

Aus der Abteilung für
Helminthologie des
Bernhard-Nocht-Institutes
für Tropenmedizin in Hamburg
(Prof. Dr. B- Fleischer)

**Entwicklung verbesserter Methoden zum
Nukleinsäurenachweis von *Brugia malayi* und
Brugia timori, Erregern der Lymphatischen Filariasis
in Indonesien**



Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg
vorgelegt von

Simone Dorothea Klüber
aus Fulda

Hamburg, 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: _____

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende: _____

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: _____

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: _____

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der lymphatischen Filariasis	1
1.2 Morphologie und Entwicklungszyklus	2
1.3 Klinische Manifestation	3
1.3.1 Asymptomatische oder subklinische lymphatische Filariasis	5
1.3.2 Akute Manifestation der lymphatischen Filariasis	6
1.3.2.1 Akute Filarien-bedingte Adenolymphangitis	6
1.3.2.2 Akute Adenolymphangitis bedingt durch Superinfektionen	7
1.3.3 Symptomatische chronische Infektion	7
1.4 Diagnose der <i>B. malayi</i> Infektion	10
1.4.1 Parasitologische Nachweismethoden des Parasiten	10
1.4.2 Serodiagnostik	12
1.4.3 Molekulare Diagnostik	14
1.5 Bekämpfung der lymphatischen Filariasis	15
1.5.1 Chemotherapie der Filariasis	15
1.5.2 Hygienemaßnahmen	18
1.5.3 Kontrolle der Bekämpfungsprogramme	19
1.6 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Patientenpopulation	21
2.1.1 <i>B. malayi</i> Proben aus Sulawesi	21
2.1.2 Felduntersuchung auf Alor	22
2.1.2.1 Untersuchungsgebiet und Bevölkerung	22
2.1.2.2 Durchführung der Felduntersuchung	24
2.2 Konservierung der Blutproben	25
2.2.1 EDTA-Blut	25
2.2.2 Ermittlung der Mikrofilariendichte	25
2.2.3 Blood spots	25
2.3 Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1 Chemikalien und Bioreagenzien	26
2.3.2 DNA-Extraktion aus EDTA-Blutproben	28

2.3.3 DNA-Extraktion von Blood spots	28
2.3.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	28
2.3.3.2 Resin-Chelex 100-Extraktion	28
2.3.4 Klonierung einer internen DNA-Kontrolle für das <i>B. malayi</i> Hhal-Repeat..	29
2.3.5 Nachweis des Inserts mittels PCR	31
2.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	32
2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.3.7.1 <i>B. malayi</i> / <i>Plasmodium falciparum</i> Multiplex-PCR	33
2.3.8 PCR-ELISA	33
2.3.9 DNA Detection Test Strip des biotinylierten PCR-Produktes	34
2.3.10 Southern Blotting	35
2.3.11 Branched DNA – Southern-Blot Format	37
3 Ergebnisse	39
3.1 DNA Isolation von Blood spots	39
3.1.1 Chelex-Extraktion von Nachtblut	41
3.1.2 Chelex-Extraktion von Tagblut	42
3.2 PCR-Nachweis-Methoden	43
3.2.1 Nachweis von <i>B. timor</i>	43
3.2.2 <i>B. malayi</i> / <i>Plasmodium falciparum</i> Multiplex-PCR	45
3.2.3 Branched DNA	47
3.3 Nachweis von PCR-Produkten mit dem DNA Detection Test Strip	48
3.3.1 Sensitivität des Test Strip	48
3.3.2 Vergleich des Test Strip mit dem PCR-ELISA	50
3.3.3 DNA-Nachweis von PCR-Produkten der Tagblut-PCR mit Hilfe des Test Strip..	51
4 Diskussion	52
4.1 DNA Isolation von Blood spots	52
4.2 Modifizierte PCR-Nachweis-Methoden und branched DNA	59
4.3 DNA Detection Test Strip zum Nachweis amplifizierter PCR-Produkte	63
5 Zusammenfassung	67
6 Literaturverzeichnis	69
7 Anhang	80

Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata
ADL	Adenolymphangitis
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bdDNA	“branched” Desoxyribonukleinsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
DEA	Diethanolamine
DEC	Diethylcarbamazin
DIG	Digoxigenin
dNTP	2`- Desoxyribonukleotid-5`-Triphosphat
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionat]
EDTA	Ethylen-Dinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICT	Immunochemographisches Antigen Detektions Test
L3	dritte Larve der Filarien
LB	Luria brot
Mf	Mikrofilarien
NTT	Nusa Tenggara Timor (Provinz in Indonesien)
OD	Optischen Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate- butfered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QBC	Quantitative Blood Count
QC-PCR	Quantitative Count PCR
RBCL	Read Blood Cell Lysis
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	Medium für Bakterienkulturen
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (standard saline citrate)
TAE	Trisacetatessigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPE	Tropische Pulmonale Eosinophilie
Tris	Tris-[hydroximethyl]aminomethan
WHO	World Health Organisation
X-gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der lymphatischen Filariasis

Die lymphatische Filariasis ist eine tropische parasitäre Infektion. Die zu den Nematoden gehörenden humanpathogenen Filarien *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* und *Brugia timori* sind die Erreger dieser Erkrankung. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit ca. 128 Millionen Menschen mit diesen Erregern infiziert. Darüber hinaus sind insgesamt über 1 Milliarde Menschen dem Infektionsrisiko ausgesetzt [WHO, 1992; Addis, 1998]. Von den vorhandenen Infektionen sind 91% durch *W. bancrofti* verursacht. Während *W. bancrofti* in weiten Teilen Afrikas (50% aller *W. bancrofti* Infektionen), in Südostasien, auf den pazifischen Inseln und in Lateinamerika verbreitet ist, kommt *B. malayi* ausschließlich in den tropischen und subtropischen Gebieten Südostasiens bis China und Korea vor. In Indonesien, Malaysia, China, Indien und Sri Lanka sind insgesamt 13 Millionen Menschen mit *B. malayi* infiziert [WHO, 1992]. In einigen Gebieten Ost-Indonesiens wird die lymphatische Filariasis durch *B. timori* hervorgerufen [Purnomo et al., 1977]. Abbildung 1.1 zeigt die Verbreitung der lymphatischen Filariasis durch *Brugia*. In zahlreichen vorausgegangenen Studien wurden *W. bancrofti* und das durch sie hervorgerufene Krankheitsbild eingehend untersucht. Über die Biologie und den Pathomechanismus der Infektion mit *W. bancrofti* liegen detaillierte Kenntnisse vor. Für *W. bancrofti* Infektionen konnten sichere Nachweismethoden und Behandlungsstrategien entwickelt werden. Im Vergleich dazu gibt es bisher nur wenige Studien über *B. malayi* und *B. timori*. Insbesondere mangelt es an zuverlässigen, sensitiven und einfachen Methoden um eine Infektion mit diesen Erregern sicher nachweisen zu können. Daher beziehe ich mich im weiteren Verlauf dieser Arbeit vor allem auf die lymphatische Filariasis durch *Brugia*.

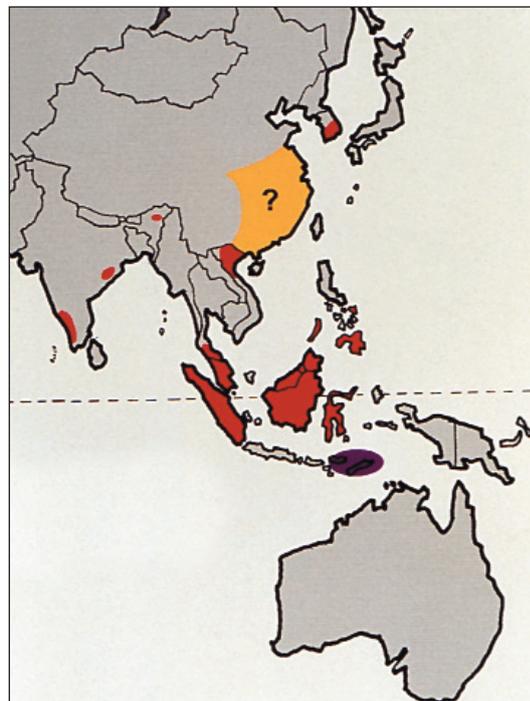


Abbildung 1.1:
Verbreitung der lymphatischen
Filariasis durch *B. malayi* und
B. timori

■ *Brugia malayi*
■ *Brugia timori*

1.2 Morphologie und Entwicklungszyklus

Die infektiösen Filarienlarven von *B. malayi* werden durch Mücken der Gattungen *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* (bei zoophilen Stämmen) und *Aedes* (unter Laborbedingungen) als Vektoren auf den Menschen übertragen. Die Mikrofilarien zirkulieren nächtlich periodisch (einige Stämme auch subperiodisch) im peripheren Blut, tagsüber befinden sie sich in den Gefäßen der Lunge. Diese Periodizität wird als Anpassung an die Stechaktivitäten der Überträger angesehen [Partono and Purmono, 1987].

Die weiblichen, fadenförmigen, geschlechtsreifen Weibchen von *Brugia* erreichen bis zu 8 cm, die Männchen etwa 3 cm Länge. Mit Hilfe sonographischer Untersuchungen konnten adulte Filarien von *W. bancrofti* in Lymphgefäßen nachgewiesen werden [Amaral et al., 1994]. In Anlehnung an diese Lokalisation wird angenommen, daß sich die adulten Filarien von *Brugia* ebenfalls im Bindegewebe, in den Lymphgefäßen und in den Sinus der Lymphknoten aufhalten. Vor allem im Bereich des Beckens und der unteren Extremität, wo beide Geschlechter knäuelartig zusammen liegen. Die Weibchen geben im Laufe ihres Lebens ca. 10 Millionen Larven ab, die von ihrer Eihülle, der Scheide, umgeben sind. Durch einen Streckungsprozeß, bei dem die Larven in den Eihüllen verbleiben, entstehen die gescheideten Mikrofilarien (Mf).

Zur weiteren Entwicklung müssen die Mikrofilarien von empfänglichen Mückenarten aufgenommen werden. Die Larven durchbohren die Magenwand der Mücken und wandern in die Thoraxmuskulatur ein. Während einer Entwicklungsdauer von etwa 10 – 14 Tagen reifen sie dort nach einem relativ kurzen wurstförmigen Stadium ("sausage stage") zur infektiösen Form heran. Dabei häuten sie sich zweimal zur 2. Larve und zur 3. Larve (L3), wachsen heran und wandern in die Scheide des Stechrüssels der Mücken, von wo aus sie als infektiöse L3 beim folgenden Saugakt auf den Menschen als Endwirt übertragen werden. Dabei verlassen jeweils 1 – 10 L3 den Rüssel, werden auf der Haut abgesetzt und dringen aktiv in den Stichkanal ein. Nun erfolgt nach wenigen Tagen die Häutung zu den 4. Larven. Diese reifen nach einer weiteren Häutung zu den adulten Würmern heran und die Weibchen produzieren die ersten Mikrofilarien. Die Präpatenzzeit von *B. malayi* beträgt etwa 3 Monate, die von *B. timori* etwas länger.

1.3 Klinische Manifestationen

Die klinischen Manifestationen der lymphatischen Filariasis sind multifaktoriell bedingt. Für die Pathogenese der Erkrankung spielen die lebenden adulten Würmer, die durch deren Tod hervorgerufenen inflammatorischen Reaktionen, die Reaktionslage des Wirtsorganismus, die Expositionsdauer, die Lokalisation der Filarien, aber vor allem auch sekundäre bakterielle Infektionen eine zentrale Rolle und beeinflussen den Krankheitsverlauf [Dreyer et al., 2000]. Bei der Erkrankung handelt es sich um einen voranschreitenden Prozeß, welcher jedoch keinen starren linearen Verlauf aufweist. Auch besteht keine unmittelbare Korrelation zwischen Mikrofilariämie und den bestehenden Läsionen [Michael et al., 1994].

Die klinischen Manifestationen weisen ein breites Spektrum von Krankheitsbildern auf. Im Vordergrund steht die durch die adulten Würmer hervorgerufene Reaktion des lymphatischen Systems, die zu Lymphadenitis und Lymphangitis führen kann. Bedingt durch die lange Lebensdauer der Filarien von durchschnittlich 4 – 6 Jahren oder länger entstehen in der Regel chronische Erkrankungen. Deren Hauptcharakteristika sind entsprechend der spezifischen Lokalisation der Filarien die Elephantiasis der Unterschenkel und Unterarme sowie die tropische pulmonale eosinophilie (TPE).

Im Gegensatz zu *W. bancrofti* Infektionen kommen genitale Manifestationen wie Hydrozele und Elephantiasis des Skrotums (Abbildung 1.2) bei Infektionen mit *B. malayi* und *B. timori* nicht vor [Partono, 1987].



Abbildung 1.2:
Genitale Manifestation der lymphatischen Filariasis durch *W. bancrofti* bei einem 37 Jahre alten Mann auf Alor (Indonesien)

Bewohner in endemischen Gebieten reagieren trotz ähnlicher Exposition auf eine Filarieninfektion immunologisch und klinisch sehr unterschiedlich. Die klinischen Manifestationen korrelieren nicht mit der Mikrofilariendichte, sondern reflektieren die individuelle Reaktionslage. Vor allem aber sind sie das Ergebnis der jahre- oder jahrzehntelangen Infektion und Auseinandersetzung zwischen Parasit und Wirt. Klinisch und immunologisch können mehrere Stadien, Reaktionstypen und Manifestationen voneinander abgegrenzt werden.

1.3.1 Asymptomatische oder subklinische lymphatische Filariasis

Einige Patienten im subklinischen Stadium weisen über Jahre Mikrofilarien auf, zeigen aber trotz dieser generalisierten Infektion kaum pathologische Veränderungen. Immunologisch reagieren diese Patienten relativ hyporeaktiv auf Filarien Antigene. Diagnostisch können bei ihnen sowohl Mf als auch Filarien Antigene nachgewiesen werden (patente Infektion).

Ein anderer Teil der über lange Zeit exponierten Bevölkerung in endemischen Gebieten zeigt weder eine klinische Manifestation, noch können Mikrofilarien nachgewiesen werden. Einige dieser Patienten besitzen heranwachsende Würmer (präpatente Infektion), andere wiederum haben gleichgeschlechtliche adult Würmer oder infertile adulte Würmer (nicht patente Infektion). Diagnostisch können bei diesen Personen keine Mikrofilarien nachgewiesen werden, obwohl sie über Filarien Antigene verfügen. Dies trifft auch für jene Personen zu, die weder klinische Manifestationen noch adulte Filarien aufweisen, jedoch aufgrund einer zurückliegenden Infektion serologisch positiv sind (postpatente Infektion).

Patienten im asymptomatischen Stadium haben keine Symptome der lymphatischen Filariasis. Sie besitzen jedoch zumeist beginnende Lymphangiectasien und weisen somit bereits ein subklinisches Stadium der Erkrankung auf. Dies konnte anhand von Ultraschalluntersuchungen und mit Hilfe der Lymphszintigraphie bei Patienten mit *W. bancrofti* Infektionen gezeigt werden [Amaral et al., 1994; Freedman et al., 1994; Dissanyake et al., 1995]. Es ist davon auszugehen, daß sich diese Ergebnisse auf Infektionen mit *Brugia* übertragen lassen, wenn auch dort die Lokalisierung der adulten Würmer mittels Ultraschall bisher nicht möglich war [Shenoy et al., 2000].

1.3.2 Akute Manifestationen der lymphatischen Filariasis

Die akuten klinischen Symptome der lymphatischen Filariasis wie Lymphadenitis oder Lymphangitis können in allen Krankheitsstadien vorkommen. Sie treten in Intervallen unter Schüttelfrost, Fieber und anderen allgemeinen Symptomen auf. Im Bereich der Lymphknoten treten Verhärtungen auf, die sich auf die ganzen Gliedmaßen erstrecken können. Diese akuten klinischen Phasen können nur wenige Tage bis hin zu 4 – 6 Wochen andauern.

Früher wurde angenommen, daß die Filarien direkt für den Hauptteil der klinischen Symptome verantwortlich seien [WHO, 1985]. Es ist nun deutlich geworden, daß dies nur in relativ wenigen Fällen die tatsächliche Ursache darstellt. Vielmehr scheint ein Großteil der akuten Attacken sekundär durch bakterielle und fungale Superinfektionen hervorgerufen zu werden [Olszewski et al., 1993]. So konnte bei zahlreichen Patienten während akuter Attacken in der Gewebsflüssigkeit hohe Titer von Bakterien nachgewiesen werden. Auch zeigten diese Patienten positive Blutkulturen [Olszewski et al., 1977]. Demensprechend lassen sich zwei Arten der Adenolymphangitis unterscheiden.

1.3.2.1 Akute Filarien-bedingte Adenolymphangitis

Diese wird durch den Tod der adulten Würmer (spontan oder nach Chemotherapie) hervorgerufen. Zumeist handelt es sich um eine strangförmige Schwellung, bedingt durch retrograde Lymphangitis in der oberen oder unteren Extremität. Die Patienten leiden unter Schmerzen, während systemische Reaktionen gering und distale Ödeme selten sind [Pani et al., 1995].

1.3.2.2 Akute Adenolymphangitis bedingt durch Superinfektionen

Dies ist die häufigste Form der Adenolymphangitis. Ihr gehen häufig Traumen, Verbrennungen, Insektenstiche, Läsionen oder chemische Schädigungen im Bereich der Eintrittspforte (zumeist der Zehenzwischenräume) voraus [Dreyer et al., 1999]. Das klinische Bild beinhaltet hohes Fieber, Muskel- und Kopfschmerzen, sowie ödematös entzündliche Flecken. Gelegentlich treten auch Bläschen, Ulzera und Hyperpigmentierungen auf. Die innerhalb dieser fulminanten Episoden vorkommenden Fieberattacken und die Lymphadenitis klingen nach Bettruhe zumeist spontan wieder ab. Gleiches gilt für die sehr häufig vorkommenden akuten Lymphödeme. Diese können jedoch nach sich wiederholenden Attacken persistieren und zu chronischen Ödemen führen. Dabei scheint ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von akuten Attacken und dem Grad der Ausprägung des Lymphödemes zu bestehen [Olszewski et al., 1993; Pani et al., 1995].

1.3.3 Symptomatische chronische Infektion

Im symptomatischen chronischen Stadium zeigen die Patienten zahlreiche pathologische Veränderungen. Eine Schwellung der Extremitäten ist zumeist vorhanden. Dabei sind charakteristischerweise die Beine unterhalb des Knies und die Arme unterhalb des Ellenbogens betroffen. Diese Veränderungen treten häufig beidseits auf, sie können aber auch auf eine Seite beschränkt sein. Chronische Zeichen treten selten bei Patienten auf, die jünger als 15 Jahre sind. Auch ist insgesamt nur eine geringe Anzahl der Infizierten betroffen. Einwanderer aus nicht endemischen Gebieten scheinen im Gegensatz zur einheimischen Bevölkerung öfter und schneller (zum Teil in 1 – 2 Jahren) ein Lymphödem bzw. eine Elephantiasis zu entwickeln [Partono, 1987]. Diese Patienten weisen zumeist Mikrofilarien auf. Bei einer Reihe dieser Patientin handelt es sich jedoch um eine nicht mehr aktive Infektion (postpatente Infektion). Weder Mikrofilarien noch adulte Würmer können bei ihnen nachgewiesen werden, sie besitzen jedoch positive Filarien Antikörper.

