to -10.1)	1 (-10.1)	2 (-9.2)	3 (-10.1)
9.2	Diagnosis: Eyes (please circle all that apply)	Conjunctivitis Corneal opacity / Scarring = 1 Cataract = 2 Trachoma = 3 Other diagnosis (please specify below) = 4 Specify other diagnosis: _____ = 5		

Oro-pharynx

	1 = Normal / absent	2 = Patho	3 = not examined	
10.1	Oral thrush / Candidiasis oral	1	2	3
10.2	Tonsillar inflamed / pus	1	2	3
10.3	Geographic	1	2	3
10.4	Angular cheilitis / stomatitis	1	2	3
10.5	Erythema or wart	1	2	3
10.6	Heavy leukoplakia oral of tongue	1	2	3
10.7	Kaposi carcinoma on hard palate	1	2	3
10.8	Periapical swelling / parodont	1	2	3
10.9	Thyroid gland enlarged - goitre	1	2	3
10.10	Thyroid gland normal on wallowing	1 (swallowing)	2 (not moving)	3
10.11	Ear infection / discharge	1	2	3
10.12	Other, specify:			

Respiratory System

	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined	
11.1	Chest deformations	1	2 (specify at 11.4)	3
11.2	Percussion	1	2 (specify at 11.5)	3
11.3	Auscultation	1	2 (specify at 11.5)	3
11.4	Chest deformation or other problem, please specify:			

Percussion, details. Only fill if above Percussion = 2 = Patho

	1 = Normal	2 = Mild Patho	3 = Severe Patho	4 = not examined	
11.5	Drill	1	2	3	4
11.6	Hyperresonant	1	2 = resonant	3 = hyperresonant	4
11.7	Other, specify:				

Auscultation, details. Only fill if above Auscultation=2=Patho

	1 = Absent	2 = Mild Patho	3 = Severe Patho	4 = not examined	
11.8	Snore	1	2	3	4
11.9	Crackles	1	2	3	4
11.10	Crupitation	1	2 = fine	3 = coarse	4
11.11	Wheezes or rhonchi	1	2	3	4
11.12	Fractal rales	1	2	3	4
11.13	Other, specify:				

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 6 of 9

Respiratory system, diagnosis

	1 = No	2 = Yes	3 = not examined	
11.14	Any diagnosis for respiratory system? (If yes, please select diagnosis (-11.15), if No = 12.1)	1 (-10.1)	2 (-9.15)	3 (-10.1)
11.15	Diagnosis (please circle all that apply)	Upper respiratory tract infection (Rhinitis, Laryngitis, Pharyngitis, Sinusitis, Tonsillitis) = 1 Lower respiratory tract infection (Pneumonia, Bronchiolitis, Bronchitis, Pulmonary Tb) = 2 Bronchial Asthma = 3 Pleuritis = 4 Other diagnosis (please specify below) = 5		
11.16	Specify other diagnosis:			

Breast. No examination, if participant reports problems please refer to health facility

	1 = No / absent	2 = Enlarged and solid	3 = Enlarged and soft	4 = Uncertain	5 = not examined	
12.1	Cervical	1	2	3	4	5
12.2	Supraclavicular	1	2	3	4	5
12.3	Axillary	1	2	3	4	5
12.4	Inguinal	1	2	3	4	5
12.5	Other, specify:					

Abdominal System

	1 = Normal / absent	2 = Patho	3 = not examined	
13.1	Je una matatizo yoyote ya tumbo kwa sana? Do you have any abdominal problems at present?	Yes 1 No 2 Refused / Don't know 99	-13.3 -14.1 -14.1	
13.2	Abdominal tenderness	1	2 (specify at 13.12)	3
13.3	Ascites	1	2	3
13.4	Distension	1	2	3
13.5	Palpable mass	1	2 (specify location at 13.12)	3
13.6	Bowel sounds	1 = normal	2 = absent	3
13.7	Right renal angle tenderness	1	2	3
13.8	Left renal angle tenderness	1	2	3
13.9	Other, specify:			

Pregnancy, Examination (pregnant women only, for all others go to >15.1)