Das Lymphödem läßt sich in mehrere Schweregrade einteilen. Eine Arbeitsgruppe der WHO empfahl 1985 die folgende Einteilung [WHO, 1985]:

- Grad 1:** geringes Ödem der Extremität, das durch Anheben des betroffenen Körperteils reversibel ist
- Grad 2:** nicht reversibles Ödem, normale Haut (Abbildung 1.3)
- Grad 3:** fulminantes, nicht reversibles Ödem der Extremität, verdickte Haut (Abbildung 1.4)
- Grad 4:** fulminantes, nicht reversibles Ödem mit fibrotischen und papulösen Hautveränderungen (Elephantiasis) (Abbildung 1.5)



1.3.



1.4.



1.5.

Abbildung 1.3: Lymphödem Grad 1 – 2 bei einer 29 Jahre alten Patientin aus einem für *B. timori* endemischen Gebiet auf der Insel Alor, Indonesien

Abbildung 1.4: Lymphödem Grad 3 bei einem 35 Jahre alten Mann auf Alor, Indonesien

Abbildung 1.5: Einseitige Elephantiasis des rechten Beines bei einem 34 Jahre alten Mann auf Alor, Indonesien

Lymphszintigraphisch konnte bei *W. bancrofti* gezeigt werden, daß ein Lymphödem nicht immer das Resultat einer Verlegung von Lymphwegen darstellt, sondern auch durch eine intensive Kollateralisierung hervorgerufen werden kann [Witte et al., 1993]. Hautveränderungen wie Verdickungen von Hautfalten, Hyperkeratose, Hypo- oder Hypertrichose, Pigmentveränderungen, chronische Ulzerationen sowie epidermale und subdermale Knotenbildung können alle bei chronischen Infektionen beobachtet werden (Abbildung 1.6) [Olzewski et al., 1993].



Abbildung 1.6: Hautveränderungen im Rahmen der Elephantiasis

1.4 Diagnose der *B. malayi* Infektion

Die klassische Diagnose der lymphatischen Filariasis beruht auf dem Nachweis von Mikrofilarien und erlaubt eine Differenzierung der Arten nach morphologischen Kriterien. Bei prä- oder postpatenten Infektionen, bei niedriger Mikrofilariendichte oder aufgrund des periodischen Auftretens der Mikrofilarien ist ein Nachweis jedoch oft nicht möglich. Die zahlreichen Versuche, anstelle der Parasiten deren Stoffwechselprodukte als zirkulierende Antigene im Blut, Urin oder Speichel mit Hilfe immunologischer Nachweisverfahren zu detektieren, erwiesen sich bei *Brugia* als nicht sensitiv und spezifisch genug, um sich in der Anwendung durchzusetzen. Die möglichen diagnostischen Verfahren können in drei Gruppen unterteilt werden.

1.4.1 Parasitologische Nachweismethoden des Parasiten

Die im Blut zirkulierenden Mikrofilarien lassen sich mit Hilfe verschiedener diagnostischer Verfahren nachweisen. Der direkte Nachweis von Mikrofilarien ist spezifisch, jedoch verfügt er nur über eine geringe Sensitivität. Er hat den Nachteil, daß er nur bei einer zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorhandenen Mikrofilarämie positiv ausfallen kann. Zudem gelingt es bei Patienten mit niedriger Mikrofilarienlast häufig nicht, diese im Blut nachzuweisen. Dementsprechend sollte die Entnahme von Blutproben mit dem Zeitpunkt der maximalen Mikrofilariendichte im Blut übereinstimmen. Bei periodischen *B. malayi* liegt dieses Maximum zwischen 22 Uhr abends und 2 Uhr nachts, in Übereinstimmung mit den nächtlichen Stechgewohnheiten der Überträgermücken [Partono and Purnomo, 1987]. Auch bei periodischen *B. timori* findet sich nachts die höchste Mikrofilarienkonzentration [Kanda et al., 1979]. Auch sollte Blut aus der Fingerbeere gesammelt werden, da die Konzentration von Mikrofilarien in kapillärem Blut höher ist als in venösem Blut [Eberhard et al., 1988].

Sowohl der Blutausstrich als auch der dicke Tropfen stellen eine einfach durchführbare Untersuchungsmethode dar. Ein Vorteil des Blutausstrichs mit anschließender Färbung ist, daß er einen Artnachweis ermöglicht. Da für dieses Nachweisverfahren jeweils nur ca. 20 µl Blut verwendet wird, resultiert jedoch eine geringe Sensitivität.

Denn somit sind Konzentrationen von mindestens 50 Mf pro ml theoretisch erforderlich, um mit Hilfe des Blutausstrich eine Mf nachweisen zu können. Auch der dicke Tropfen verfügt nur über eine geringe Sensitivität. Es werden ca. 50 µl Blut verwendet, so daß die Sensitivität bei etwa 20 Mf pro ml Blut liegt. Beide Techniken sind aufgrund der Verwendung von geringen Mengen an Kapillarblut einfach durchzuführen, und werden von den meisten Personen als Untersuchungsmethode akzeptiert (Vergleich dieser Methoden siehe Tabelle 1.1).

Mit Hilfe von Anreicherungsverfahren kann eine Steigerung der Sensitivität dieser beiden Methoden ermöglicht werden. In dem von Knott [1939] entwickelten Konzentrationsverfahren wird ein Milliliter venöses Blut mit 9 ml 2%iger Formaldehydlösung versetzt, zentrifugiert und anschließend das Sediment auf Mf untersucht. Bei einem großen Sediment ist die mikroskopische Beurteilung jedoch häufig schwierig. Daher wurde diese Methode weitgehend durch die von Bell [1967] erstmals beschriebene Membran-Filtration ersetzt. Bei dieser Methode wird 1 ml venöses Blut durch eine 3 MM 5 µm Polycarbonat-Membran filtriert. Nach Giemsa-färbung oder mit Hämatoxylin [Eberhard and Lammie, 1991] wird der Filter mikroskopisch beurteilt (Abbildung 1.7.). Die Sensitivität dieser beiden Verfahren kann auf 1 Mf / ml Blut gesteigert werden. Durch wiederholte Anwendungen oder größere Blutentnahmen kann diese noch weiter erhöht werden. Aufgrund des benötigten größeren Probenvolumens wird bei beiden Methoden jeweils venöses Blut benötigt. Dies bedingt eine aufwendige Blutentnahme, mit geringerer Akzeptanz bei den zu untersuchenden Personen.



Abbildung 1.7:
Mikrofilarie von *B. malayi* nach Filtration und Giemsa-färbung

Ein anderes Verfahren stellt die QBC-Technik da. Im “Quantitative Blood Count” (QBC) System werden Heparin, EDTA und Acridine-Orange dem Mikrohämatokrit-Röhrchen zugesetzt. Nach erfolgter Zentrifugation wird die Trennschicht des Puffers mit Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dort wird die Kern-DNA vom Acridine-Orange angefärbt, so daß die Mikrofilarien leicht identifiziert werden können [Bawden et al., 1994]. Während der Test schneller auszuführen ist als die konventionellen Blut-Ausstriche oder Konzentrationsverfahren, ist seine Sensitivität gering. Da maximal 50 µl Blut verwendet werden, liegt die Sensitivität bei 20 Mf / ml (1 Mf / 50 µl) [Freedman and Berry, 1992]. Die Notwendigkeit teurer Geräte sowie die schwierigere Identifikation des Parasiten stellen weitere Nachteile dieser Methode dar.

Tabelle 1.1: Vergleich der verschiedenen Verfahren zum parasitologischen Nachweis der Mikrofilarien

	Sensitivität (Mf/ml)	Probengröße	Bemerkung
Blutausstrich	50	20 µl Kapillarblut	Artnachweis möglich
Dicker Tropfen	20	50 µl Kapillarblut	Konzentration möglich
Filtration	1	1 ml venöses Blut	aufwendige Blutentnahme
QBC-Technik	20	50 µl venöses Blut	teure Diagnostik

1.4.2 Serodiagnostik

Die Entwicklung von serodiagnostischen Nachweisverfahren mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zur Routineanwendung hat sich als problematisch erwiesen [Ambroise-Thomas, 1974]. Für den Nachweis von Filarien-Antigen besteht das größte Problem in der geringen Spezifität. Für *W. bancrofti* steht bereits ein hochspezifischer und sensibler serodiagnostischer Test, der ICT Karten Test, zum Nachweis von zirkulierendem Antigen von adulten Würmern zur Verfügung [Weil et al., 1997]. Während dieser Test bereits umfangreich zur Diagnostik genutzt wird, ist ein entsprechendes Verfahren zum Nachweis von Antigenen für *B. malayi* oder *B. timori* derzeit nicht verfügbar.

Ein weiterer Ansatzpunkt bei der Entwicklung von serodiagnostischen Untersuchungen ist der Nachweis von Filarien-Antikörpern der Subklasse IgG4, die bei floriden Infektionen eine wichtige Rolle spielen [Ottesen et al., 1985]. In einer Studie konnte belegt werden, daß Untersuchungen auf das Vorhandensein von Filarien-IgG4-Antikörpern sich als genauso sensitiv erwiesen wie parasitologische Diagnostikmethoden. Ihre Sensitivität liegt bei 90 - 95 % [Chanteau et al., 1994a]. Durch ein von Ramah et al. [2001b] entwickeltes Verfahren ist es möglich, mit Hilfe eines rekombinanten Antigens von *B. malayi*, zirkulierende IgG4-Antikörper nachzuweisen. Nach ersten Untersuchungen verfügt dieses Verfahren über eine hohe Sensitivität und ausreichende Spezifität [Rahmah et al., 2001a, 2003; Fischer et al., 2003].

Doch auch der Nachweis von Filarien-Antikörpern beinhaltet zahlreiche Probleme. Es ist schwierig, zwischen einer vorangegangenen, einer bereits abklingenden und einer momentan aktiven Infektion zu unterscheiden. Zudem sind die meisten Bewohner endemischer Gebiete Filarien-Antikörper-positiv [Ottesen et al., 1982]. Dies kann auf vorausgegangene Infektionen oder auf eine Exposition ohne erfolgte Infektion zurückgeführt werden. Erhöhte Titer der IgG4-Subklasse sind jedoch vor allem als Zeichen einer aktiven Infektion anzusehen. Darüber hinaus können in Verlaufsstudien sinkende IgG4-Titer zur diagnostischen Beurteilung der Effizienz einer Chemotherapie herangezogen werden [Wamae et al., 1992]. Ein weiteres Problem besteht darin, daß bei Personen, die mit *W. bancrofti* infiziert sind, eine signifikante Kreuzreaktion beobachtet werden konnte [Ramah et al., 2001a, b; Fischer et al., 2003b]. Dies limitiert die Spezifität dieser serodiagnostischen Untersuchungen in Gegenden, wo Infektionen mit *W. bancrofti* koendemisch auftreten.

Trotz der genannten Schwierigkeiten haben serologische Untersuchungsmethoden einen definierten Platz innerhalb der Diagnostik, da ein negatives Untersuchungsergebnis eine vorangegangene oder aktive Infektion weitgehend ausschließt.

1.4.3 Molekulare Diagnostik

Die molekulare Diagnostik stellte ein weiteres direktes Nachweisverfahren für *Brugia* Infektionen dar. Sie basierte auf dem Nachweis von Parasiten-DNA. Für *B. malayi* konnte eine hochrepetitive nicht-kodierende Sequenz, das sogenannte Hhal-Repeat, identifiziert werden [McReynolds et al., 1986]. Dieses Tandem Repeat mit einer Länge von 322 bp ist in 30.000facher Kopie vorhanden und stellt insgesamt 10 % des gesamten *B. malayi* Genoms dar. Durch die Identifikation dieses spezifischen Repeats wurde die Entwicklung dieser molekularen Diagnostikmethode möglich. Mit Hilfe einer für die zu amplifizierende Sequenz spezifischen Oligonukleotid-Sonde kann Parasitenmaterial im Blut oder in den übertragenden Stechmücken nachgewiesen werden [Williams et al., 1988]. Unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte dadurch eine sensitive und spezifische Methode zur Diagnostik von *B. malayi* Infektionen entwickelt werden [Lizotte et al., 1994]. Diese Diagnostikmethode konnte mit Hilfe eines am 3'-Ende biotinylierten Primers und einer fluoreszein-markierten Sonde weiter verbessert werden [Fischer et al., 2000]. Dadurch wurde ein Nachweis von PCR-Produkten mittels ELISA ermöglicht. Zusätzlich kann die zu untersuchende DNA unter Verwendung einer internen Kontrolle quantifiziert werden. Insgesamt ist diese Methode sehr sensitiv für die Diagnose infizierter Patienten. Im Vergleich zu parasitologischen Methoden ist sie als äquivalent oder gar als sensitiver anzusehen [Williams et al., 1996]. Darüber hinaus gelang es mit Hilfe dieser Technik, bei manchen Personen verborgene Infektionen (Mf-negative Infektionen mit positivem Nachweis von zirkulierendem Antigen) mit *W. bancrofti* nachzuweisen [McCarthy et al., 1996]. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die aufwendige Diagnostik, die ein gut ausgestattetes Labor und das Vorhandensein von zahlreichen technischen Geräten erfordert. Die Untersuchung venösen Blutes auf Parasiten-DNA bedingt eine geringere Akzeptanz der zu untersuchenden Personen. Auch beinhaltet sie noch das Problem einer schwierigen Konservierung der Proben. Eine Ursache dieser problematischen Konservierung stellen u.a. die zumeist im Blut enthaltenen Nukleasen dar, welche die vorhandene DNA zerstören. Ein weiteres Problem bei der Amplifizierung von DNA-Sequenzen stellen Inhibitoren der PCR dar. In einer vorausgegangenen Studie konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Problematik minimiert werden kann. Unter Verwendung der internen Kontrolle ist der PCR-ELISA geeignet, eine Standardisierung der auf einer PCR basierenden Diagnostik zu ermöglichen [Fischer et al., 2000].

1.5 Bekämpfung der lymphatischen Filariasis

Nach Plänen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) soll die lymphatische Filariasis bis zum Jahre 2020 als Problem für die öffentliche Gesundheit eliminiert werden [Bebhani, 1998; Ottesen, 2000]. Dabei geht die International Task Force for Disease Eradication der WHO davon aus, daß die lymphatische Filariasis zu jenen Erkrankungen gehört, welche potentiell eliminiert und letztenlich sogar ausgerottet werden können [CDC, 1993]. Auch gibt es eine Anzahl von Ländern (Japan, Australien und Teile von China), in denen die lymphatische Filariasis bereits durch gezielte Programme eliminiert werden konnte. Die Strategie dieser Bekämpfungsprogramme basiert auf mehreren Komponenten: einer gegen Filarien wirksamen Chemotherapie, einer unterstützenden oder krankheitsspezifischen ärztlichen Hilfe und einer umfassenden Schulung und Beratung der Patienten, damit diese erkennen, wie wichtig es ist, eine gewissenhafte Hygiene einzuhalten und vorbeugende Maßnahmen zu treffen [Ottesen, 1994].

1.5.1 Chemotherapie der Filariasis

Schwerpunkt der Bekämpfungsprogramme ist heute die gemeindeweite Behandlung der Bevölkerung in endemischen Gebieten mit Diethylcarbamazin (DEC) oder Ivermectin in Kombination mit Albendazol [Addis et al., 1997; Shenoy et al., 1999]. Diese Medikamente besitzen vorwiegend mikrofilarizide Wirkung, nur DEC wirkt auch schwach makrofilarizid. Demzufolge werden nur die Mikrofilarien effektiv abgetötet, die meisten adulten Würmer hingegen bleiben weiterhin lebensfähig. Aus diesem Grunde müssen die Bekämpfungsprogramme, entsprechend der Lebensdauer der adulten Würmer (6 - 8 Jahre), jahrelang aufrecht erhalten werden.

Diethylcarbamazin (DEC)

DEC wird in einer Einmaldosis von 6 mg / kg verwendet. Es ist vor allem gegen Mikrofilarien, aber auch teilweise gegen die adulten Würmer von *B. malayi* sowie *W. bancrofti* wirksam. Aufgrund des verhältnismäßig schwachen makrofilariziden Effektes ist eine wiederholte Behandlung (mit einer einmaligen Dosis von 6 mg / kg) alle 6 – 12 Monate erforderlich. Das Blut wird normalerweise rasch frei von Mikrofilarien. Jedoch ist diese Elimination in einer kleinen Patientenpopulation, vornehmlich

einer mit hoher Filarien-Dichte, nicht vollständig [Kimura et al. 1985; Ottesen, 1985; Pani et al., 1991].

Als Nebenwirkungen treten Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Schwindel, Fieber, Hämaturie, gastrointestinale Beschwerden, sowie Adenitis und retrograde Lymphangitis auf. Ihr Ausmaß wird maßgeblich von der Anzahl der absterbenden Mf bestimmt. Diese Nebenwirkungen können lokalisiert (in Zusammenhang mit dem Tod adulter Würmer) oder systemisch (aufgrund des Absterbens der Mf) auftreten [Ottesen, 1985; Dreyer et al., 1994].

Da sich bei Patienten mit Onchozerkose die okuläre Manifestation verschlimmern kann [Bird et al., 1980] und bei Patienten mit *Loa* Infektionen über starke Nebenwirkungen, Enzephalitiden und auch bereits Todesfälle berichtet wurde [Carme et al., 1991], ist DEC in jenen Gegenden, in denen Loiasis oder Onchozerkose koendemisch auftreten (in weiten Teilen Afrikas) kontraindiziert. In diesen Gebieten wird Ivermectin als Standardtherapie verwendet.

Ivermectin

Ivermectin ist in einer Einzeldosis von 200 – 400 µg / kg als potentes mikrofilarizides Medikament dazu geeignet, die Konzentration von *W. bancrofti* und *B. malayi* Mf im peripheren Blut für 6 – 24 Monate zu unterdrücken [Eberhard et al., 1992]. Aufgrund seiner fehlenden makrofilariziden Wirkung [Dreyer et al., 1995] wird Ivermectin nicht als Standardtherapie von *B. malayi* Infektionen empfohlen. Seine systemischen Nebenwirkungen entsprechen denen von DEC [Addiss et al., 1993].

Albendazol

In hoher Dosierung scheint Albendazol einen schwach makrofilariziden Effekt gegen *W. bancrofti* zu besitzen [Jayakody et al., 1993]. Zudem konnte eine Langzeitreduktion der Mf-Dichte beobachtet werden, jedoch ohne signifikanten kurzfristigen Effekt auf die Mikrofilariämie. In Kombination mit Ivermectin führt Albendazol zu einer höheren Mf-Suppression als Ivermectin alleine [Ismail et al., 1998].