	1 = Normal / absent	2 = Patho	3 = not examined	
14.1	Please specify height of fundus (99 if woman refused or not done for other reasons)	_____ weeks	Single 1 Multiple 2	
14.2	Is it a single or multiple pregnancy?	Can't tell / not examined	3	
14.3	Presentation?	Cephalic 1 Breech 2 Transverse 3 can't tell / not examined	4	
14.4	Are there any Oedemas? Please check and tick below:	1 = Normal / absent	2 = Patho	3 = not examined
14.5	Abdomen	1	2	3
14.6	Lower limbs	1	2	3
14.7	Upper limbs	1	2	3

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 7 of 9

	1	2	3	4	
14.8	Generalized	1	2	3	4

Uro-Genital System. No examination. Please ask participant whether he/she has any problems. If so please specify below (12.1) and refer participant to health facility, if not -13.1

15.1 Please specify uro-genital problem, if any:

Skin, General signs and symptoms

	1 = Normal / absent	2 = abnormal / patho	3 = not examined	
16.1	Any abnormalities of the skin? (If abnormal please select below, if normal -17.1)	1 (-17.1)	2 (select below)	3 (-17.1)
16.2	Herpes zoster scori	1	2	3
16.3	Herpes simplex	1	2	3
16.4	Impetigo	1	2	3
16.5	Tinea	1	2	3
16.6	Kaposi carcinoma	1	2	3
16.7	Scabies	1	2	3
16.8	Ulceration	1	2	3
16.9	Other, specify:			

Nervous System (only check for meningitis and cerebral malaria and report obvious other problems under "other")

	1 = Normal / absent	2 = Patho	3 = not examined	
17.1	Are there any signs of meningitis or cerebral malaria?	1	2	3
17.2	Other, specify:			

Karnofsky Scale: Please specify score for participant, even if no chronic disease is present!

	1 = 100%	2 = 90%	3 = 80%	4 = 70%	5 = 60%	6 = 50%	7 = 40%	8 = 30%	9 = 20%	10 = 10%	11 = 0%		
18.1	Normal, no complaint, no evidence of disease	100%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.2	Able to carry on normal activity, minor symptoms or signs of disease	90%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.3	Normal activities with effort, some symptoms or signs of disease	80%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.4	Care for self, unable to carry on normal activity or do active work	70%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.5	Requires occasional assistance but is able to care for most of needs	60%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.6	Requires considerable assistance and frequent medical care	50%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.7	Disabled, requires special medical care and assistance	40%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.8	Severely disabled, hospitalization indicated although death is not imminent	30%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.9	Very sick, hospitalization necessary	20%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.10	Morbund, fatal processes progressing rapidly	10%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.11	Dead	0%	Yes 1	No 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18.12	If Karnofsky score was below 100%: Is disability due to acute infectious or chronic disease?	Not applicable (Score=100%)	Acute infection 1	Chronic disease 2	Stor case 3	4	5	6	7	8	9	10	11

EMINI F3 Clinical Examination Adult Version: 1.0; 03.Jul.08

p. 8 of 9

10 Verwendete Fragebögen

2.15	Ni aina gani ya mnyoo ulitibiwa? / What type of worm treatment was this? (please prompt and circle)	Madawa kutoka vituo vya afya / Medicines from Health facility 1 Madawa kutoka duka la madawa / Medicines from Duka/ Pharmacy 2 Madawa kutoka wagaaga wa jiji / Medicines from Traditional Healer 3 Madawa yaliyotyalikwa nyumbani / Home remedy 4 Other 5 Refused/ Don't know 99	1 2 3 4 5 99
2.16	Je mtoto unatazama lolele in kinyifa kwa sasa? / Does the child have any health problems at present?	Refused/ Don't know 99	99