Keines dieser Medikamente wirkt einzeln effektiv gegen alle Formen der Infektion. Während DEC und Ivermectin vor allem mikrofilarizide Wirkung besitzen, verfügt Albendazol über einen leichten makrofilariziden Effekt. Somit hat sich eine Kombination einzelner Dosen Albendazol (400 µg / kg) und Ivermectin (200 – 400 µg / kg)

[Addiss et al., 1997] oder Albendazol mit DEC [Shenoy et al., 1999] über alle 6 – 12 Monate als effektiv erwiesen. Eine Kombination dieser Medikamente wirkt zudem einer möglichen Resistenzentstehung entgegen.

Antibiotika

Bereits 1975 konnten in einigen Filarienarten intrazelluläre gram-negative Bakterien nachgewiesen werden [McLaren et al., 1975]. Weitere Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, daß eine gegenseitige Interaktion zwischen den Endobakterien der Gattung *Wolbachia* und den Filariennematoden, im Sinne einer essentiellen Symbiose, besteht. Die Filarien benötigen diese Endobakterien für eine normale Fertilität und die Entwicklung der Würmer. Des weiteren stellt eine Endotoxin-ähnliche Aktivität der Endobakterien einen bedeutenden inflammatorischen Stimulus der Filarien dar. Auch wird vermutet, daß die Filarien von ihren symbiontischen Endobakterien vor einer möglichen Immunabwehr des Wirtsorganismus geschützt werden können [Taylor, 2002]. Es konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe einer Tetracyclin-Therapie die Endobakterien eliminiert werden, und darauffolgend eine Wachstumsretardierung und Infertilität bzw. verringerte Fertilität der Filarien resultiert [Hoerauf et al., 1999; Taylor and Hoerauf, 2001]. Diese Ergebnisse zeigen, daß Antibiotika als neue Strategie zur Behandlung von Endobakterien-enthaltenden Filarien herangezogen werden können, wodurch sowohl der Beginn als auch das Voranschreiten der Filariasis verhindert werden kann.

1.5.2 Hygienemaßnahmen

Im Rahmen der lymphatischen Filariasis sind sekundäre bakterielle Infektionen maßgeblich an dem Voranschreiten der Erkrankung und ihrem Übergang in ein chronisches Stadium beteiligt [Dreyer et al., 2000]. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte die Behandlungsweise verändert und verbessert werden. Während man bisher noch davon ausging, daß die chronische Form des Lymphödems irreversibel und damit einer erfolgreichen Behandlung nicht zugänglich sei, konnte nun gezeigt werden, daß bei vielen Patienten allein durch gründliche Hygienemaßnahmen und angemessene antibiotische Behandlung eine Verbesserung der Symptomatik möglich ist [Shenoy et al., 1995]. Ebenso läßt sich durch verbesserte Hygiene die Anzahl akuter Symptome bedeutend verringern. Daher werden die Patienten dazu angehalten, eine sorgfältige Fußhygiene einzuhalten (Abbildung 1.8). Vor allem die Zehenzwischenräume sollten gründlich mit Seife gereinigt werden. Unterstützend sollten noch krankengymnastische Maßnahmen hinzu kommen. Durch die häufige Hochlagerung des betroffenen Körperteils (vor allem nachts) kann das Lymphödem verringert und einer voranschreitenden Progredienz entgegengewirkt werden.



Abbildung 1.8: Hygieneschulung auf Alor: Waschen der Füße

1.5.3 Kontrolle der Bekämpfungsprogramme

Für die Überwachung und Entwicklung von Bekämpfungsprogrammen sind zuverlässige diagnostische Daten notwendig, um die Ausbreitung der Infektion und die Effizienz der Therapien beurteilen zu können. Dementsprechend sind sichere und gleichzeitig einfach praktikable Diagnostikmethoden erforderlich, was sich bisher als recht problematisch erwies. Zum einen sind viele der verwendeten Testmethoden sehr teuer und die Laboratorien zudem schlecht ausgerüstet. Auch ist die Infrastruktur in den endemischen Gebieten oft nur unzureichend bei verhältnismäßig weiten Anfahrtswegen und großen organisatorischen Problemen. Hinzu kommt ein Mangel an Ärzten und ausgebildeten medizinischen Fachkräften. Eine weitere Problematik ist die Gefahr der Übertragung von Krankheiten wie HIV, Hepatitis B und C. Bei Methoden die auf der Untersuchung von venösem Blut basieren ist diese Gefahr besonders erhöht. Nicht selten werden die relativ teuren Spritzen und Kanülen ausgekocht und wiederverwendet. Durch diese unzureichende Sterilisation und mangelnde Hygiene wird somit das Infektionsrisiko beträchtlich gesteigert.

Trotz all dieser Problematik sollte es möglich sein, sichere Methoden zum Nachweis von *B. malayi* und *B. timori* zu entwickeln, die diesen Ansprüchen gerecht werden. Denn auch in Zukunft müssen und werden weitere Kontrollprogramme mit dem Ziel der globalen Elimination der lymphatischen Filariasis in den endemischen Ländern folgen. Dadurch könnte die Übertragung der Infektion unterbrochen und das Leiden der Personen mit den chronischen Erkrankungen wie Lymphödem und Elephantiasis gelindert werden [Ottesen et al., 1997].

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von einfachen, sensitiven und kostengünstigen molekularbiologischen Nachweisverfahren für die DNA von *Brugia malayi* und *B. timori* im Blut, welches auch in Laboratorien endemischer Länder angewendet werden kann.

Zur Vereinfachung der Probensammlung und DNA-Extraktion wurde Blut auf Filterpapier konserviert, und eine neue Methode zur DNA-Aufbereitung mit einer Standardmethode (Phenol / Chloroform-Extraktion) verglichen. Es sollte untersucht werden, ob diese Methode geeignet ist, eine größere Anzahl von Proben von Patienten mit nur geringer Mf-Dichte zu untersuchen. Um Probleme, die bei der Sammlung von Blutproben bei Nacht entstehen, vermeiden zu können, sollte des weiteren untersucht werden, ob sich Filarien DNA auch im Tagblut, das auf Filterpapier gesammelt wurde, nachweisen läßt.

Es sollte untersucht werden, ob sich die Hhal-Sequenz von *B. timori* unter den gleichen Bedingungen wie das Hhal-Repeat von *B. malayi* amplifizieren läßt.

Da in Blutproben ebenso wie in den Überträgermücken auch Malariaerreger vorhanden sein können, sollten erste Untersuchungen zur Entwicklung einer *B. malayi*/*Plasmodium falciparum* Multiplex-PCR durchgeführt werden. Nachteile der PCR sind der hohe Aufwand an technischen Geräten und die Kontaminationsgefahr. Daher sollten nach einer möglichen Alternative für die PCR gesucht und Pilotuntersuchungen für einen "branched" DNA-Test durchgeführt werden.

Zur Vereinfachung des Nachweises von PCR-Produkten sollte der PCR-ELISA mit einer neuen und schnelleren Methode zum spezifischen Nachweis von PCR-Produkten, dem DNA Detection Test StripTM, verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenpopulation

2.1.1 *B. malayi* Proben aus Sulawesi

In mehreren Dörfern in Indonesien wurden Blutproben gesammelt, welche im Bernhard-Nocht-Institut (BNI) in Hamburg untersucht wurden. Die Dörfer Rogo, Mahoni und Mantikole liegen in Zentralsulawesi, die Dörfer Kulia und Sula Barana in Südsulawesi. Beide Gebiete sind endemisch für nächtlich periodische *B. malayi* [Partono and Purnomo, 1987]. Alle Einwohner, die älter als 5 Jahre waren und sich zur Teilnahme bereit erklärten, wurden in die Studie aufgenommen. Die jeweiligen Probanden wurden registriert, auf klinische Zeichen einer Filarieninfektion untersucht und anamnestisch über vorausgegangene klinische Symptome dieser Erkrankung befragt. Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl der Blutproben, die in den jeweiligen Dörfern gesammelt wurden.

Tabelle 2.1: Anzahl der untersuchten Blutproben von Einwohnern eines für *B. malayi* endemischen Gebietes in Sulawesi

Dörfer	Anzahl der Proben			
	Nachtblut	Mf positiv	Tagblut	Mf positiv
Rogo + Mahoni	42	36	–	–
Rogo + Mantikole	79	15	–	–
Kulia + Sula Barana	33	12	92	7
Gesamt	154	63	92	7

2.1.2 Felduntersuchung auf Alor

Die Felduntersuchung auf Alor fand in Zusammenarbeit mit der Universität Indonesien (Jakarta), der Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) und des Bernhard-Nocht-Institutes (Hamburg) im Rahmen des Programms zur Bekämpfung der lymphatischen Filariasis statt. Für mich bestand die Möglichkeit, an diesem Projekt mitzuarbeiten. Die Studie wurde vom ethischen Komitee der medizinischen Fakultät der Universität von Indonesien, Jakarta genehmigt.

2.1.2.1 Untersuchungsgebiet und Bevölkerung

Alor ist eine kleine Insel, die nördlich von Timor im östlichen Bereich der Provinz Nusa Tenggara Timur (NTT) in Indonesien liegt. Im Alor Distrikt, der die benachbarten Inseln Alor und Pantar umfaßt, leben insgesamt 160.000 Einwohner (100.000 auf Alor und 60.000 auf Pantar). Alor zählt zu den ärmsten Regionen Indonesiens. In den Bergregionen wird vor allem Reis angebaut. Im Küstenbereich leben die Bewohner hauptsächlich vom Fischfang. Neben der Malaria stellt die lymphatische Filariasis ein wichtiges Gesundheitsproblem auf Alor dar. Während in einigen Fischerdörfern der Küstenregion *W. bancrofti* identifiziert wurde, konnte in einigen Dörfern der Bergregionen, in denen Reis angebaut wird, *B. timori* nachgewiesen werden [Kanda et al., 1979; Supali et al., 2002b]. Für eine detaillierte Studie wurde Mainang, eines der für *B. timori* endemischen Bergdörfer mit viel Elephantiasis, ausgewählt (Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Patienten mit lymphatischer Filariasis in Mainang, einem Dorf auf Alor (Indonesien)

Mainang liegt in einem sumpfigen Tal in 1000 Meter Höhe im Nordwesten der Insel, 30 km von der Distrikthauptstadt Kalabahi entfernt. Das Dorf besitzt keinen eigentlichen Ortskern, sondern besteht aus drei jeweils sehr weitläufigen Ortsteilen (Welai Selatan, Malaiepa und Tominuku) und zählt insgesamt 1582 Einwohner. Es herrscht ein feuchtes Klima, und die Temperaturen schwanken zwischen 18°C nachts und 28-30°C am Tage. In der Umgebung von Mainang liegen zahlreiche Reisfelder (Abbildung 2.2), oft in unmittelbarer Nähe der Häuser. Einige Reisfelder liegen jedoch mehrere Kilometer entfernt. Dies führt dazu, daß viele Bauern direkt vor Ort in den Feldern übernachten. Während der letzten 10 Jahre fand in Mainang keine Behandlung der Filariasis statt. Lediglich einzelne Patienten erhielten im Jahre 1990 DEC.



Abbildung 2.2: Reisfelder in der Umgebung von Mainang. Brutgebiete der Überträgermücke *Anopheles barbirostris*.

2.1.2.2 Durchführung der Felduntersuchung

Um möglichst viele Personen in die Studie aufnehmen zu können, fand die Untersuchung der Bevölkerung im zentral gelegenen Gesundheitszentrum statt. Alle Einwohner, die älter als 5 Jahre alt waren, wurden gebeten, an der Studie teilzunehmen. Von den 1582 Bewohnern wurden insgesamt 586 Personen (37% der Population) untersucht [Supali et al., 2002b]. Jeder Teilnehmer wurde anhand eines standardisierten Fragebogens registriert und auf vorangegangene Symptome einer lymphatischen Filariasis und Malaria befragt. Nach einer kurzen klinischen Untersuchung wurde den Teilnehmern Blut entnommen. Am nächsten Morgen wurden noch einige der Teilnehmer zu einer zusätzlichen Entnahme von Tagblut einbestellt. Von diesen waren 97 zuvor im Nachtblut positiv, und 96 negativ getestet worden. Unter den negativen Personen befanden sich 13 Patienten mit Elephantiasis, die anderen 83 waren asymptomatisch. Im gleichen Zeitraum fand tagsüber eine medizinische Aufklärung der Bevölkerung sowie eine Anleitung zur entsprechenden Körperhygiene statt. Im Rahmen der Studie wurde den infizierten Patienten eine Behandlung mit einer Kombination aus einer Einzeldosis DEC (6 mg / kg Körpergewicht) und Albendazol (400 mg) angeboten [Supali et al., 2002a].

Tabelle 2.2: Anzahl der untersuchten Tagblutproben in Mainang

	Anzahl der untersuchten Tagblutproben	
	Mf positiv	Mf negativ
Nachtblut Mf positiv	48	49
Nachtblut Mf negativ	–	96

2.2 Konservierung der Blutproben

2.2.1 EDTA-Blut

Von jedem Teilnehmer wurden 10 ml venöses Blut in einem EDTA-haltigen Vacutainer (Becton Dickinson, Inc., Heidelberg, Deutschland) gesammelt, zunächst im Kühlschrank gelagert und anschließend eingefroren.

Nachtblut wurde zwischen 20.00 und 24.00 Uhr gesammelt, **Tagblut** zwischen 10 – 12 Uhr.

2.2.2 Ermittlung der Mikrofilariendichte

Das Blut wurde noch im Feld auf Mikrofilarien untersucht. Dazu wurde 1 ml venöses Blut mit 9 ml Wasser (in Flaschen abgefülltes Mineralwasser) gemischt und mit Hilfe einer 5 µm Filtermembran (Nucleopore, Pleasanton, CA) filtriert. Der Filter wurde anschließend dem Filterhalter entnommen, auf einen Objektträger gelegt, getrocknet, mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die gefärbten Präparate wurden nun bei 100facher Vergrößerung auf Mikrofilarien untersucht und vorhandene Mf wurden ausgezählt.

2.2.3 Blood spots¹

60 µl Blut wurden in Form von 4 Tropfen auf Whatman 3 MM Filterpapier aufgetropft, getrocknet, einzeln verpackt und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

¹ Der Einfachheit halber habe ich für den Sachverhalt Blutstropfen auf 3 MM Whatman Filterpapier zu sammeln und zu konservieren durchgängig die Bezeichnung "Blood spots" verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Die Substanzen und speziellen Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

<u>Biometra (Amresco), Göttingen, D:</u>	Formamid, Primer HhaI-F / HhaI-R und rPLU5 / rPLU6, DNA-Sonden <i>BmHhaI</i> / <i>BmC</i>
<u>Biomol, Hamburg, D:</u>	Phenol/Chloroform / Isoamylalkohol-Gemisch
<u>BioLabs, New England, Beverly, USA:</u>	RestriktionsenzymKit Bgl II
<u>BioRad, Richmond, USA:</u>	Sodiumdodecylsulfat (SDS), Resin-Chelex 100
<u>BNI Abt. Virologie, Hamburg, D:</u>	bDNA-Oligos
<u>Gibco, life technologies, Paisley, GB:</u>	PCR-Supremix
<u>Invitrogen, Leek, NL:</u>	TA-Cloning-Kit, SOC-Medium
<u>Labsystem, Helsinki, FL:</u>	Mikrotiterplatten
<u>Merck, Darmstadt, D:</u>	Anorganische Salze, Säuren, Basen und Puffersubstanzen, Giemsa-Lösung
<u>PeQLab, Erlangen, D:</u>	100bp DNA-Leiter, Blue/Orange 6x Loading Dye, dNTP's
<u>Roche, Mannheim, D:</u>	DNA Detection Test Strips™, terminale Transferase, Anti-Dig-Ap-Konjugat, Anti-Flourescien AP-konjugierter Antikörper, mit Digoxigenin (DIG) markierter Längenstandard VI
<u>Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D:</u>	Proteinase K, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Streptavidin, AP-Substrattabletten, Ethidiumbromid, N-Laurylsarcosin, Triton X-100, Tween 20, LB-Medium, Agar
<u>Qiagen, Hilden, D:</u>	HotStarTaq™ DNA Polymerase, QIAprep Spin Miniprep Kit

Alle verwendeten Oligonukleotide waren Auftragssynthesen und wurden HPLC-gereinigt ("PCR-Grade") bezogen. Die Nukleotidsequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Primer:

Primer	Länge	Sequenz	Referenz
HhaI-F	18 mer	5'GCGCATAAATTCATCAGC3'	Williams et al. 1988
HhaI-R	23 mer	5'GCGCAAAACTTAATTACAAAAGC3'	Williams et al. 1988
rPLU5	23 mer	5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG3'	Waters and McCuchan 1989
rPLU6	21 mer	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC3'	Waters and McCuchan 1989
M 13 F	16 mer	5'TCGTGACTGGGAAAAC3'	TA-Cloning Manual Invitrogen
M 13 R	17 mer	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	TA-Cloning Manual Invitrogen

Tabelle 2.4: Nukleotidsequenzen der verwendeten DNA-Sonden

Sonde	Länge	Sequenz
<i>Bm</i> -HhaI	25 mer	5'ACGTGAATTGTACCAGTGCTGGTCG3'
<i>Bm</i> -control	25 mer	5'TTACGTGCGCCCTTCGCTAGTCTCT3'
Preamplifier 1	110 mer	5'CCCCGCCCCGCCCCAGGCATAGGACCCGTGTCTTTTTTA GGCATAGGACCCGTGTCTTTTTTAGGCATAGGACCCGTGTC AGTCAGTCAGTCAGTGGATGGATGGATGGA3'
Preamplifier 2	110 mer	5'GGGGCGGGGCGGGGAGGCATAGGACCCGTGTCTTTTTTA GGCATAGGACCCGTGTCTTTTTTAGGCATAGGACCCGTGTC TTTTTTAGGCATAGGACCCGTGTCCGCGCG3'
Amplifier	24 mer	5'AAAAAAGACACGGGTCCTATGCCT3'
Capture 1	25 mer	5'GCGCATAAATTCATCAGCAAATA3'
Capture 2	25 mer	5'ÁTACGCTTTTGAATTAAGTTTTGC3'
Amplifying 1	58 mer	5'TCATTAGACAAGGATATTGGTTCTAT TCCATCCATCCATCCACTGACTGACTGACTGA3'
Amplifying 2	58 mer	5'ÁAGCTTATTTGAACCTAATTGACAT TCCATCCATCCATCCACTGACTGACTGACTGA3'
Amplifying 3	58 mer	5'ÁCGTGAATTGTACCAGTGCTGGTCGT TCCATCCATCCATCCACTGACTGACTGACTGA3'

Die DNA-Sonden *Bm*-HhaI und *Bm*-control [Williams et al., 1988] wurden für den PCR-ELISA bereits fluoreszein-markiert und für das Test-Strip-Verfahren DIG-markiert bezogen. Die für die branched DNA verwendeten Oligonukleotide wurden modifiziert nach Iqbal et al. [1999].

2.3.2 DNA-Extraktion aus EDTA-Blutproben

Die DNA-Extraktion wurde wie von Williams et al. [1996] beschrieben durchgeführt. Jeweils 100 µl EDTA-Blut wurden mit 500 µl TE-Puffer gemischt und anschließend zentrifugiert um ein Pellet, bestehend aus den vorhandenen Blutzellen und Mikrofilarien, zu erhalten. Das Pellet wurde mit 500 µl TE-Puffer gewaschen, in 500 µl RCLB-Puffer (red cell lysis buffer) resuspendiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die roten Blutzellen zu verdauen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Pellet erneut in RCLB-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl DSP-Puffer (versetzt mit Proteinase K und Tween 20) resuspendiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 56 °C um die Mikrofilarien zu lysieren und die enthaltene DNA freizugeben. Die Proteinase K wurde durch ein zehnmütiges Erhitzen der Proben bei 95 °C inaktiviert. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand in der PCR-Diagnostik verwendet.

2.3.3 DNA-Extraktion von Blood spots

2.3.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die in jeweils 2 Blood spots (ca. 30 µl Blut) enthaltene Parasiten DNA wurde in Anlehnung an die von Fischer et al. [1996] beschriebene Methode mit Hilfe von Phenol-Chloroform extrahiert. Anschließend erfolgte eine Konzentration der gereinigten DNA mit Hilfe einer Ethanol Fällung. Die konzentrierte und getrocknete DNA wurde in 30 µl TRIS-EDTA Puffer (0,5 M TRIS, 0,05 M EDTA) resuspendiert. Jeweils 1µl des Extraktes wurde in einer 50 µl PCR verwendet.

2.3.3.2 Resin-Chelex 100 Extraktion²

Die DNA-Aufbereitung mit Hilfe von Resin-Chelex 100 erfolgte wie von Klüber et al. [2001] beschrieben. Jeweils zwei Blood spots wurden mit 1 ml A. dest. versetzt. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 2 Minuten gemischt. Anschließend wurden die Proben bei maximaler Umdrehung 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Filterpapier im

² Diese Methode dient zur Aufbereitung von DNA und stellt im eigentlichen Sinne keine Extraktion dar. Aus praktischen Gründen habe ich jedoch durchgängig den Begriff "Extraktion" verwendet.

Reaktionsgefäß belassen wurde. Das Pellet wurde in 10 Volumenanteilen 5 % Chelex 100 resuspendiert. Nach 20 minütiger Inkubation bei 56 °C wurden die Proben kräftig gemischt und anschließend für 8 Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach nochmaligem kurzen Mischen wurden die Proben schließlich zwei Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert und jeweils 1 µl innerhalb einer 50 µl PCR verwendet.

2.3.4 Klonierung einer internen DNA-Kontrolle für das *B. malayi* Hhal-Repeat

TA Klonierung (Original TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) Ein PCR-Produkt der internen Kontrolle wurde von Dr. P. Fischer zur Verfügung gestellt und in den TA Vektor kloniert (Abbildung 2.3).

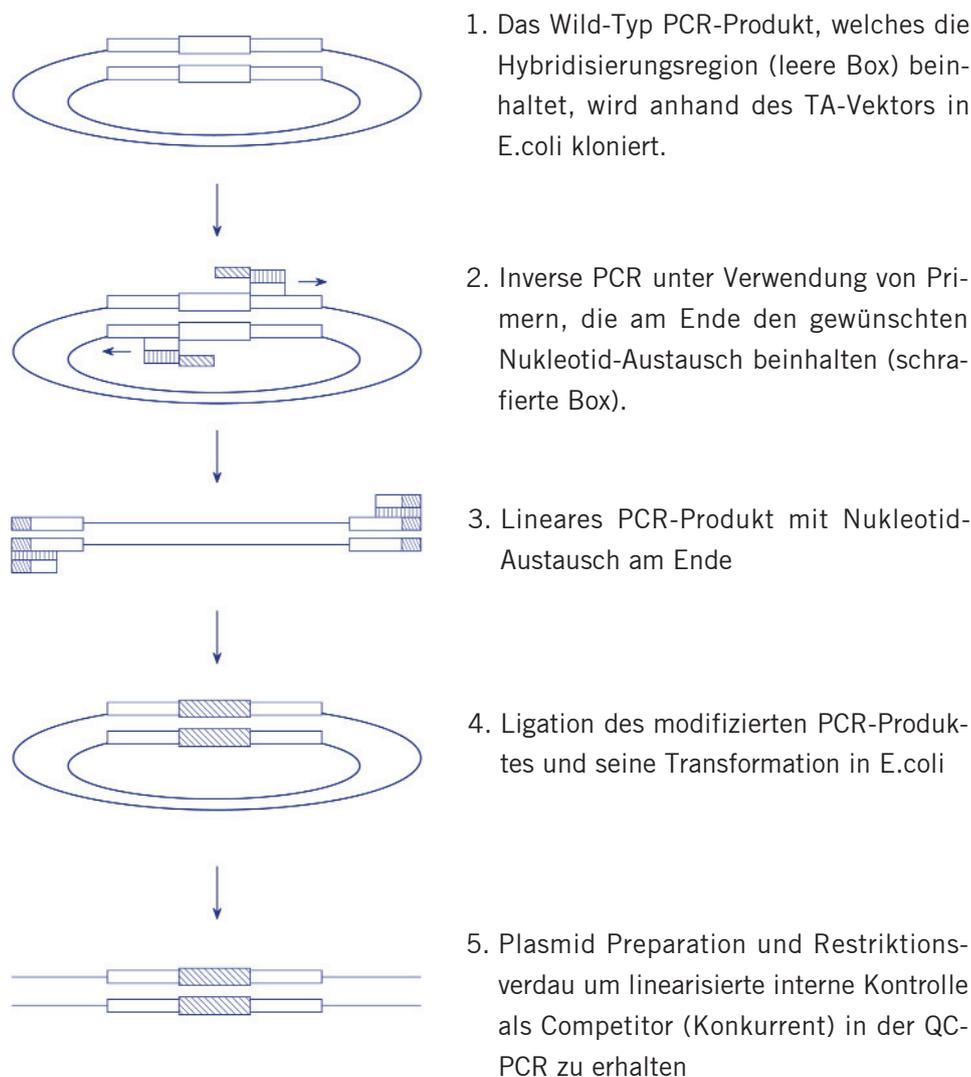


Abbildung 2.3: Konstruktion einer internen Kontrolle

Das PCR-Produkt, der Vektor und T4 Ligase wurden auf Eis gemischt (Tabelle 2.5). Anschließend wurde das Ligationsgemisch bei 14 °C über Nacht inkubiert, kurz zentrifugiert und dann auf Eis gelegt. Ein bis 2 µl des Ligationsgemisch wurden nun mit kompetenten, auf Eis aufgetauten *E. coli* Zellen (INVaF) vorsichtig gemischt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Danach wurden die Proben für 0,5 – 1 Minute einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und anschließend 2 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nun wurde 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben und 1 Stunde lang eine Schüttelinkubation bei 37 °C durchgeführt.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung diente eine blau-weiß Selektion. Dazu wurden jeweils 100 µl der Proben mit einem Drigalskispatel auf einer LB-Ampicillin/x-Gal-Platte verteilt. Die Platten wurden anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. X-gal diente als Substrat für das Lac-Operon und zur Erkennung der rekombinanten Kulturen. Wird das gewünschte PCR-Produkt in das Lac-Operon eingebaut, so unterbricht es dessen Leserahmen. Dadurch kann kein Genprodukt entstehen und die Kolonien bleiben weiß, da sie das Substrat X-gal nicht spalten können. Die nicht rekombinanten Kulturen hingegen bilden weiterhin das Genprodukt, so daß sie in der Lage sind, X-gal zu spalten. Sie färben sich dadurch blau an.

Tabelle 2.5: Ligation, verwendete Chemikalien (TA Cloning, Invitrogen)

4 µl	Aqua dest
1 µl	10x Ligations-Puffer
2 µl	PCR-Vektor
2 µl	PCR-Produkt (= Bm control)
1 µl	T4 Ligase

2.3.5 Nachweis des Inserts mittels PCR

Ein Teil von insgesamt fünf weißen Kulturen wurde in 20 µl H₂O lysiert und anschließend wurden jeweils 2 µl dieses Lysates in einer PCR verwendet (Tabelle 2.6). Die positiven Kulturen wurden nun über Nacht in 3 ml flüssigem LBA-Medium bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das mit Bakterien beimpfte Medium wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Plasmid entsprechend des QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolls (QIAGEN) aufgereinigt.

Tabelle 2.6 : PCR zum Nachweis positiver Kulturen

45 µl	Super mix (Gibco, life technologies)
1 µl	M13 F-Primer
1 µl	M13 R-Primer
2 µl	Probe

Unter der Verwendung des Restriktionsenzym Bgl II, welches das Plasmid an nur einer spezifischen Sequenz schneidet, wurde dieses von der vorliegenden Ringform in eine lineare Struktur überführt. Die Plasmid DNA und das Restriktionsenzym wurden gemischt (Tabelle 2.7). Der Ansatz wurde zunächst bei 37 °C für 2 Stunden verdaut und anschließend 15 Minuten lang bei 95 °C inaktiviert. Jeweils 2 µl davon wurden in einer Gel-Elektrophorese verwendet. Das Plasmid (die interne Kontrolle) wurde nun verdünnt und für alle weiteren Schritte in einer Konzentration von 1 pg / µl verwendet.

Tabelle 2.7: Restriktionsansatz

10,0 µg	Plasmid DNA*
10,0 µl	Bgl II Puffer
1,5 µl	Bgl II (15 U)
82,9 µl	Aqua dest.

* 5.6 µl der Probe 2; Endkonzentration = 100 ng / µl

2.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren wurden mit dem Photometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Umrechnung der optischen Dichte (OD) für die Bestimmung der Konzentration erfolgte nach der Formel:

$$\text{für DNA } 1,0 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird eine DNA-Sequenz in vitro spezifisch amplifiziert, um sie im Anschluß daran mit weiterführenden Methoden untersuchen zu können. Die PCR wurde wie von Fischer et al. [2000] beschrieben durchgeführt. Das 50 μl Reaktionsvolumen beinhaltete 1 μl der zu untersuchenden Proben DNA, 5 μl 10 x PCR Puffer PE, 75 mM MgCl_2 , 10 pm DNTP's, jeweils 20 pmol der beiden Primer (Hhal-F-Primer und Hhal-R-Primer-Bio), 1 pg interne Kontrolle und 1,25 Unit Taq Hot Star Polymerase. Die Proben-DNA wurde anschließend mit Hilfe des PE-Thermocyclers (PCR System 9700, Perkinson Elmer, Applied Biosystems Nienwerk, NL) anhand zyklischer Reaktionsschritte amplifiziert. Im ersten Schritt wurde die TA Hot Star Polymerase bei 95 °C 15 Minuten lang aktiviert, gefolgt von einer ersten Primer-Hybridisierung bei 55 °C für 2 Minuten. Anschließend folgten 35 Amplifikationszyklen, von denen jeder Zyklus drei unterschiedliche Schritte über jeweils 30 Sekunden enthielt (eine Replikation bei 72 °C; eine Hitzedenaturierung bei 94 °C und eine Primer-Hybridisierung bei 55 °C). Nach einer letzten Replikation über 5 Minuten bei 72 °C endete die PCR mit einem Abkühlen der Proben bei 4 °C.

Jeweils 5 μl des PCR-Produktes wurde mit 1 μl DNA Probenpuffer (6 x "Loading Dye") versetzt und die Banden in 1,5 %igem Agarose-Gel bei einer Spannung von 80 V in TAE aufgetrennt. Der 100 bp DNA-Leiter (PeQLab) wurde als Molekulargewichtsmarker verwendet. Nach 10minütiger Färbung in 0,0006% Ethidiumbromid-lösung und einer 20minütigen Wässerung wurde das Gel auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Video-Imagingsystems mit einer computergesteuerten Bildkamera und einem PC-Printer fotografiert.

2.3.7.1 *B. malayi* / *Plasmodium falciparum* Multiplex-PCR

Die *B. malayi* / *Plasmodium falciparum* Multiplex-PCR wurde entsprechend der oben beschriebenen PCR (siehe 2.3.7) durchgeführt. Diese wurde für den Nachweis von *P. falciparum* modifiziert. Dem 50 µl Reaktionsvolumen, wurde neben den üblichen Reagenzien noch jeweils 20 pmol der beiden *Plasmodien* spezifischen Primer (rPLU6 und rPLU5) zugesetzt. Die Reaktionsschritte entsprachen der herkömmlichen PCR-Methode

2.3.8 PCR-ELISA

Der PCR-ELISA wurde wie von Fischer et al. [2000] beschrieben durchgeführt. Er stellt eine sensitive DNA-Diagnostik-Methode dar, mit deren Hilfe die zu untersuchende DNA quantifiziert werden kann.

Jedes biotin-markierte PCR-Produkt wurde an 4 Vertiefungen der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten (Labsystem, Helsinki) gebunden. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit Fluoreszein-markierten DNA-Sonden. Es wurden jeweils 2 der Vertiefungen mit der Wildtyp spezifischen HhaI DNA-Sonde (*Bm*-HhaI) und 2 mit der internen Kontrolle spezifischen DNA-Sonde (*Bm*-con) hybridisiert. Jedes dieser Oligonukleotide war zuvor mit Hybridisierungspuffer zu einer Konzentration von 0,5 pg / µl verdünnt worden. Mit Hilfe des Anti-Fluoreszein-AP-konjugierten Antikörpers (Roche) erfolgte der Nachweis der jeweiligen Sonden. Nach Zugabe des alkalischen Phosphatase Substrates (Sigma-Aldrich) und einer Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C wurde die Extinktion mit einem ELISA-Reader (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) bei 405 nm gemessen. Die Intensität der Extinktion steht in direkter Relation zur Menge der an die fluoreszierenden Proben gebundenen biotinierten PCR-Produkte. Unter Verwendung der internen Kontrolle kann die Konzentration der Wildtyp-DNA berechnet werden.

2.3.9 DNA Detection Test Strip des biotinylierten PCR-Produktes

Das DNA Detection Test Strip Verfahren dient zur Vereinfachung der Diagnostik und wurde als Alternative zum ELISA-Nachweis von PCR-Produkten getestet [Klepp, 2000].

Hybridisierung

Die am 5`-Ende digoxygenierten DNA-Proben (Hhal-probe-DIG und Hhal-control-DIG) wurden in Hybridisierungs-Puffer auf eine Konzentration von 0,1 ng / μ l verdünnt. Nach erfolgter PCR-Amplifikation wurden 5 μ l der markierten Oligonukleotide zu 10 μ l biotinyliertem PCR-Produkt zugesetzt. Die Hybridisierungslösung wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und 30 Minuten bei 37 °C hybridisiert.

Analyse

Fünf Mikroliter der Hybridisierungslösung wurden auf die Probenauftragsfläche des DNA Detection Test Strips™ (Roche, Abbildung 2.4) pipetiert. Der untere Teil des Strips wurde nun für einige Sekunden in den Chromatographie-Puffer eingetaucht. Der Puffer, der entlang des Teststreifens lief, löste den an Gold-Partikel gebundenen monoklonalen anti-digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG-Gold Konjugat). Der Puffer und die Antikörper passierten nun die Probe. Das markierte PCR-Produkt wurde dabei vom Anti-DIG-Gold-Konjugat gebunden und lief dann weiter entlang des Teststreifens. Der Biotinmarker innerhalb dieses DNA-Anti-DIG-Gold-Komplexes wurde bei seiner Passage vom Streptavidin gebunden, das auf der Nitrozellulose-Membran fixiert war. Dabei verdichteten sich die konjugierten Gold-Partikel dieses Komplexes zu einer sichtbaren roten Linie. Als interne Kontrolle fungierte ein polyklonaler anti-Maus-Antikörper auf dem oberen Rand der Nitrozellulose-Membran. Er ergibt eine zweite rote (Kontroll-) Linie.

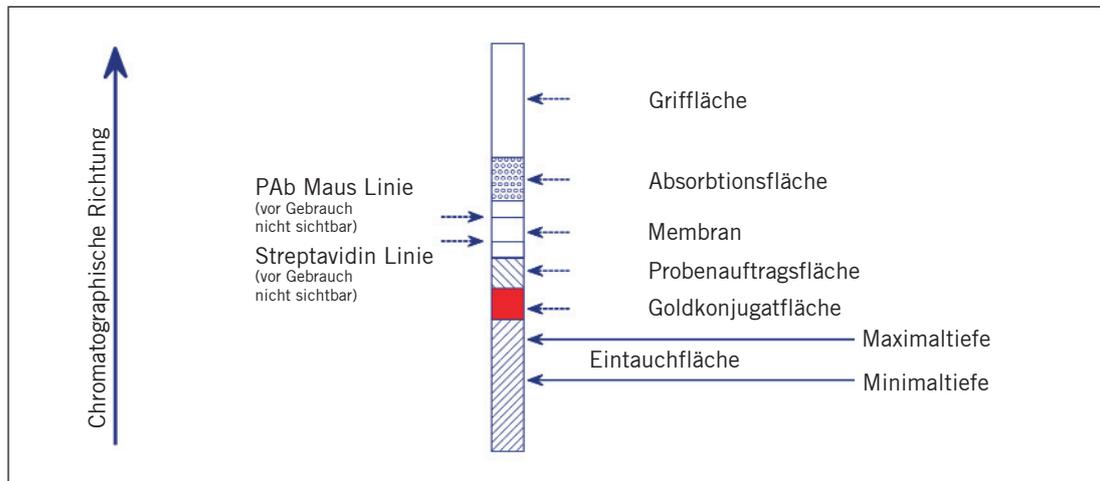


Abbildung 2.4: DNA-Detection-Test-Strip von Roche Diagnostik (schematische Darstellung)

2.3.10 Southern Blotting

Blotten

Das Agarosegel mit den aufgetrennten PCR-Produkten wurde zweimal 15 Minuten in Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer neutralisiert. Der Vakuumblotter (Biometra, Göttingen) wurde wie folgt bestückt: Über einen in 2 x SSC angefeuchteten 3 MM Whatmanfilter wurde eine mit A. dest. befeuchtete Nylon-Membran in Größe des Gels gelegt, danach die Gummidichtung des Vakuumblotters, auf welche das Gel aufgelegt wurde. Die Taschen des Gels wurden mit flüssiger 1,5 %iger Agarose aufgefüllt, das Pufferreservoir festgeklammert und nach dem Einstellen des Vakuums ca. 500 ml 20fachem SSC eingefüllt. Das Übertragen der DNA auf die Nylonmembran erfolgte über eine Stunde bei 150 mbar. Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde sie zwischen trockenen Whatman-Papieren 2 Stunden bei 80 °C getrocknet.