	Je kuanayakati mtoto unapata dalili zifuatazo? Je mtoto ana kwa sasa? / Does the child sometimes have any of the following symptoms? Does the child have them presently? (please circle all that apply, if child is too young to judge, please circle SS)	Hajawahi / Never	Mara-mara / Rarely	Mara kwa mara / Frequently	Kwa sasa / Presently	Amekata / Hajiji / Refused / don't know
3.1	Kuvutika / Vomiting	1	2	3	4	SS
3.2	Kutapika damu / Vomiting blood	1	2	3	4	SS
3.3	Kuharisha maji / Watery Diarrhoea	1	2	3	4	SS
3.4	Kuharisha damu / Blood Diarrhoea	1	2	3	4	SS
3.5	Choo chausi / Black stool	1	2	3	4	SS
3.6	Mauumu ya tumbo / Abdominal pain	1	2	3	4	SS
3.7	Mauumu wakati wa kuhajeka / Pain when urinating	1	2	3	4	SS
3.8	Kikocha / Blood in urine	1	2	3	4	SS
3.9	Kikohazi kikavu / Dry cough	1	2	3	4	SS
3.10	Kikohazi chenye mkohazi / Productive cough	1	2	3	4	SS
3.11	Kukocha damu / Coughing blood	1	2	3	4	SS
3.12	Kupumua kwa shida / Difficulty in breathing	1	2	3	4	SS
3.13	Mauumu ya kifua / Chest pain	1	2	3	4	SS
3.14	Utando mweupe mdomoni / Oral thrush	1	2	3	4	SS
3.15	Vidanda mdomoni / Mouth sores	1	2	3	4	SS
3.16	Kumosa kwa chida / Difficulty swallowing	1	2	3	4	SS
3.17	Homa / Fever	1	2	3	4	SS
3.18	Kutokwa jicho wima / Swelling at night	1	2	3	4	SS
3.19	Maujano / Jaundice	1	2	3	4	SS
3.20	Matozo ya ng'oni au vipale / Skin lesions or rashes	1	2	3	4	SS
3.21	Kuwashwa / Itching	1	2	3	4	SS
3.22	Kukosa hama ya kula / Loss of appetite/ poor eating	1	2	3	4	SS
3.23	Kupungua nzito / Loss of weight	1	2	3	4	SS
3.24	Gani au hita ya moto uligumi au mkonoani / Numbness or tingling in hands or feet	1	2	3	4	SS
3.25	Kuvimba kwa mstari / (Shimo/kwavyakwavya) / Lymph node swelling (cervical, axillary, inguinal)	1	2	3	4	SS

EMINI E3 Clinical Examination Child Version: 1.0; 03.Jul.08

p 3 of 7

7.1	Any abnormalities of the eye? (If patho please select diagnosis (-7.2) if normal = 1/1)	1 (-0.1)	2 (-7.2)	3 (-0.1)
7.2	Diagnosis: (please circle all that apply)	Conjunctivitis = 1 Corneal opacity = 1 Cataract = 2 Trachoma = 3 Other diagnosis (please specify below) = 4 Specify other diagnosis: = 5		

Oro-pharynx	1 = Normal	2 = absent	3 = Patho	4 = not examined	NA	
8.1	Oral thrush / Candidiasis oral	1	2	3	4	NA
8.2	Tonsillar inflamed / pus	1	2	3	4	NA
8.3	Angular cheilitis / stomatitis	1	2	3	4	NA
8.4	Periangular swelling / parotitis	1	2	3	4	NA
8.5	Thyroid gland enlarged / goitre	1	2	3	4	NA
8.6	Thyroid gland moving on swallowing	1 (moving)	2 (not moving)	3	4	NA
8.7	Eye infection / discharge	1	2	3	4	NA
8.8	Other, specify:					

Respiratory System	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined	
9.1	Chest deformations	2	3 (specify at 9.4)	4
9.2	Percussion	1	2 (specify at 9.5)	3
9.3	Auscultation	1	2 (specify at 9.5)	3
9.4	Chest deformations or other problems, please specify:			

Percussion details. Only All if above Percussion=2 = Patho	1 = Normal	2 = Mild Patho	3 = Severe Patho	4 = not examined	
9.5	Crack	1	2 = dull	3 = coarse dull	4
9.6	Hyperresonant	1	2 = resonant	3 = hyperresonant	4
9.7	Other, specify:				

Auscultation details. Only All if above Auscultation=3=Patho	1 = Absent	2 = Mild Patho	3 = Severe Patho	4 = not examined	
9.8	Crackles	1	2	3	4
9.9	Rales	1	2	3	4
9.10	Crurgitation	1	2 = fine	3 = coarse	4
9.11	Wheezes or rhonchi	1	2	3	4
9.12	Pleural rubs	1	2	3	4
9.13	Other, specify:				