DNA-Hybridisierung

Die DNA-Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden und ihr Nachweis wurde nach dem Protokoll von Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Für die Hybridisierungs- und Waschschrte wurde überwiegend ein Hybridisierungssofen (Compact Line OV 4, Biometra, Göttingen) benutzt. Der Blot wurde zunächst für eine Stunde bei 42 °C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Für die eigentliche Hybridisierung wurden dann 200 pmol der DIG-markierten DNA-Sonde, *Bm*-HhaI-DIG, in 4 ml Hybridisierungslösung gelöst, 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis

abgekühlt. Danach wurde der Blot über Nacht bei 50 °C hybridisiert und anschließend jeweils zweimal 5 Minuten in Hybridisierungswaschlösung 1 und 2 bei 50 °C gewaschen.

DIG-Detektion

Die Membran wurde kurz in DIG-Waschpuffer gewaschen, anschließend 30 Minuten in DIG-Puffer 2 inkubiert. Danach wurde die Membran 30 Minuten in AK-Konjugat-Lösung (Anti-Dig-Ap-Konjugat 1:10000 in Puffer 2 verdünnt) inkubiert und zweimal 15 Minuten mit DIG-Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten in DIG-Puffer 3 und für 5 Minuten in Lumigen PPD-Voratslösung. Im Anschluß daran wurde die leicht feuchte Membran in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und 15 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Im letzten Schritt wurde die Membran für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur auf Röntgenfilm (Kodak X-Omat S) exponiert und der Film anschließend in der Dunkelkammer entwickelt. Die aufgrund der Substratspaltung durch das Anti-DIG / Alkalische-Phosphatase-Konjugat entstehende Chemolumineszenz führt zu einer entsprechenden Schwarzfärbung des Röntgenfilms.

2.3.11 Branched DNA – Southern-Blot-Format

Anhand der branched DNA (bDNA) wird die Quantifizierung vorhandener Nukleotid-säure ermöglicht. Sie beinhaltet eine Serie von Hybridisierungs-Reaktionen und ist im Gegensatz zur PCR ein Signalamplifikationsverfahren, bei dem kein Thermocycler notwendig ist. Die bDNA wurde in Anlehnung an die von Iqbal et al. [1999] beschriebene Methode durchgeführt (siehe Abbildung 2.5).

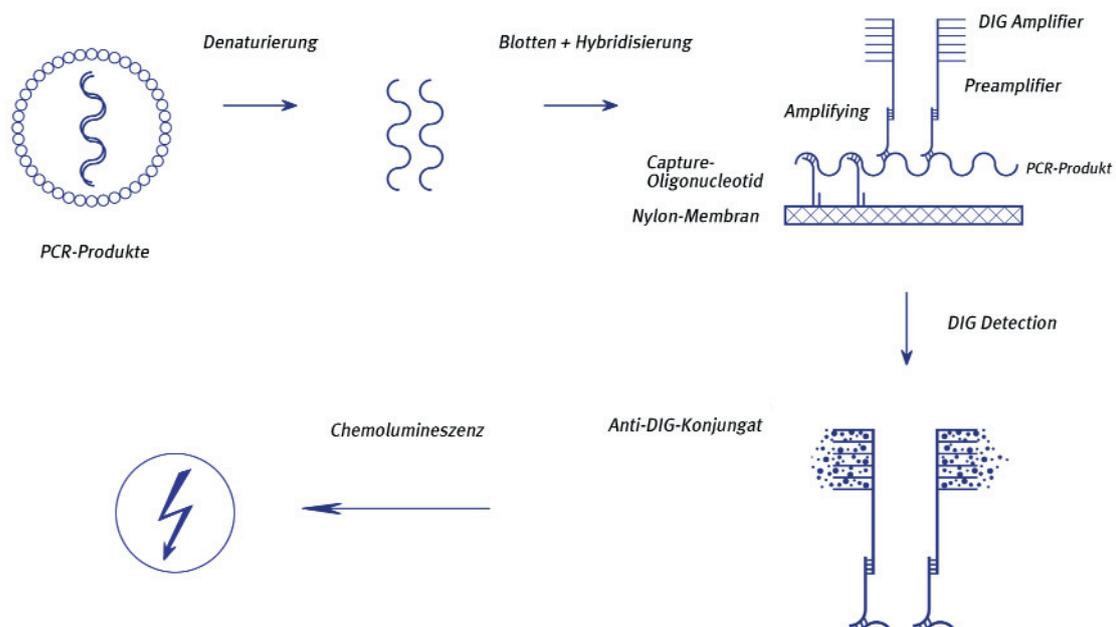


Abbildung 2.5: Schema der wesentlichen Schritte der branched DNA

Vorbereitung der bDNA

3'End-tailing mit Digoxigenin bzw. Biotin:

Das Amplifier-Oligonukleotid wurde am 3'-Ende mit Digoxigenin, die beiden Capture-Oligonukleotide wurden mit Biotin gekoppelt. Dazu wurden 1000 pmol der entsprechenden Oligonukleotide mit jeweils 20 µl Reaktionspuffer, 30 µl COCl₂ (1:5) und 4 µl terminaler Transferase (Roche) versetzt. Anschließend wurden 6,25 µl dig-dUTP bzw. 6,25 µl bio-16dUTP zugegeben und die Ansätze mit A. dest. auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt.

Blotten des Agarosegels

Das Agarosegel wurde zunächst im herkömmlichen Verfahren des Southern-Blotting geblottet (siehe Methode 2.3.10).

DNA-Hybridisierung

Der Blot wurde nun für mindestens 1 Stunde in (Prä-) Hybridisierungslösung bei 42 °C prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurden 4 ml Hybridisierungslösung mit jeweils 8 µl Amplifying 1-3 versetzt, kurz bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde nun abgegossen und der Blot 1 Stunde bei 42 °C in der angesetzten Hybridisierungslösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 10 µl der Preamplifier 1 und 2 mit 10 µl DIG Amplifier und 70 µl Hybridisierungslösung gemischt. Dieser Ansatz wurde dann 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, anschließend auf 42 °C abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Es folgte nun eine Inkubation über Nacht bei 42 °C. Die Hybridisierungslösung wurde nun abgegossen und der Blot jeweils 5 Minuten in 50 ml Wasch-Puffer 1 und 2 bei 42 °C gewaschen.

DIG-Detektion

Die weiteren Schritte sind nun wieder mit der ursprünglichen Methode des Southern-Blotting identisch (siehe Methode 2.3.10).

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Isolierung von Blood spots

Im ersten Schritt wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren für DNA aus Blood spots miteinander verglichen. Zunächst wurde nur Nachtblut verwendet, welches bereits mit Hilfe der Methode DNA-Extraktion aus EDTA-Blutproben auf *B. malayi* DNA untersucht worden war [Fischer et al., 2000]. Sämtliche positive Proben sowie drei negative Kontrollproben wurden als Blood spots konserviert und jeweils mit zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden bearbeitet. Zunächst erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform, und anschließend wurden die Proben mit Hilfe von Chelex 100 extrahiert. Jeweils 1 µl der Extrakte wurde in einer 50 µl PCR verwendet und die biotinylierten PCR-Produkte anschließend im PCR-ELISA, der unter Verwendung einer Fluoreszein-markierten DNA-Sonde eine Referenzmethode darstellt, untersucht. Die Ergebnisse der beiden Extraktionsverfahren wurden hinsichtlich ihrer Effektivität miteinander verglichen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Sensitivität des PCR-Nachweises von *B. malayi* DNA in Abhängigkeit verschiedener Extraktionsverfahren (Phenol/Chloroform verglichen mit Chelex). Die Mikrofilariendichte (Mf-Dichte) wurde durch Filtration von 1 ml Nachtblut bestimmt.

Mf Dichte pro ml	Kalkulierte Mf-Dichte pro 6µl Blut	Anzahl der untersuchten Proben	Anzahl der positiven Proben	
			Phenol/ Chloroform	Chelex
0	0	6*	-	-
1 - 30	0,1 - 1,8	11	3	6
31 - 90	1,9 - 5,4	11	10	11
91 - 150	5,5 - 9,0	5	5	5
151 - 1000	9,1 - 60,0	5	5	5
> 1000	> 60,0	4	4	4

* Drei dieser Mf-negativen Proben waren mit der EDTA-Blut-PCR positiv, während die anderen drei Proben negativ waren.

Mit der Chelex Methode konnte im Bereich 1 – 30 Mf pro ml insgesamt bei 6 von 11 Proben *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion war dies nur bei 3 Proben möglich. Von den insgesamt 36 Mf-positiven Blutproben waren 31 (86 %) mit Hilfe der Chelex-Methode positiv. Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion gelang dies nur bei 27 (75 %) dieser Proben. Bei einer Mf-Dichte von mehr als 90 Mf / ml bestand zwischen beiden Extraktionsmethoden kein Unterschied mehr, jeweils alle Mf-positiven Proben lieferten auch im PCR-ELISA ein positives Ergebnis.

Ein wichtiges Kriterium bei der Wahl von DNA-Extraktionsverfahren für die Diagnostik ist der Kostenfaktor. Deshalb wurden die Kosten beider Extraktionsverfahren miteinander verglichen. Die Materialkosten der Chelex-Extraktions-Methode betragen nur 1/10 des Phenol/Chloroform-Verfahrens (Tabelle 3.2). Der zeitliche Aufwand der Extraktion insgesamt 3 1/2 Stunden. Dem gegenüber konnte eine Extraktion mit Hilfe von Chelex in einem Drittel dieser Zeit durchgeführt werden.

Tabelle 3.2: Vergleich der Materialkosten in Euro für die unterschiedlichen Extraktionsverfahren

	Phenol/Chloroform		Chelex	
	Material	Kosten	Materia	Kosten
Röhrchen	3 Röhrchen	0,05 €	1 Röhrchen	0,015 €
Chemikalien	Phenol/Chloroform (500 µl)	0,10 €	Chelex 5% (250 µl)	< 0,005 €
	Net-Puffer, 20xSDS, Glykogen, NaAcetat, 0,1 TE	0,005 €		
	Ethano	0,005 €		
	Proteinase	0,035 €		
Gesamtkosten		0,19 €		< 0,02 €

Alle weiteren Extraktionen wurden von nun an mit Hilfe der Chelex-Methode durchgeführt, da diese hinsichtlich Sensitivität, Kosten und Zeitaufwand überlegen war.

3.1.1 Chelex-Extraktion von Nachtblut

Die Chelex-Extraktionsmethode wurde anhand eines vergrößerten Probenumfangs getestet. Hierzu wurde Nachtblut direkt auf Filterpapier gesammelt. Alle Teilnehmer wurden zusätzlich durch Filtration von 1 ml venösem Blut und mittels des dicken Tropfens (mikroskopische Beurteilung eines Blutropfens auf einem Objektträger) auf Mf untersucht. Nun erfolgte eine Chelex-DNA-Extraktion mit anschließendem PCR-ELISA (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Sensitivität der Chelex-Extraktion von Nachtblutproben aus einem für *B. malayi* endemischen Gebiet. Die Mikrofilarien-(Mf)Dichte wurde anhand der Filtration von 1ml Blut ermittelt.

Mf-Dichte pro ml Blut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 µl Blut	Anzahl der unter- suchten Proben	PCR Nachweis	
			positiv	negativ
0	0	85*	3**	82
1 - 30	0,1 - 1,8	14	7	7
31 - 90	1,9 - 5,4	5	5	–
91 - 150	5,5 - 9,0	3	3	–
151 - 1000	9,1 - 60,0	4	4	–
> 1000	> 60,0	1	1	–

* 4 der Mf-negativen Proben waren im Rahmen von Voruntersuchungen im dicken Tropfen (1-15 Mf) positiv.

** Die Proben waren auch im dicken Tropfen positiv.

Während im Bereich der höheren Mf-Dichten (> 30 Mf / ml) alle Proben im PCR-ELISA positiv waren, konnten im Bereich 1 – 30 Mf / ml (0,1 – 1,8 pro 60 µl) nur 7 (50 %) der positiven Proben als solche erkannt werden. Somit konnte von den insgesamt 27 Mf-positiven Blutproben bei 20 (74 %) *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. Von den mit Hilfe der Filtrationsmethode Mf-negativen Proben konnten bei 4 im dicken Tropfen Mf nachgewiesen werden. Drei dieser Proben (75 %) lieferten mit Hilfe des PCR-Nachweises ein positives Resultat. Alle 81 sowohl im dicken Tropfen als auch anhand der Filtration negativen Proben waren im PCR-Nachweis negativ.

3.1.2 Chelex-Extraktion von Tagblut

Um die Sensitivität der Chelex-Methode an Tagblut zu untersuchen wurden in einem für subperiodische *B. malayi* endemischen Gebiet Tagblutproben gesammelt. Auch hier wurde Kapillarblut direkt auf Filterpapier aufgetragen, dieses getrocknet und sauber verpackt nach Deutschland versandt. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Filtrationsmethode und mittels des dicken Tropfens die Mf-Dichte ermittelt. Nach erfolgreicher DNA-Extraktion wurden die Proben anhand des PCR-ELISA untersucht (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Sensitivität des PCR-Nachweis von *B. malayi* DNA in Tagblut. Die Mikrofilarien-(Mf)Dichte wurde anhand der Filtration von 1 ml Blut ermittelt.

Mf-Dichte pro ml Blut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 µl Blut	Anzahl der unter- suchten Proben	PCR Nachweis	
			positiv	negativ
0	0	85*	4**	81
1 - 9	0,1 - 0,5	4	3	1
10 - 50	0,6 - 3,0	2	2	–
< 50	< 3,0	1	1	–

* Jeweils 4 der Mf-negativen Proben waren im Rahmen der Voruntersuchungen im dicken Tropfen als positiv (1-15 Mf) befundet worden.

** Die Proben waren jeweils im dicken Tropfen positiv.

In einer der 4 Proben mit sehr geringer Mf-Dichte (1 – 9 Mf pro ml) konnte keine *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. In den höheren Bereichen konnten alle Mf-positiven Probe mit Hilfe des PCR-ELISA erkannt werden. Somit konnte von den insgesamt 7 Mf-positiven Blutproben (Nacht- und Tagblut) bei 6 (86 %) *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. Von den anhand der Filtrationsmethode Mf-negativen Proben konnte bei 4 Proben im dicken Tropfen Mf nachgewiesen werden. Alle diese 4 Proben stellten sich im PCR-Nachweis positiv dar. Alle 81 sowohl im dicken Tropfen als auch mit Hilfe der Filtration negativen Proben waren im ELISA negativ.

3.2 PCR-Nachweis-Methoden

In einem weiteren Schritt sollten die Möglichkeiten des PCR-Nachweises genauer untersucht werden, um herauszufinden, ob die für den Nachweis von *B. malayi* genutzten Methoden (siehe 3.1) auch zur Detektion von *B. timori* DNA verwendet werden können. Auch wurde ihre Anwendbarkeit im Rahmen einer *B. malayi* / *P. falciparum* Multiplex-PCR untersucht. Des weiteren sollte ein bDNA-Test als alternatives Nachweisverfahren für die PCR erprobt werden.

3.2.1 Nachweis von *B. timori*

Es wurde untersucht, ob sich mit Hilfe der *B. malayi* spezifischen Hhal-Primer und der entsprechenden Sonden auch das *B. timori* Hhal-Repeat nachweisen läßt. Diese DNA-Sonden eignen sich nicht zum Nachweis der zoophilen *B. pahangi*, was ein vereinfachtes Vektor-Screening ermöglichen würde [Williams et al., 1988]. Würde es jedoch gelingen, *B. timori* DNA zu detektieren, so könnte daraus geschlossen werden, daß dieser PCR-Nachweis spezifisch für humanpathogene *Brugia*-Arten (*B. malayi* und *B. timori*) ist. Für diese Fragestellung wurde Tag- und Nachtblut verwendet. Im Dorf Mainang (Alor, Indonesien), das endemisch für nächtlich periodische *B. timori* ist [Kanda et al., 1979], wurden im Rahmen einer Feldstudie Blutproben gesammelt. Zunächst wurden die Teilnehmer anhand der Filtration von 1 ml Nachtblut auf das Vorliegen einer *B. timori* Infektion untersucht. Im Anschluß daran wurden 97 Mf-positive sowie insgesamt 96 Mf-negative (davon 83 asymptomatische und 13 mit Elephantiasis) Teilnehmer zur Entnahme von Tagblut ausgewählt. Von jedem Teilnehmer wurden ca. 60 µl Kapillarblut auf Filterpapier aufgetragen, getrocknet und einzeln steril verpackt. Auch im Tagblut wurde die Mf-Dichte durch Filtration von 1 ml venösem Blut ermittelt. Die Blutproben (alle Tagblut- und 53 Nachtblutproben) wurden nun mittels Chelex extrahiert und jeweils 1 µl dieser Extraktion in einer 50 µl PCR verwendet. Die PCR sowie der folgende PCR-ELISA wurden unter Verwendung der Hhal-Oligonukleotide (Primer und DNA Sonde) durchgeführt. Die Ergebnisse der untersuchten Nachtblutproben wurden mit den Resultaten von *B. malayi* Blutproben verglichen (Tabelle 3.5)

Tabelle 3.5: Nachweis des *Brugia* Hhal-Repeat in Blutproben von Alor (*B. timori*) im Vergleich mit Blutproben aus Sulawesi (*B. malayi*), Indonesien. Nachweis der biotinylierten PCR-Produkte mit Hilfe von Test Strip und PCR-ELISA.

Mf-Dichte pro ml Blut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 µl Blut	<i>B. timori</i>		<i>B. malayi</i>	
		Anzahl der unter- suchten Proben	Anzahl der PCR posi- tiven Proben (in %)	Anzahl der unter- suchten Proben	Anzahl der PCR posi- tiven Proben (in %)
0	0	20	0 (0)	22	0 (0)
1 - 50	0,1 - 3,0	9	4 (44)	3	2 (66)
51 - 150	3,1 - 9,0	5	5 (100)	4	3 (75)
151 - 1000	9,1 - 60	13	13 (100)	14	14 (100)
> 1000	> 60	6	6 (100)	5	5 (100)

Insgesamt konnte in 28 (84 %) der Mf-positiven Proben das Hhal-Repeat nachgewiesen werden. Bei höheren Mf-Dichten (3,1 – 9,0 Mf pro 60 µl) konnte im Nachtblut in allen Proben *B. timori* DNA nachgewiesen werden. Im Bereich niedriger Mf-Dichten war dies jedoch nur bei 4 der insgesamt 9 Proben möglich. Alle Mf-negativen Proben lieferten auch im PCR-Nachweis ein negatives Ergebnis. Die Ergebnisse entsprachen weitgehend denen der untersuchten *B. malayi* Blutproben. Ab einer Mf-Dichte von mehr als 9 Mf pro 60 µl konnte in diesen das Hhal-Repeat mit Sicherheit nachgewiesen werden. Im Bereich niedrigerer Mf-Dichten war dies jedoch nur bei 2 von 3 bzw. bei 3 von 4 Proben möglich. Die Ergebnisse des PCR-Nachweises für Tagblutproben von *B. timori* sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt.