Respiratory system, diagnosis	1 = No	2 = Yes	3 = not examined	
9.14	Any diagnosis for respiratory system? (If yes, please select diagnosis (9.15), if not = 10.1)	1	2	3

EMINI E3 Clinical Examination Child Version: 1.0; 03.Jul.08

p 5 of 7

3.26	Kuumwa kichwa / Headaches	1	2	3	4	SS
3.27	Kinungurungu / Diarrhoea	1	2	3	4	SS
3.28	Kukosa vitaji / Incontinence	1	2	3	4	SS
3.29	Dagedege / Constipation	1	2	3	4	SS

Hospitalisation	Je mtoto amewahi kulazwa kwa mojawapo ya sababu zifuatazo? / Was the child ever hospitalized for any of the following reasons? (Please prompt and circle)	Kuharika / Diarrhoea	1	2	3	4	SS
4.1	Je mtoto amewahi kulazwa kwa ajali au kulazwa / Accidents with hospitalisation (specify)	Malaria au homa / Malaria or Fever	1	2	3	4	SS
4.2	1 for yes 2 for no 99 for don't know	Kukohoa / Cough	1	2	3	4	SS
4.3	Je mtoto amewahi kuongezwa damu? / Did the child ever get a blood transfusion? (1 = Yes, 2 = No, 99 = don't know)	Upumaji / Operations (specify)	1	2	3	4	SS
4.4	Je mtoto amewahi kuongezwa maji? / Did the child ever get an intravenous infusion? (1 = Yes, 2 = No, 99 = don't know)	Hospitalisation for other reasons (specify)	1	2	3	4	SS

Physical Examination, General	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined	
5.1	Weight			
5.2	Height			
5.3	Head circumference			
5.4	Mid Upper Arm Circumference			
5.5	Temperature (Ear)			

General appearance	1 = Absent	2 = Patho	3 = not examined	
6.1	Palor / Anemia	1	2	3
6.2	Dehydration	1	2	3
6.3	Kwakaheko / Swelling	1	2	3
6.4	Maramu / Cachectic	1	2	3
6.5	Pain	1	2	3
6.6	Chubungo / Lymphadenopathy	1	2	3
6.7	Drumbe / Splenomegaly	1	2	3
6.8	Mentali retarda / Mental retardation	1	2	3
6.9	Denti / Dental	1	2	3
6.10	Dumb / Deaf	1	2	3
6.11	General appearance, other. Please specify:			

Eyes	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined
EMINI E3 Clinical Examination Child Version: 1.0; 03.Jul.08			

p 4 of 7

9.15	Diagnosis: (please circle all that apply)	Upper respiratory tract infection (Rhinitis, Laryngitis, Pharyngitis, Sinusitis, Tonsillitis)	= 1
		Lower respiratory tract infection (Pneumonia, Bronchitis, Bronchiolitis, Pulmonary Tb)	= 2
		Bronchial Asthma	= 3
		Pleuritis	= 4
		Other diagnosis (please specify below)	= 5
		Specify other diagnosis:	

Lymphatic System	1 = No / absent	2 = Enlarged and soft	3 = Enlarged and hard	4 = Uncertain	5 = not examined	
10.1	Cervical	1	2	3	4	5
10.2	Supraclavicular	1	2	3	4	5
10.3	Axillary	1	2	3	4	5
10.4	Inguinal	1	2	3	4	5
10.5	Other, specify:					

Abdominal System	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined	
11.1	Abdominal tenderness	1	2 (specify at 11.10)	3
11.2	Ascites	1	2	3
11.3	Distension	1	2	3
11.4	Palpable mass	1	2 (specify location at 11.10)	3
11.7	Bowel sounds	1 = normal	2 = absent	3 = increased
11.8	Right renal angle tenderness	1	2	3
11.9	Left renal angle tenderness	1	2	3
11.10	Other, specify:			

Uro-Genital System. Please ask respondent whether the child has got any problems and if the child is below 5 perform a short uro-genital examination. If problems are found or reported please specify below and refer participant to health facility for further care.	1 = Normal	2 = Patho	3 = not examined	
12.1	Please specify uro-genital problems if any:			