Tabelle 3.6: Nachweis des *B. timori* Hhal-Repeat. Alle Proben waren im Nachtblut anhand der Filtration von 1 ml Blut positiv.
Die aufgeführte Mf-Dichte wurde durch Filtration von Tagblut ermittelt.

Mf-Dichte pro ml Tagblut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 µl Blut	Anzahl der unter- suchten Proben	PCR Nachweis	
			positiv	negativ
0	0	49	4	45
1 - 9	0,1 - 0,6	29	4	25
10 - 50	0,6 - 3,0	16	8	8
> 50	> 3,0	3	2	1

Von den Proben, die im Tagblut Mf-negativ waren, konnte nur in 8 % (4 Proben) *B. timori* DNA nachgewiesen werden. Im Bereich 1 – 9 bzw. 10 – 50 Mf pro ml konnten 13 % (4 Proben) bzw. 50 % (8 Proben) der Infizierten erkannt werden. Zwei der drei Teilnehmer (67 %), die auch im Tagblut mehr als 50 Mf enthielten, lieferten im Test Strip ein positives Ergebnis. Alle im Nachtblut negativ getesteten Teilnehmer (asymptomatische und Patienten mit Elephantiasis) waren auch anhand des PCR-Nachweises negativ. Insgesamt konnte bei 29 % der Teilnehmer, die im Tagblut Mf enthielten, auch mittels PCR-Diagnostik eine Infektion mit *B. timori* nachgewiesen werden.

3.2.2 *B. malayi* / *Plasmodium falciparum* Multiplex-PCR

In zahlreichen Gebieten können *Brugia* und *P. falciparum* koendemisch auftreten. Auch sind diese beiden Infektionen anamnestisch oft schwer voneinander zu differenzieren, da ihre akuten Beschwerden oft sehr ähnlich verlaufen. Es ist oft schwierig, die Symptome einer akuten Malaria von denen einer akuten inflammatorischen Reaktion im Rahmen der Filariose zu unterscheiden. Denn wie die Malaria kann auch die lymphatische Filariasis akut mit hohem Fieber, dem sogenannten Filarien-fieber einher gehen. Daher wurde in weiteren Versuchen die Anwendbarkeit der PCR zum Nachweis von Koinfektionen mit *P. falciparum* getestet. Für die folgenden Versuche stand eine positive Blutprobe mit *P. falciparum* zur Verfügung. Die DNA dieser Probe wurde zunächst extrahiert und mit einer Plasmodium-spezifischen PCR

amplifiziert [Waters and McCuchan, 1989]. In Anlehnung an die Methode, Klonierung einer internen Kontrolle von *B. malayi* (siehe 2.3.4.), wurde das erhaltene PCR-Produkt nun anhand des Original TA Cloning Kit (Invitrogen) kloniert. Das Plasmid, welches das *Plasmodium* Insert enthielt, wurde nun jeweils in einer Konzentration von 6 µg / 60 µl mit *B. malayi* positivem bzw. negativem Blut (negativem Kontrollblut) gemischt. Die Proben wurden auf Filterpapier aufgetragen und anschließend anhand der Chelex-Methode extrahiert. In der darauffolgenden PCR wurden neben diesen Proben (*P. falciparum* DNA alleine und in Kombination mit *B. malayi* DNA) noch zwei Proben *B. malayi* DNA sowie eine negative Kontrolle mitgeführt. Innerhalb des Master-mix dieser PCR wurden gleichzeitig jeweils die beiden Primer für das Hhal-Repeat und die rPLU-Sequenz verwendet (Abbildung 3.1).

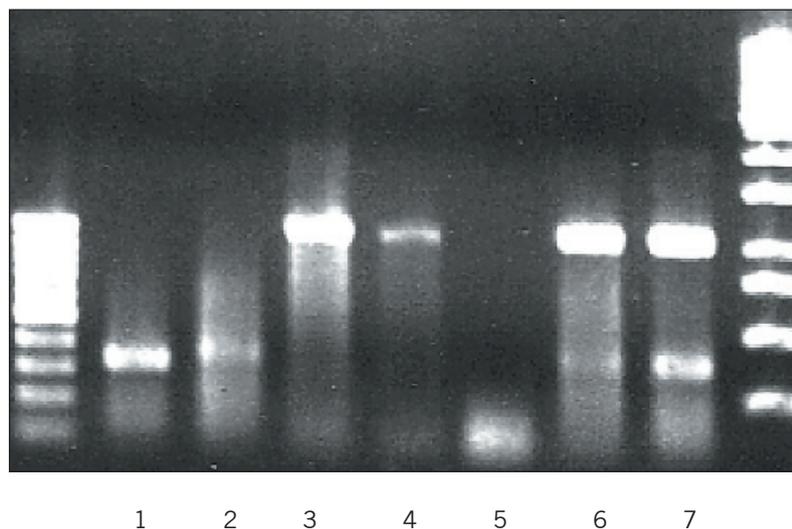


Abbildung 3.1:

Mit Ethidium gefärbtes Agarose-Gel. PCR-Produkte von *B. malayi* und *P. falciparum* DNA enthaltendem Blut.

Spur 1+2: *B. malayi* DNA,

Spur 3+4: *P. falciparum* DNA,

Spur 5: negative Kontrolle,

Spur 6+7: *B. malayi* + *P. falciparum* DNA;

Die beiden Bandenmuster an den Seiten entsprechen den Molekulargewichtsmarkern 100 bp bzw. 1 kbp.

Die Banden in Spur 1 und 2 stellen spezifische Banden für *B. malayi* mit einer Länge von 322 bp dar. Sie entsprechen dem Hhal-Wildtyp-Repeat. Die Banden in Spur 3 und 4 entsprechen spezifischen Banden für *P. falciparum* mit einer Länge von 1,2 kbp. In Spur 5, der negativen Kontrolle, sind nur die Primerdimere zu erkennen. In Spur 6 und 7 sind sowohl die spezifischen Banden für *B. malayi* als auch für *P. falciparum* nachzuweisen. So war es möglich, mit Hilfe des beschriebenen PCR Nachweises auch *P. falciparum* DNA nachzuweisen. Mit der Multiplex-PCR konnte gleichzeitig *B. malayi* und *P. falciparum* DNA nachgewiesen werden. Bei einer kleinen Stichprobe mit 26 Blutproben aus endemischen Gebieten auf Sulawesi konnten jedoch keine Koinfektionen mit *P. falciparum* gefunden werden.

3.2.3 Branched DNA

Da der herkömmliche PCR-Nachweis sehr aufwendig ist, wurde in einer Pilotstudie ein branched DNA (bDNA) Test als mögliche, praktikable und vereinfachte Alternative untersucht. Mittels dieses Verfahrens ist anhand einer Serie von Hybridisierungs-Reaktionen eine Signalamplifikation ohne Verwendung eines Thermocyclers möglich.

Zunächst wurde mittels PCR das Hhal-Repeat amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend in mehreren Schritten verdünnt. Mit den verschiedenen Verdünnungsstufen wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dieses Gel wurde nun mit Hilfe der bDNA-Methode (siehe 2.3.11.) untersucht. Nach erfolgtem Blotten und anschließender Hybridisierung wurde der nun digoxigenin-markierte Blot mittels DIG-Nachweis ausgewertet (Abbildung 3.2). Die Banden in Spur 1 - 7 liefern anhand des Blots positive Ergebnisse. Sie stellen mit einer Länge von 322 bp spezifische Banden für *B. malayi* dar und entsprechen dem Hhal-Repeat. Mit Hilfe der bDNA-Methode war es demnach möglich, *B. malayi* DNA nachzuweisen.

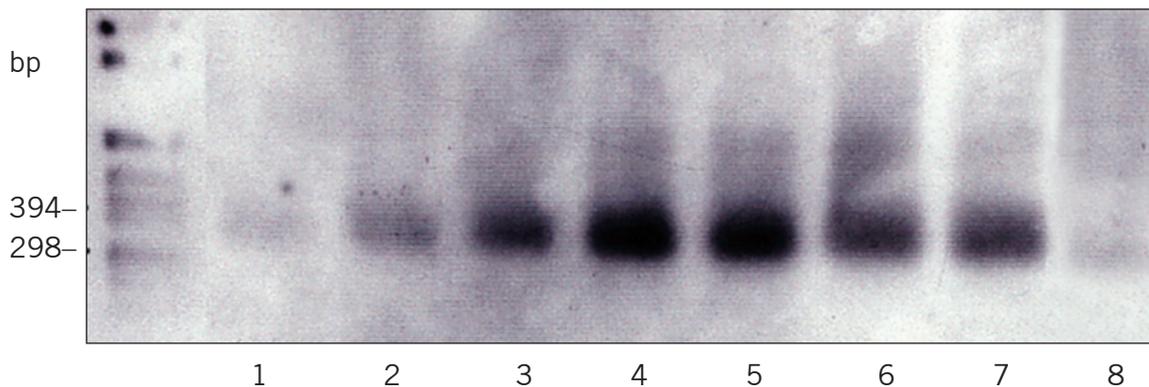


Abbildung 3.2:

Ergebnis der bDNA von *B. malayi*.

Spur 1: Probe 1:8 verdünnt,

Spur 2+3: Probe 1:4,

Spur 4+5: Probe 1:2,

Spur 6+7: Probe unverdünnt,

Spur 8: negative Kontrolle

(Auf der linken Seite ist der DIG-Längenmarker aufgetragen)

3.3 Nachweis von PCR-Produkten mit dem DNA Detection Test Strip™

Obwohl der PCR-ELISA sich als sehr sensitives Nachweisverfahren erwiesen hatte, sollte eine einfachere und schnellere Methode zum Nachweis von PCR-Produkten erarbeitet werden. Deshalb wurde untersucht, ob der DNA Detection Test Strip zu einer Vereinfachung des Nachweises von PCR-Produkten beitragen könnte.

3.3.1 Sensitivität des Test Strip

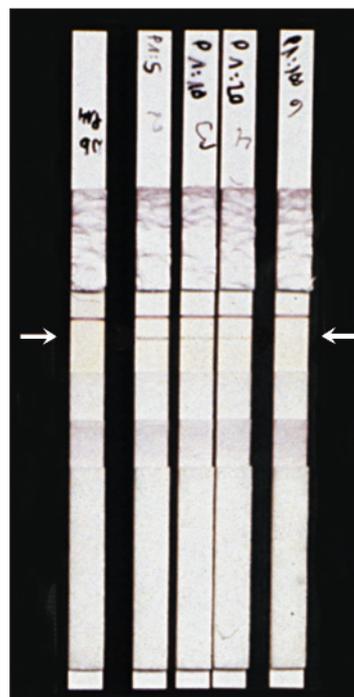
Zunächst wurde die Sensitivität des Tests ermittelt. Hierfür wurde im ersten Schritt unter Verwendung eines biotin-gekoppelten Primers ein biotinyliertes *B. malayi* PCR-Produkt hergestellt. Die Konzentration des erhaltenen PCR-Produktes wurde nun photometrisch bestimmt. Es folgte eine Verdünnung des PCR-Produktes in mehreren Schritten (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7:

Sensitivität des Test Strip im Vergleich mit Agarosegel und PCR-ELISA (+ entspricht positivem Ergebnis, +Anzahl korreliert mit dem Ausmaß der positiven Reaktion)

Verdünnung des HhaI-PCR-Produktes	Konzentration ng / μ l	Ergebnisse des		
		Agarosegel (5 μ l)	PCR-ELISA (5 μ l)	Test Strip (5 μ l)
Unverdünnt	40	++	+++	++
1 : 5	8	+	+++	++
1 : 10	4	+	+++	+
1 : 20	2	-	++	+
1 : 50	0,8	-	++	(+)
1 : 100	0,4	-	+	-
1 : 200	0,2	-	+	-

Nach erfolgter Hybridisierung der verdünnten PCR-Produkte mit der DIG-markierten DNA-Sonde *BmHhaI* wurden jeweils 5 μ l des Gemisches anhand des DNA Detection Test Strip untersucht. Eine *W. bancrofti* positive Probe (SspI-Repeat-PCR-Produkt) fungierte als negative Kontrolle (Abbildung 3.3) [Williams et al., 1996].



1. Strip: *W. bancrofti* SspI PCR-Produkt
2. Strip: Hha I PCR-Produkt 1:5
3. Strip: Hha I PCR-Produkt 1:10
4. Strip: Hha I PCR-Produkt 1:20
5. Strip: Hha I PCR-Produkt 1:100

Abbildung 3.3:

Nachweis des *B. malayi* HhaI PCR-Produktes mit Hilfe des DNA Detection Test Strip (1. Strip: negative Kontrolle (*W. bancrofti*), 2. Strip: 8 ng / μ l, 3. Strip: 4 ng / μ l, 4. Strip: 2 ng / μ l, 5. Strip: 0,4 ng / μ l)

Die Proben 2 bis 4 zeigten ein positives Ergebnis, was an der unteren roten Linie (siehe Pfeile) zu sehen ist. *B. malayi* DNA konnte in einer Konzentration ab 2 ng / μ l nachgewiesen werden. Die *W. bancrofti* Probe sowie die Probe Nummer 6 (0,4 ng / μ l) zeigten ein negatives Ergebnis, es war nur die rote Kontrolllinie zu sehen.

3.3.2 Vergleich des Test Strip mit dem PCR-ELISA

In einem weiteren Versuch wurde der Test Strip mit den bereits vorliegenden Ergebnissen des PCR-ELISA verglichen. Nach erneuter PCR einiger bereits untersuchter Nachtblut-Proben wurden die PCR-Produkte mit der digoxigenierten DNA-Sonde hybridisiert und mittels Test Strip getestet. Diese Ergebnisse wurden mit denen des PCR-ELISA verglichen (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Nachweis des *B. malayi* Hhal-Repeat anhand des PCR-ELISA und Vergleich der Ergebnisse mit der Methode des Test Strip. Die Mf-Dichte wurde durch Filtration von 1ml Blut bestimmt.

Mf-Dichte pro ml Blut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 μ l Blut	Anzahl der untersuchten Proben	Anzahl der positiven Proben	
			ELISA	Test Strip
0	0	6	–	–
1 - 30	0,1 - 1,8	11	6	6
31 - 90	1,9 - 5,4	11	11	11
91 - 150	5,5 - 9,0	5	5	5
151 - 1000	9,1 - 60,	5	5	4
> 1000	> 60,	4	4	4

Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden lieferten in etwa gleiche Ergebnisse. Allerdings konnten im Bereich 151 – 1000 Mf pro ml im PCR-ELISA alle 5 Proben ermittelt werden, während dies anhand des Test Strip nur bei 4 der 5 vorliegenden Proben gelang. Im Bereich sehr niedriger Mf-Dichten (1 – 30 Mf / ml) waren bei beiden Methoden 5 der 11 Proben (45 %) negativ.

3.3.3 DNA-Nachweis von PCR-Produkten der Tagblut-PCR mit Hilfe des Test Strip

Nun wurde die Sensitivität des Test Strip an Tagblut untersucht. Dazu wurden die bereits vorliegenden Proben aus Alor (siehe 3.2.1) verwendet. Die PCR und der Test Strip dieser Proben fanden unter Verwendung der HhaI-Oligonukleotide statt (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Nachweis des HhaI-Repeat in Tagblutproben mit Hilfe des Test Strip. Alle Proben waren im Nachtblut bei der Filtration von 1 ml Blut Mf-positiv. Die aufgeführte Mf-Dichte wurde durch Filtration von Tagblut ermittelt.

Mf-Dichte pro ml Tagblut	Kalkulierte Mf-Dichte pro 60 µl Blut	Anzahl der unter- suchten Proben	Test Strip	
			positiv	negativ
0	0	49	4	45
1 - 9	0,1 - 0,6	29	4	25
10 - 50	0,6 - 3,0	16	8	8
> 50	> 3,0	3	2	1

Mit Hilfe des Test Strip war es möglich, das HhaI-Repeat auch in Tagblut mit geringer Mf-Dichte nachzuweisen. Es konnten 14 der 48 (29 %) Mf-positiven Proben als solche erkannt werden. Von den 49 Proben, die im Tagblut Mf-negativ, jedoch im Nachtblut Mf-positiv waren, konnte nur in 4 (8 %) Proben *Brugia* DNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Test Strip stimmten mit denen des PCR-ELISA weitgehend überein.

4 Diskussion

Die lymphatische Filariasis stellt in vielen endemischen Gebieten ein großes Problem für das öffentliche Gesundheitswesen dar. Diese Erkrankung soll nach Plänen der WHO bis zum Jahre 2020 eliminiert werden [Bebehani, 1998; Ottesen, 2000]. Mit dieser Zielsetzung wurden in vielen Ländern bereits Bekämpfungsprogramme begonnen. Der Schwerpunkt dieser Programme besteht in einer chemotherapeutischen Behandlung der gesamten Bevölkerung in den endemischen Gebieten. Die zur Verfügung stehenden Medikamente besitzen vorwiegend mikrofilarizide Wirkung. Lediglich DEC verfügt über eine mäßige makrofilarizide Wirkung. Demzufolge werden die Mikrofilarien effektiv abgetötet, während die adulten Würmer weiterhin lebensfähig bleiben. Aus diesem Grunde müssen die Bekämpfungsprogramme, entsprechend der Lebensdauer der adulten Würmer (6 - 8 Jahre und mehr), jahrelang aufrechterhalten werden. Die Entwicklung sensitiver diagnostischer Verfahren ist daher von besonderer Bedeutung. Mit ihrer Hilfe soll es möglich sein, vorhandene Infektionen besser zu diagnostizieren, und den Erfolg dieser Bekämpfungsprogramme besser beurteilen zu können. Angesichts der besonderen Situation innerhalb der Endemiegebiete, d.h. des großen Umfangs der zu testenden Personen und der zumeist schwierigen finanziellen Situation der jeweiligen Gesundheitssysteme, müssen diese Testsysteme zugleich auch kostengünstig und leicht anwendbar sein.