Skin, General signs and symptoms	1 = Normal / absent	2 = abnormal / patho	3 = not examined	
13.1	Any abnormalities of the skin? (If abnormal please select below. If normal = 1/1)	1 (-14.1)	2 (select below)	3 (-14.1)
13.2	Herpes zoster scars	1	2	3
13.3	Herpes zoster	1	2	3
13.4	Herpes simplex	1	2	3
13.5	Impetigo	1	2	3
13.6	Itch	1	2	3
13.7	Eczema	1	2	3
13.8	Scabies	1	2	3
13.9	Ulcerations	1	2	3
13.10	Specify other signs and symptoms:			

EMINI E3 Clinical Examination Child Version: 1.0; 03.Jul.08

p 6 of 7

10 Verwendete Fragebögen

Nervous System (only check for meningitis and report obvious other problems under "other")				
	1 = Normal / absent	2 = Patho	8 = not examined	
14.1	Are there any signs of meningitis or cerebral malaria?	1	2	8
14.2	Other, specify			

Karnofsky Scale (only for children >2): Please specify score for participant, even if no chronic disease is present!

18.1	Normal, no complaints, no evidence of disease	100%	Yes 1 No 2	18.1 18.2
18.2	Able to carry on normal activity, minor symptoms or signs of disease	90%	Yes 1 No 2	18.12 18.3
18.3	Normal activities with effort, some symptoms or signs of disease	80%	Yes 1 No 2	18.12 18.4
18.4	Cares for self, unable to carry on normal activity or do active work	70%	Yes 1 No 2	18.12 18.6
18.5	Requires occasional assistance but is able to care for most of needs	60%	Yes 1 No 2	18.12 18.7
18.6	Requires considerable assistance and frequent medical care	50%	Yes 1 No 2	18.12 18.8
18.7	Disabled, requires special medical care and assistance	40%	Yes 1 No 2	18.12 18.9
18.8	Severely disabled, hospitalization indicated although death is not imminent	30%	Yes 1 No 2	18.12 18.10
18.9	Very sick, hospitalization necessary	20%	Yes 1 No 2	18.12 18.11
18.10	Moribund, fatal processes progressing rapidly	10%	Yes 1 No 2	18.12
18.11	Dead	0%	Yes 1	
18.12	If Karnofsky score was below 100%: Is disability due to acute infection or chronic disease?	Not applicable (Scores 100%)	1 Acute infection 2 Chronic disease 3 Not sure 4	

19.1	Interviewer: Are any of the following symptoms present? Weight loss: Failure to thrive Night sweats Unexplained recurrent fever Fungus child does not play Cough > 3 weeks If so, please initiate sputum collection!		Yes 1 No 2	
19.2	Interviewer: Has the clinic card really been copied?		Yes 1 No clinic card not present 2	

End of the physical examination, please thank the participant and the respondent!

10.3 Haushaltsinterview

EMINI
Questionnaire Survey No. 3 – General Household Interview – One per household

1.1	Interviewer Name and ID number	
1.2	Date of Interview	Day: [] Month: [] Year: []
1.3	Household Number	[] [] [] [] [] [] [] []
1.4	Full Name of Respondent	
1.5	Respondent ID	[] [] [] [] [] [] [] []

General Information about the village. The following questions should be filled together with the head of household or his / her representative

2.1	Hali ya barabara kijijini taja? What type is the access road to the village?	Barabara ya Jamii / Pavd 1 Barabara ya vumbi / Dirt road 2 Njira ya angani / Path 3
2.2	Uhabari kwa kilomita Distance to (bus and walking time) from village centre	Afisa mwalimu / WEO km ___ / min ___ Shule ya msingi / Primary school km ___ / min ___ Kituo cha Afya / Health facility km ___ / min ___ Hospitali / Hospital km ___ / min ___
2.3	Utafiti wa jamii Public transport (please prompt)	Hakuna / None 1 Kila siku / Regular daily 2 Kwa wakati / Regular weekly 3 Mara chache / Occasionally 4
2.4	Siku za toko / gullio Regular market days (please prompt)	Hakuna / None 1 Kila siku / Daily 2 Kwa wakati / Weekly 3 Kila mwezi / Monthly 4
2.5	Umeme kijijini Electrification in the village (please prompt and circle all that apply)	Hakuna / None 1 Shirika la umeme / TANESCO 2 Mwanenyeji / Generator 3 Umeme wa agawa ya jaa / Solar 4 Umeme wa umami / Biogas 5 Vingineyo / Other 6

2.6	Chanzo cha maji kijijini Water source in the village (Please prompt and circle all that apply)	Maji ya bonko / Pipe tap 1 Vimba vya pumpa / Pump 2 Kijana / Well 3 Maji ya mvua yaliyovunwa / Harvesting rain water (cistern) 4 Dimbwi / Shallow pool 5 Maji Pwani 6 Chumchem / Spring 7 Sisani / Tank store 8 Ziwani / Lake (dam) 9 Vingineyo / Other 10
-----	---	---

Questions related to the household (to be assessed together with the household head or representative)

3.1	Wenye wanguji wanachika adani ya nyumba hiyo? How many people live permanently in your household? (including respondent)	Number []
3.2	Hii nyumba ni ya familia au mumpanga? Is this house owned by your family or rented?	Owned 1 Rented 2 Other 3 Don't know 99
3.3	Kuna nyumba ngapi kwavya kuya hiyo? How many houses belong to the household?	Number []
3.4	Nyumba kubwa inaonyuma vingapi? How many rooms are in the main house?	Number []
3.5	Kuta za nyumba kubwa zinajengewa na nini? What is the quality of the walls of the main house? (please prompt)	Mibao / Mibani / Majani / Wood / Bamboo and straw / grass 1 Matofali ya tupa / Sun dried mud bricks 2 Matofali ya kachumaa / Fine burnt mud bricks 3 Matofali ya maziwi / Concrete 4 Vingineyo / Other 5
3.6	Nyumba kubwa inasakwa pas la aina gani? What is the quality of the roof of the main house? (please prompt)	Mibao / Mibani / Majani / Wood / Bamboo and straw / grass 1 Bati / Iron sheet 2 Vijipa / Vines 3 Vingineyo / Other 4
3.7	Nyumba kubwa inamandirikwa ya aina gani? What is the quality of the windows of the main house? (please prompt)	Hakuna / None 1 Wazi kabisa / Completely open 2 Ya mibao / Wood slats 3 Ya vidio / Glass slats 4 Vingineyo / Other 5
3.8	Choo mwanachotumiwa ni cha aina gani? What kind of latrine belongs to the household?	None 1 Pit latrine simple 2 Pit latrine ventilated 3 Water flush toilet 4 Other 5

10 Verwendete Fragebögen

3.9	Maji ya kunywa unapata wapi? Where does your family usually get DRINKING water from? (Please prompt and circle all that apply)	Bomba / Pipe 1 Kitima cha pombe / Pump 2 Kitima cha kawaida / Well 3 Harvesting rain water (cistern) 4 Bwawa / Shallow pool 5 Mto / River 6 Chumchem / Spring 7 Boza / Tank lorry 8 Zirani / Lake (Dakawa) 9 Vinginevyo / Other 10	
		Fafanua / Specify:	
3.10	Alamaali ya nikihi unayotumia? What are the energy sources used in your household? (Please prompt and circle all that apply)	Hakuna / None 1 Shirika la umeme / TANESCO 2 Jenareta / Generator 3 Umeme wa jua / Solar 4 Umeme wa umuindi / Biogas 5 Kuni / Firewood 6 Mkasa / Charcoal 7 Mafuta ya taa / Kerosene 8 Batrii ya kuchaji / Recharged batteries 9 Kinayeti cha ng'ombe / Cow dung 10 Vinginevyo / Other 11	
		Fafanua / Specify:	
3.11	Mia mifugo ya aina gani? What kind of livestock does your family own? (Please prompt) (555 for more than 500, 999 for don't know. If unsure please estimate.)	Hakuna / None 1 Ng'ombe / Cows 2 Mbuvi / Goats 3 Kondoo / Sheep 4 Ngaruwa / Pigs 5 Kaku / Chicken 6	
		Idadi ya ng'ombe / Number of cows: [] [] [] [] Idadi ya mbuvi / Number of goats: [] [] [] [] Idadi ya kondoo / Number of sheep: [] [] [] [] Idadi ya ngaruwa / Number of pigs: [] [] [] [] Idadi ya kaku / Number of chickens: [] [] [] []	
3.12	Mia shari ngapi za shamba? How many acres of land do your family own? (000.0 for none, 333.3 for more than 300, 999.9 for don't know. If unsure please estimate.)	Namba / Number: [] [] [] []	