4.1 DNA-Isolierung von Blood spots

Der Nachweis von Filarien-DNA in menschlichem Blut mit molekularbiologischen Methoden setzt eine effiziente und einfach im Feld durchführbare Konservierung der Blutproben voraus. Oft ist die Entnahme von venösem Blut in den Dörfern schwierig, und die Proben können im Feld nur mit einigem Aufwand für die spätere Untersuchung im Labor konserviert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte daher sein, eine vereinfachte und zugleich effektive Konservierungs- und Extraktionsmethode für Blutproben, die mit der PCR auf Filarien-DNA untersucht werden können, zu entwickeln. Hinsichtlich der Konservierung entschied ich mich für eine von McCabe und Zhang und Mitarbeitern beschriebene Methode der Blood spots

[McCabe, 1991; Zhang et al., 1995]. Diese Methode wurde bereits von Cox-Singh et al. in Verbindung mit einer nested PCR an Filarien geprüft und erwies sich dabei als zuverlässig [Cox-Singh et al., 1997, 1999]. Auch zeigten weitere Studien, daß mit Hilfe der nested PCR freie DNA nachgewiesen werden konnte [Cox-Singh et al., 2000]. Die nested PCR besitzt jedoch ein hohes Risiko für Kontaminationen und damit die Gefahr, falsch positive Ergebnisse zu erhalten [Lo et al., 1990]. Daher sind besonders bei der Durchführung der nested PCR Vorsichtsmaßnahmen notwendig, die gerade in Entwicklungsländern aufwendig und kostenintensiv sind [Kwok, 1990]. Dadurch ist dieser diagnostische Ansatz oftmals zu teuer und nicht praktikabel [Burkardt, 2000]. Die nested PCR ist als sensitive und kostengünstige Standardmethode zur Detektion von Infektionen mit *B. malayi* oder *B. timori* ungeeignet. Aus diesem Grunde entschied ich mich im Anschluß an die Extraktion der Blood spots für ein herkömmliches PCR-Verfahren mit einem nachfolgenden sensitiven ELISA-Nachweis der PCR-Produkte.

EDTA-Blut wurde auf Filterpapier konserviert und anschließend wurden verschiedene Extraktionsverfahren hinsichtlich ihrer Effektivität miteinander verglichen. In Anlehnung an die Ergebnisse von Walsh und Mitarbeitern [Walsh et al., 1991] wurden die Proben zunächst mit der Chelex-Methode extrahiert. Anschließend wurden korrespondierende Proben mit der Phenol/Chloroform-Extraktion untersucht. Nach dem PCR-ELISA wurden die Ergebnisse verglichen. Für hohe Mf-Dichten lieferten beide Extraktionsmethoden zwar gleichermaßen gute Ergebnisse, im Bereich niedriger Mf-Dichten (0,1 – 1,8 Mf pro 60 µl) hingegen war die Chelex-Methode deutlich besser. Die Vorteile der Chelex-Methode zeigten sich jedoch nicht ausschließlich in der erzielten diagnostischen Sensitivität. Auch im Hinblick auf den zeitlichen Aufwand, die Toxizität der verwendeten Chemikalien und die Kosten war die Chelex-Methode der Phenol/Chloroform-Extraktion eindeutig überlegen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von de Lamballerie et al. [1992] erwies sich die Chelex-Methode als effizienter und auch weniger gesundheitsgefährdend. Man benötigte nur ein Drittel der Zeit, und die Kosten beliefen sich auf nur ein Zehntel der Phenol/Chloroform-Extraktionsmethode. Vor allem angesichts der Größe des zu untersuchenden Probenumfangs sind dies entscheidende Faktoren, die erheblich zu einer Vereinfachung der Untersuchungen beitragen.

Insgesamt stellten sich die verwendeten Blood spots als zuverlässige Konservierungsmethode heraus. Die Proben konnten über einen langen Zeitraum (mehrere Monate bis Jahre) bei Raumtemperatur gelagert werden. Die in den Proben enthaltene DNA blieb dabei stabil und konnte nach erfolgter Extraktion mit Hilfe der PCR-Diagnostik nachgewiesen werden. Die Chelex Methode mit anschließendem PCR-ELISA war geeignet, *B. malayi* DNA selbst bei jenen Personen nachzuweisen, die nur eine geringe Mikrofilariendichte aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden zunächst mit relativ wenigen Proben erzielt, konnten jedoch anhand weiterer Proben aus endemischen Gebieten bestätigt werden.

Im Unterschied zum venösen Blut kann Kapillarblut sehr einfach auch von wenig geschultem paramedizinischem Personal in endemischen Dörfern gesammelt werden. Daher wurden Kapillarblut-Proben mit der PCR untersucht, die direkt im Feld auf Filterpapier gesammelt und getrocknet wurden. Dadurch sollte überprüft werden, ob die verbesserte Konservierung der Proben im Feld geeignet ist, um die möglicherweise in den Proben enthaltene instabile freie DNA mit einer einfachen PCR nachzuweisen [Fischer et al., 2000]. Weiterhin ist die Sammlung von Kapillarblut aus der Fingerbeere im Vergleich zur Entnahme von venösem Blut bedeutend einfacher und schneller. Diese Form der Blutentnahme ist weniger invasiv, so daß sie von den Patienten eher toleriert wird, was sich positiv auf die Compliance auswirkt. Aufgrund der geringen Blutmenge und der leichten Handhabung für den Untersucher kann das Infektionsrisiko im Hinblick auf HIV und Hepatitis B und C vermindert werden [Beltrami et al., 2000]. Die Gefahr, sich an einer Blutlanzette zu verletzen, ist im Vergleich zu möglichen Nadelstichverletzungen gering. Zudem ist die Versuchung, Lanzetten mehrfach zu verwenden deutlich geringer, als bei den teureren Spritzen und Kanülen, die aus Kostengründen ohne ausreichende Sterilisation wiederholt verwendet werden könnten. Durch die Verwendung von Kapillarblut kann demnach auch für die Untersuchten das Infektionsrisiko minimiert werden. Dies ist im Hinblick auf die große Verbreitung von Hepatitis B und C und die zunehmende Rate an HIV-Infektionen von großer Bedeutung. Insgesamt sind Probleme bei der Probengewinnung mit Hilfe von Blutlanzettens relativ selten. Auch ist die Anwesenheit eines Arztes nicht erforderlich. Die Blutentnahme kann von eingewiesenen Laborhelfern durchgeführt werden, die keine spezielle medizinische Ausbildung haben. Dies kann den Aufwand der Probensammlung bedeutend verringern, da die-

se innerhalb des Dorfes koordiniert und durchgeführt werden kann [Baker, 1993]. Ein externes Untersucherteam ist nicht mehr nötig, und für die nachfolgende Diagnostik können die gesammelten Proben auf dem normalen Transportweg in ein entsprechend ausgerüstetes Labor gebracht werden. Dies ist von Bedeutung, da sowohl die Infrastruktur als auch die medizinische Versorgung endemischer Gebiete häufig unzureichend sind. Das ist ein wichtiger Grund warum entsprechende Feldstudien in der Regel mit hohen finanziellen Kosten und großem technischen Aufwand verbunden sind. Somit ist eine Vereinfachung der Probenentnahme, die unter den vor Ort gegebenen Bedingungen durchführbar sein sollte, unbedingt erforderlich [Baker, 1993].

Für die direkte Konservierung von Kapillarblut lieferte die Methode der Blood spots ein gutes Ergebnis. Im Bereich der höheren Mf-Dichten konnte in allen Mf-positiven Blutproben *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. Von den Proben mit sehr niedriger Mf-Dichte lieferten 7 der 14 Proben (50 %) im PCR-ELISA ein negatives Ergebnis. Diese enthielten vermutlich keine Mf, denn die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit, daß ein 60 µl Blood spot keine Mf enthält beträgt innerhalb dieser Gruppe 46 % (Median 42 %). Daher ist davon auszugehen, daß alle negativ getesteten Blood spots dieser Gruppe keine Mf enthielten, während in allen Mf-positiven Proben *B. malayi* DNA sicher nachgewiesen werden konnte. Die Sensitivität dieses Verfahrens entsprach demnach den Ergebnissen vorausgegangener Studien in denen es möglich war, eine einzelne Mf in 60 ml Blut nachzuweisen [Williams et al., 1988, Lizotte et al., 1994]. In 3 Proben, die in einer vorausgegangenen Untersuchung im dicken Tropfen positiv waren, mit Hilfe der Filtrationsmethode jedoch ein negatives Ergebnis lieferten, konnte *B. malayi* DNA detektiert werden. Für diese Proben war die beschriebene PCR-Methode der Filtration überlegen. Trotzdem war es mit der PCR nur möglich, Mf zu detektieren, freie DNA konnte nicht nachgewiesen werden. Alle sowohl im dicken Tropfen als auch mit Hilfe der Filtrationsmethode negativen Proben lieferten im PCR-Nachweis ebenfalls ein negatives Resultat. Dies zeigt, daß bei dieser Methode die Gefahr falsch positiver Ergebnisse gering ist.

Die Chelex-Methode mit anschließendem PCR-ELISA erwies sich insgesamt als sensitiv und spezifisch. Auch ist die Extraktionsmethode preiswert und einfach. Sie kann somit selbst in jenen Labors verwendet werden, die lediglich über eine Stan-

dardeinrichtung verfügen. Auch wird für die Konservierung mit Hilfe der Blood spots mit nur 30 – 60 µl deutlich weniger Blut benötigt als für herkömmliche Methoden. So kann auf eine venöse Blutentnahme verzichtet werden. Dadurch wird mit Hilfe der Blood spots eine sehr einfache Probensammlung ermöglicht; vor allem im Vergleich zur Filtrationsmethode, deren Durchführung und Beurteilung speziell geschultes Personal vor Ort erfordert. Die untersuchte Konservierungsmethode mit Hilfe der Blood spots ist daher besonders für umfangreiche Studien mit großem Probenumfang geeignet. Sie wird der Forderung nach einer vereinfachten Probenentnahme gerecht, und ist unter den vor Ort gegebenen Bedingungen praktisch durchführbar. Auch kann sie dazu beitragen, eine hohe Sensitivität mit relativ geringen Blutmengen zu erreichen, da die Konzentration der Mikrofilarien in kapillärem Blut höher ist als in venösem [Eberhard et al., 1988]. Somit ist das Verfahren einer Konservierung der Proben mit Hilfe der Blood spots und anschließender Chelex-Extraktion breitflächig zur Überwachung von Filarien-Bekämpfungsprogrammen einsetzbar (Zusammenfassung siehe Tabelle 4.1).

Die Sammlung von Nachtblut ist jedoch mit logistischen Schwierigkeiten und Unannehmlichkeiten verbunden. Die zu untersuchenden Personen müssen nachts einbestellt werden, was sich negativ auf die Compliance auswirkt. Neben der Nacharbeit des jeweiligen Untersucherteams ist auch das Vorhandensein von Strom unbedingt erforderlich. Vor allem letzteres ist in vielen endemischen Gebieten problematisch. Aufgrund all dieser Faktoren werden sowohl die Vorbereitung als auch die Durchführung der jeweiligen Studien sehr aufwendig und kostenintensiv. Fischer et al. [2000] berichteten, daß es möglich ist, *B. malayi* DNA in Mf-negativem Tagblut nachzuweisen, und somit auf die Blutentnahme bei Nacht verzichtet werden kann. In Ihrer Studie wurden 200 µl venöses EDTA Tagblut bei –20 °C konserviert und anschließend mit einem PCR-ELISA untersucht. Das Sammeln von venösem Blut und die Lagerung von Blutproben bei –20 °C ist jedoch in vielen endemischen Dörfern nur schwer möglich. Deshalb wurde nun untersucht, ob 60 µl Kapillarblut konserviert als Filterpapier Blood spots und die folgende Chelex-Extraktion sich auch zum DNA-Nachweis in Tagblut eignen. Für diese Untersuchung wurden Tagblutproben getestet, die aus einem für *B. malayi* endemischen Gebiet in Süd-Sulawesi stammten. Dabei handelte es sich um eine subperiodische Form von *B. malayi*. Aufgrund dieser Subperiodizität sind auch im Tagblut Mf vorhanden, jedoch nur in

geringer Konzentration. Ebenso wie bei den streng nächtlich periodischen Stämmen sind die Mf-Dichten im Nachtblut um ein Vielfaches höher [Partono and Purnomo, 1987]. Kapillarblut wurde direkt auf Filterpapier aufgetragen. Die Mf-Dichte dieser Proben wurde noch im Feld mit Hilfe der Filtration von 1 ml Tagblut und mittels des dicken Tropfens (ebenfalls von Tagblut) ermittelt.

Obwohl im Tagblut, aufgrund der Periodizität von *B. malayi* weniger Mf enthalten sind, war es möglich, auch in Proben von 60 µl das *B. malayi* Hhal-Repeat sicher nachzuweisen. So verfügte dieses Extraktionsverfahren in Verbindung mit dem PCR-ELISA über eine Sensitivität von insgesamt 86 %, im Vergleich zur Filtration von 1 ml Blut als Referenzmethode. Auch zeigte sich das Chelex-Verfahren erneut für einzelne Proben der Filtration überlegen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Chelex-Methode auch für Tagblutproben mit einer nur geringen Mf-Dichte gute Ergebnisse liefert. Dies macht eine auf die Nacht beschränkte Blutentnahme überflüssig, und kann dadurch den Aufwand der Kontrolluntersuchungen verringern. Es kann mit einer höheren Compliance der Teilnehmer gerechnet werden, und für das Untersucherteam ergeben sich logistische Vorteile. Im Vergleich zu der von Fischer et al. [2000] berichteten EDTA-Extraktionsmethode für Tagblutproben besitzt diese vereinfachte Probensammlung deutliche Vorteile. Die Verwendung von Tagblut, die Konservierung mit Hilfe der Blood spots und die anschließende Chelex-Extraktion ermöglichen somit eine deutlich vereinfachte Durchführung von Kontrolluntersuchungen. Diese benötigen nun vor Ort weder ärztliches Fachpersonal noch ein speziell ausgebildetes Untersucherteam. Auch sind sie weitgehend unabhängig vom ökonomischen Standard, und selbst bei einer nur gering ausgebildeten Infrastruktur der zu untersuchenden endemischen Gebiete durchführbar. Dieses Verfahren mit Tagblut stellt nicht nur eine sensitive, sondern auch einfache und praktikable Methode zum Nachweis von *B. malayi* Infektionen dar und kann auch in umfangreichen Studien verwendet werden.

Tabelle 4.1: Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Konservierungsmethoden

	Blood spots	Flüssigkonservierung
Blutentnahme	Kapillarblut, einfache Handhabe, wenig invasiv	Venöses Blut, speziell geschultes Personal erforderlich, invasiv (höheres Infektionsrisiko, HIV, Hepatitis)
Konservierung	Einfach, im Feld durchführbar, getrocknete Proben über Jahre bei Raumtemperatur haltbar	Feldlabor erforderlich, Pipetten und Probenröhrchen erforderlich, Strom/Gefrierschank (-20°C) bzw. Chemikalien (EDTA, Urea ect.) notwendig
DNA-Extraktion	Einfach schnell und kostengünstig	Relativ aufwendig und teuer
PCR	Sensitivität abhängig von der Qualität der DNA-Extraktion	Sensitivität abhängig von der Qualität der DNA-Extraktion
Blutmenge	Nur für kleine Mengen geeignet (30-60 µl)	Auch für größere Blutmengen geeignet (~ 500 µl), höhere Sensitivität

4.2 Modifizierte PCR-Nachweis-Methoden und branched DNA

In einigen für *Brugia* endemischen Gebieten in Indonesien (Solor-Alor-Archipel) wird die lymphatische Filariasis nicht durch *B. malayi* sondern durch die nahe verwandte Art *B. timori* verursacht [Purnomo et al., 1977]. Diese verfügt ebenfalls über eine spezifische Hhal-Sequenz, die nahezu vollständig mit der Hhal-Sequenz von *B. malayi* übereinstimmt [Xie et al., 1994]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Brugia* PCR basiert auf der Amplifikation des Hhal-Repeat. Es wurde untersucht, ob sich diese Sequenz von *B. timori* unter den gleichen Bedingungen wie das *B. malayi* Hhal-Repeat amplifizieren läßt. Dann könnte dieser PCR-Nachweis auch zur Diagnostik von *B. timori* verwendet werden [Fischer et al., 2002]. Für diese Untersuchung wurde Tag- und Nachtblut verwendet, daß in einem für *B. timori* endemischen Gebiet auf Alor, Indonesien gesammelt wurde. In diesem Gebiet wiesen 27 % der untersuchten Probanden eine Infektion mit *B. timori* auf. Zusätzlich litten 13 % der Einwohner an Lymphödemen der Beine, einige von ihnen mit dem voll ausgeprägten Bild der Elephantiasis [Supali et al., 2002b]. Von einigen der Mf-positiven, sowie von einigen der Mf-negativen und asymptomatischen Personen wurde Nacht- und / oder Tagblut mit Hilfe der Blood spots gesammelt. Auch wurden einige Patienten mit Elephantiasis, die Mf-negativ waren, in die Studie aufgenommen [Supali et al., 2002b]. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proben mit Hilfe der PCR-Diagnostik untersucht. Die PCR sowie der folgende PCR-ELISA wurden unter Verwendung der Hhal-Oligonukleotide (Primer und DNA Sonde) durchgeführt.

Die für *B. malayi* entwickelte Diagnostikmethode ließ sich auch auf *B. timori* anwenden. Das Hhal-Repeat von *B. timori* konnte anhand der *B. malayi* spezifischen Hhal-Primer nachgewiesen werden. Zum ersten Mal konnte *B. timori* DNA mit Hilfe der PCR-Methodik nachgewiesen werden. Zudem lieferte die Untersuchung für Nachtblut ein gutes Ergebnis. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, in 60 µl Blut eine einzelne vorhandene Mf von *B. timori* nachzuweisen. Die zum Vergleich getesteten *B. malayi* Proben lieferten ein vergleichbares Resultat. Dies zeigt, daß in dem von mir untersuchten PCR-Nachweis zwischen *B. timori* und *B. malayi* kein Unterschied besteht. Mit Hilfe dieser Methode können beide humanpathogenen *Brugia*-Arten (sowohl *B. malayi* als auch *B. timori*) nachgewiesen werden. Dies ist vor allem für jene Gebiete, in denen die lymphatische Filariasis durch *B. timori* hervorgerufen

wird, von großer praktischer Bedeutung [Purnomo et al., 1977]. Sie können problemlos in die Bekämpfungsprogramme mit einbezogen werden. Es bedarf keiner gesonderter oder spezieller Nachweismethoden, um den Erfolg dieser Bekämpfungsprogramme beurteilen zu können.

Auch im Tagblut konnte das *B. timori* Hhal-Repeat nachgewiesen werden. Aufgrund der sehr geringen Mf-Dichten blieben hier jedoch einige Infektionen mit diesem Verfahren unerkannt. Diese Diagnostikmethode mit Tagblut besitzt daher für den einzelnen Infizierten keine sichere Aussagekraft. Aber unabhängig davon kann sie im Rahmen umfangreicher Bekämpfungsprogramme verwendet werden. Denn mit Hilfe dieser Methode kann, auch unter Verwendung von Tagblut, überprüft werden, ob ein Gebiet für *Brugia* (sowohl *B. malayi* als auch *B. timori*) endemisch ist bzw. ob die angewandten Bekämpfungsprogramme erfolgreich verlaufen. Hinsichtlich dieser Fragestellung verfügt dieses Verfahren über eine ausreichende Sensitivität. Untersuchungen von Tagblut besitzen zudem einige Vorteile gegenüber denen von Nachtblut. Wenn eine nächtliche Probensammlung logistisch und organisatorisch nur schwer durchführbar ist, fallen diese Vorteile so stark ins Gewicht, daß demgegenüber das Problem der verminderten Aussagekraft für die einzelne Person unbedeutend wird. Insgesamt beweisen die Ergebnisse, daß sich diese PCR-Methode für den Nachweis aller humanpathogenen *Brugia*-Arten eignet und eine umfangreiche und vor allem vielfältige Anwendbarkeit dieser Methode möglich ist.