3.13	Mia vira vifanavyo? Does your family own any of the following items? (Please prompt and circle all) 1 Ndyo / for yes 2 Hapana / for no SS Amekataa au Hajaji / Refused or don't know	Saa ya ukutani / Mkononi / Clock / Watch 1 2 SS Radio / Radio 1 2 SS Luminga / Television 1 2 SS Simu ya mkono au ya mesani / Mobile / Telephone 1 2 SS Jaketa / Refrigerator 1 2 SS Mkokoteni / Hand Cart 1 2 SS Bainchi / Bicycle 1 2 SS Pikipiki / Motorcycle 1 2 SS Gari / Car 1 2 SS Akiba Bank / Savings account 1 2 SS	
3.14	Kipato cheo kwa mwazi uliopo ni kiasi cha shilingi ngapi? What was the total cash income of your household last month? (If unsure please estimate)	Last month TSh: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	Refused SS Don't know 99
3.15	Kipato cheo kwa mwaka uliopo ni kiasi cha shilingi ngapi? What was the total cash income of your household last year? (If unsure please estimate)	Last year TSh: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	Refused SS Don't know 99
3.16	Mwazi uliopo ulitumia kiasi cheote cho peo kwa matibabu kwa ajili ya mwanafamilia yoyote? Did you spend any money for health care for any of the family members last month?	Yes 1 -> 1.17 No 2 -> 1.18	Refused SS -> 1.18 Don't know 99 -> 1.18
3.17	Kadiria ni kiasi gani ulitumia mwazi uliopo kwa ajili ya afya kwa mwanafamilia yoyote? How much did you spend approximately for health last month for all the persons in the household? (If unsure please estimate)	Last month TSh: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	Refused SS Don't know 99
3.18	Mwazi uliopo ulitumia kiasi cheote cho peo kwa matibabu kwa ajili ya mwanafamilia yoyote? Did you spend any money for health care for any of the family members total last year?	Yes 1 -> 1.19 No 2 -> 1.20	Refused SS -> 1.20 Don't know 99 -> 1.20
3.19	Kadiria ni kiasi gani cho peo ulitumia mwazi uliopo kwa ajili ya afya kwa mwanafamilia yoyote? How much did you spend approximately for health totally last year for all the persons in the household? (If unsure please estimate)	Last year TSh: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	Refused SS Don't know 99
3.20	Je, weva na familia yako unatumia vyandarus? Do you have bed-nets in your house?	Yes 1 No 2 Refused SS End	End

EMINI E3 Household Interview General Form; Version: 1.0, 03.Jul.08

p.3 of 5

EMINI E3 Household Interview General Form; Version: 1.0, 03.Jul.08

p.4 of 5

3.21	Ulinunua chandarusu au ulipema msaada kutoka kwenye shirika? Did you buy the bed-nets or were they provided by any organization?	Bought by household 1 Donation from church 2 Donation from NGO 3 Other 4 Refused SS Don't know 99	
3.22	Je, una vyandarusu vya kutosha kwa kila mwanafamilia? Do you have enough bed-nets so that every family member can sleep under one?	Yes 1 No 2 Refused SS Don't know 99	
3.23	Je, huwa unafua vyandarusu vyako kwa kutumia dawa za kuulia wadudu/Ngao? Do you treat your bed-nets with insecticides /NGAO?	Never 1 Less than yearly 2 About once per year 3 More often than once per year 4 Refused/Don't know 99	
3.24	Tafadhali, ninaweza kuvikakiki vyandarusu vyako? Can I see your bed-nets please?	Yes 1 No 2 Not applicable (no bednets) 3	=End =End
3.25	Interviewer: Please estimate if bed-nets are intact without holes	Yes, all good condition 1 Some good, some poor condition 2 No, all poor condition with holes 3 Not applicable (no bednets) 4 Refused SS	

The Interview is over. Please thank the respondent!

EMINI E3 Household Interview General Form; Version: 1.0, 03.Jul.08

p.5 of 5