In den für *Brugia* endemischen Gebieten treten häufig Koinfektionen mit *Plasmodien* auf. *Plasmodien* und *Brugia* werden oftmals von den selben *Anopheles*-Arten übertragen. Einige Regionen können sowohl für die lymphatische Filariasis als auch für Malaria Endemiegebiete darstellen. Personen, die in diesen Regionen leben und mit *Brugia* infiziert sind, können somit auch gleichzeitig an Malaria erkrankt sein. Aus diesem Grunde können in den Blutproben, die im Rahmen der *Brugia* Bekämpfungsprogramme gesammelt und getestet werden, durchaus auch Malariaerreger vorhanden sein. Die Malaria stellt ebenso wie die lymphatische Filariasis ein schwerwiegendes Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Daher wäre ein diagnostisches Verfahren, mit dessen Hilfe es gelingen könnte, beide Infektionen gleichzeitig nachzuweisen, von großem Nutzen. Dadurch könnten die zumeist nur knappen finanziellen Ressourcen der betroffenen Länder optimal genutzt werden. Diagno-

stisch könnte ein akutes Filarien-Fieber von einer Malaria differenziert werden. Allerdings stellt diese Methode ein aufwendiges Verfahren für den Nachweis einer *Plasmodien* Infektion dar. Im Gegensatz zum Blutaussstrich und dem dicken Tropfen ist es mit ihrer Hilfe jedoch möglich, genetisches Material zu sichern. Dieses kann anschließend für weiterführende Untersuchungen, z.B. die Testung auf Medikamenten-Resistenz von *Plasmodien* genutzt werden. Chansiri et al. [2001] untersuchten in ihrer Arbeit die Anwendbarkeit des PCR-Nachweises auf Koinfektionen mit *P. falciparum*. Mit Hilfe einer einfachen Multiplex-PCR gelang es ihnen, *P. falciparum* und *W. bancrofti* DNA in Blutproben von mehrfach infizierten Patientin gleichzeitig nachzuweisen. Tham et al. [1999] beschrieben eine schnelle Methode zur Diagnostik von Malariainfektionen mit Hilfe getrockneter Blood spots und anschließender PCR-Amplifikation. In Anlehnung an diese beiden Studien habe ich untersucht, ob es möglich ist, *P. falciparum* DNA in Blood spots im Rahmen des Nachweisverfahrens für *B. malayi* nachzuweisen. Dazu wurde mit einigen Blutproben, die *B. malayi* und / oder *P. falciparum* DNA enthielten eine *B. malayi* / *P. falciparum* Multiplex-PCR durchgeführt. Die Proben, welche *B. malayi* DNA enthielten bzw. diejenigen, denen das *Plasmodien* DNA enthaltende Plasmid zugesetzt wurde, zeigten die jeweils spezifischen Banden mit einer Länge von 322 bzw. 1200 bp. Auch konnten in jenen Proben, die sowohl *B. malayi* als auch *P. falciparum* DNA enthielten, die beiden spezifischen Banden (das Hhal-Repeat und die Plasmodium Sequenz) parallel nachgewiesen werden. Bei einer kleinen Stichprobe an 26 Blutproben aus für *Brugia* endemischen Gebieten konnte bisher keine Koinfektion mit *P. falciparum* gefunden werden, obwohl die beschriebene Multiplex-PCR dazu geeignet ist. Daher sollten weitere Untersuchungen folgen. Für diese Untersuchungen bieten sich vor allem Proben von jenen Personen an, bei deren Krankheitssymptomatik nicht genau zwischen einem Filarienfieber und einer akuten Malaria differenziert werden kann.

Der für *B. malayi* verwendete PCR-Nachweis konnte auch für *Plasmodien* verwendet werden. Unter Verwendung der von Waters and McCuchan [1989] beschriebenen spezifischen Primer, der rPLU-Sequenz von *Plasmodien* war diese Diagnostik geeignet, auch *P. falciparum* DNA nachzuweisen. Darüber hinaus war es möglich, innerhalb einer Multiplex-PCR gleichzeitig *B. malayi* und *P. falciparum* DNA zu amplifizieren. Dieses Ergebnis ist vor allem in Hinblick auf die hohe Koinfektionsrate innerhalb der endemischen Gebiete von Bedeutung. Denn dadurch, daß mit Hilfe des

verwendeten Verfahrens der Nachweis verschiedener Parasiten möglich ist, können in Zukunft die gesammelten Proben auf mehrere Infektionen gleichzeitig untersucht werden. Nur noch eine einfache Probensammlung, eine einzige Extraktion dieser Proben sowie auch nur eine PCR wären nötig. Neben dieser vereinfachten und vor allem viel schnelleren Diagnostik hätte dies eine effektivere und auch effizientere Probensammlung zur Folge. Ein Probenkollektiv könnte gleich im Rahmen verschiedener Fragestellungen untersucht werden. Dadurch könnten pro gesammelter Probe jeweils mehrere Daten gleichzeitig ermittelt werden, was vor allem in Anbetracht des großen Umfanges von epidemiologischen Studien und Bekämpfungsprogrammen sehr effektiv wäre.

Obwohl der beschriebene PCR-Test ein sehr spezifisches und sensitives Verfahren zur Diagnose von *B. malayi* Infektionen darstellt, besitzt die PCR-Diagnostik auch einige Nachteile. Einer dieser Nachteile ist der hohe Aufwand an technischen Geräten. Dies könnte vor allem in Labors innerhalb endemischer Gebiete, die nicht immer über einen PCR-Thermocycler verfügen, von Bedeutung sein und die entsprechende Diagnostik unmöglich machen. Ein weiterer bedeutender Nachteil ist die sehr hohe Kontaminationsgefahr. Denn die PCR-Diagnostik ist äußerst sensibel und reagiert intensiv selbst auf geringste Verunreinigungen [Burkardt, 2000]. Folgen möglicher Kontaminationen können sich vor allem als falsch positive Resultate, durch die Verunreinigung mit den zu untersuchenden DNA-Sequenzen, bemerkbar machen [Lo et al., 1990]. Aufgrund dieser Nachteile sollte nach einer möglichen Alternative für den PCR-Nachweis gesucht werden. Es erfolgten Pilotuntersuchungen zur Entwicklung einer branched DNA- (bDNA) Methode. Mit Hilfe dieser Methode, die eine Serie von Hybridisierungs-Reaktionen beinhaltet, wird die Quantifizierung vorhandener DNA ermöglicht [Iqbal et al., 1999]. Im Gegensatz zur PCR stellt sie ein Signalamplifikationsverfahren dar, bei dem kein Thermocycler notwendig ist, der Aufwand an technischen Geräten kann somit verringert werden.

In der vorliegenden Arbeit ging es zunächst vor allem darum, die Anwendbarkeit der Methode zu untersuchen. Daher wurde diese bDNA mit Proben durchgeführt, die nachweislich eine möglichst hohe Konzentration an *B. malayi* DNA enthielten. Die unternommene Pilotuntersuchung lieferte ein vielversprechendes Ergebnis. Mit Hilfe der bDNA-Methode war es möglich, das spezifische *B. malayi* Hhal-Repeat nach-

zuweisen. Jedoch enthielten die untersuchten Proben eine relativ hohe Konzentration an *B. malayi* DNA, die weit über den normalen Werten liegen dürfte. So dienten diese ersten Untersuchungen vor allem dem Nachweis, daß die bDNA prinzipiell als Diagnostikmethode für *Brugia* Infektionen geeignet ist. Die durchgeführten Versuche waren jedoch nicht ausreichend, um die potentielle Sensitivität des Verfahrens ermitteln zu können. Daher sind noch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Zum einen, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen, und zum anderen, um die Sensitivität dieser Methode optimieren zu können. Auch erscheint die bDNA zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch als recht aufwendiges und zeitintensives Verfahren. Das könnte jedoch mit Hilfe einer Weiterentwicklung zum ELISA-Format oder zu einem immunchromatographischen Strip vereinfacht werden. In diesem Falle würde eine einfache und äußerst praktikable Methode zum spezifischen Nachweis von *Brugia* Infektionen zur Verfügung stehen. Diese bDNA könnte eine echte Alternative zum PCR-Nachweis darstellen. Vor allem da sie auch in jenen Labors durchgeführt werden kann, die nur über eine geringe technische Ausstattung verfügen. Insgesamt erscheint die bDNA als vielversprechende Methode, die in Zukunft vor allem für endemische Länder an Bedeutung gewinnen kann.

4.3 DNA Detection Test Strip zum Nachweis amplifizierter PCR-Produkte

Die Entwicklung von einfachen, sensitiven und spezifischen Diagnostikmethoden ist eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche Bekämpfung der lymphatische Filariasis. Für einen sensitiven Nachweis von *B. malayi* DNA wurden bisher vor allem die Methode der nested PCR und der PCR-ELISA verwendet. Der PCR-ELISA dient darüber hinaus noch einer Quantifizierung der zu untersuchenden PCR-Produkte [Cox.Singh et al., 2000; Fischer et al., 2000]. Beide Verfahren sind jedoch aufwendig und besitzen ein hohes Risiko für Kontaminationen. Sie sind daher in zahlreichen Labors routinemäßig nicht durchführbar [Lo et al., 1990; Kamal et al., 2001]. Dies zeigten auch eigene Erfahrungen, die ich in einem Labor in Jakarta sammeln konnte. Während der Extraktion, mit nachfolgender PCR-Diagnostik konnten mögliche Fehlerquellen nicht vollständig dezimiert werden. Der PCR-ELISA lieferte falsch positive Ergebnisse, die aufgrund des hohen Kontaminationsrisikos nicht verhindert werden konnten. Mit den vorhandenen Geräten und der geringen Ausstattung war

diese Diagnostikmethode nur unzureichend durchführbar. Hohe finanzielle Investitionen wären nötig, um den Standard dieses Labors in dem Maße zu erhöhen, daß die entsprechenden Nachweisverfahren dort sicher verwendet werden könnten. In Jakarta zeigt sich das Problem der meisten Labors in endemischen Gebieten. Sie verfügen meist nur über sehr begrenzte finanzielle Mittel, und sind nicht für eine aufwendige Diagnostik geeignet. Um die Diagnostik zu vereinfachen, wurde nach einer anwendbaren Alternative zum ELISA-Nachweis von PCR-Produkten gesucht.

Das von Rahmah et al. [2001b] entwickelte Verfahren zum Nachweis von zirkulierenden IgG4-Antikörpern ermöglicht eine einfache und schnelle Diagnostik von *Brugia* Infektionen. Im Gegensatz zur PCR-Diagnostik werden keine Filarien nachgewiesen. Die spezifische Antwort sowie die Reaktionslage des Wirtsorganismus dienen als Meßgröße. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es jedoch aus diesem Grunde schwierig, zwischen einer präpatenten, einer postpatenten und einer Infektion mit lebenden adulten Würmern zu unterscheiden. Auch haben die meisten Bewohner endemischer Gebiete Filarien-Antikörper [Ottesen et al., 1982]. Diese Immun-diagnostik ist daher nur bedingt geeignet, den Erfolg einer Chemotherapie im Rahmen der Bekämpfungsprogramme beurteilen zu können. Zusätzlich können innerhalb dieses Verfahrens signifikante Kreuzreaktionen mit *W. bancrofti* auftreten [Rahmah et al., 2001a, 2001b, 2003; Fischer et al., 2003b]. Daher wurde nun nach einer einfachen Diagnostikmethode gesucht, die darüber hinaus sowohl sensitiv als auch spezifisch für *Brugia* sein sollte. Hinsichtlich dieser Fragestellung untersuchte ich, ob der DNA Detection Test Strips™ [Klepp, 2000; Klüber et al., 2001; Pischke et al., 2002] zu einer Vereinfachung des Nachweises von PCR-Produkten beitragen könnte.

Zunächst wurde die Sensitivität des Tests ermittelt. Diese Untersuchung lieferte ein gutes Ergebnis. *B. malayi* DNA konnte in einer Konzentration von mindestens 2 ng / µl nachgewiesen werden, was mit den Angaben des Herstellers hinsichtlich der Sensitivität dieses Verfahrens weitgehend übereinstimmt [Klepp, 2000]. Eine *W. bancrofti* positive Probe (Sspl-Repeat PCR-Produkt), die als negative Kontrolle mitgeführt wurde, lieferte wie erwartet ein negatives Ergebnis. Mit Hilfe der spezifischen Hhal-Primer wurde ausschließlich die vorhandenen *Brugia* DNA amplifiziert. Diese Untersuchung zeigt, daß sich der Test Strip zum spezifischen Nachweis von *Brugia* eignet.

In einem nächsten Schritt wurde die Sensitivität des Test Strips zum Nachweis von PCR-Produkten genauer untersucht und mit den Ergebnissen des PCR-ELISA, als Referenzmethode verglichen. Dazu wurden einige Nachtblut-Proben parallel mit Hilfe des PCR-ELISA und des Test Strips untersucht. Obwohl der PCR-ELISA theoretisch über eine 10 - 20 mal höhere Sensitivität verfügt als der Test Strip (Tabelle 4.2), lieferten beide Untersuchungsmethoden weitgehend gleiche Ergebnisse. In den meisten Proben, die im PCR-ELISA positiv waren, konnte mit Hilfe des Test Strips ebenfalls *B. malayi* DNA nachgewiesen werden. Auch für *B. timori* Tagblutproben von Alor lieferte der Test Strip ein gutes Ergebnis. Alle Proben, in denen anhand des PCR-ELISA das Hhal-Repeat nachgewiesen werden konnte, lieferten auch im Test Strip ein positives Ergebnis. Mit Hilfe des Test Strip war es somit möglich, neben *B. malayi* auch *B. timori* nachzuweisen. Auch konnte selbst in Tagblutproben, die nur über eine geringe Mf-Dichte verfügten, sensitiv *Brugia* DNA nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse des Test Strip sowohl im Nacht- als auch im Tagblut mit denen des PCR-ELISA weitgehend übereinstimmten, erwies er sich hinsichtlich seiner Sensitivität als durchaus dem ELISA ebenbürtig.

Tabelle 4.2: Vergleich der verschiedenen Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten

	Spezifität	Sensitivität	Zeitaufwand	Kosten Ausstattung/pro Test (€)	Bemerkung
Agarose-Gel Elektrophorese	größen- spezifisch	> 10 ng	2 h	1.500,- / < 0,05	zuverlässig, giftige Chemikalien
ELISA- Hybridisierung	sequenz- spezifisch	100 pg – 5 ng	5 h	1.500,- / < 0,1	großer Probenumfang möglich
DNA Detection Test Strip	sequenz- spezifisch	~ 5 ng	0,5 h	- / 1,-	zuverlässig, sehr einfache Handhabe

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es mit Hilfe des Test Strip möglich ist, das Hhal-Repeat mit hoher Spezifität nachzuweisen. Zudem liefert dieses Verfahren hinsichtlich seiner Sensitivität für den Nachweis von *Brugia* DNA ein gutes Ergebnis. Zur Zeit ist der Test Strip noch relativ teuer. Je nach Vereinbarung mit dem Hersteller kostet er, abhängig von der bezogenen Stückzahl, zwischen 0,5 – 2 Euro pro Probe. Im Vergleich zum PCR-ELISA stellte er sich jedoch als bedeutend schnelleres Nachweisverfahren heraus [Fischer et al., 2003a]. Die gesamte Diagnostik mit Extraktion, PCR und anschließendem Nachweis der PCR-Produkte mit Hilfe des Test Strip konnte in weniger als 5 Stunden durchgeführt werden. Ein weiterer großer Vorteil des Test Strip liegt in seiner leichten Anwendbarkeit. Dadurch kann er auch in jenen Labors genutzt werden, die nur über eine Standardeinrichtung verfügen. Der Test Strip kann in Kombination mit der vereinfachten Probengewinnung durch die Methode der Blood spots und anschließender Chelex Extraktion, dazu beitragen, den Nachweis von *Brugia* Infektionen bedeutend zu beschleunigen und zu vereinfachen. Er kann sich vor allem im Rahmen umfangreicher Studien als zuverlässige Alternative zum sehr aufwendigen und zeitintensiven PCR-ELISA bewähren. Denn im Hinblick auf den großen Probenumfang und die zumeist einfache Einrichtung der entsprechenden Labors besteht ein Bedarf an schnellen und einfachen Testsystemen. Das Verfahren des Test Strip kann diese Anforderungen erfüllen.

Meine Untersuchungen haben gezeigt, daß der PCR-Nachweis von *B. malayi* und *B. timori* zu einer einfachen und sensitiven Methode vereinfacht werden kann.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines einfachen, sensitiven und kostengünstigen molekularbiologischen Nachweisverfahrens für *Brugia malayi* DNA im Blut unter besonderer Berücksichtigung der Anwendbarkeit in den zumeist einfach ausgestatteten Laboratorien endemischer Länder.

Als einfache und effektive Konservierungs- und Extraktionsmethode untersuchte ich die Konservierung von Kapillarblut auf Filterpapier (sogenannte "Blood spots") mit anschließender Chelex-DNA-Extraktion. Beide Verfahren stellten sich als einfache und zuverlässige Methoden heraus. Sie waren geeignet, die Probensammlung bedeutend zu vereinfachen, und ermöglichten eine kostengünstige Extraktion sowie eine sensitive PCR-Diagnostik. Mit Hilfe eines anschließenden PCR-ELISA konnte sensitiv *B. malayi* DNA nachgewiesen werden, selbst bei einigen Proben, die nur über geringe Mf-Dichten verfügten. Auch konnten diese Methoden zur Untersuchung von Tagblut verwendet werden, was eine weitere Vereinfachung dieser Diagnostik ermöglichte.

Die Effektivität des verwendeten PCR-Nachweisverfahrens konnte gesteigert und verbessert werden. Zum ersten Mal konnte mit Hilfe dieser für *B. malayi* verwendeten PCR-Diagnostik *B. timori* DNA nachgewiesen werden. Auch war es im Rahmen einer Multiplex-PCR möglich, *P. falciparum* DNA nachzuweisen. Erste Untersuchungen zur Methode der branched DNA zeigten, daß das Hhal-Repeat für einen solchen Nachweis ebenfalls geeignet ist. Diese Ergebnisse belegen eine umfangreiche und vor allem vielfältige Anwendbarkeit dieser Diagnostikmethode.

Der DNA Detection Test Strip erwies sich als vereinfachte Methode zum Nachweis von PCR-Produkten. Im Vergleich zum aufwendigen PCR-ELISA stellte er sich als ein sehr schnelles und einfaches Nachweisverfahren mit nahezu gleicher Sensitivität heraus. Der Test Strip trägt gemeinsam mit der vereinfachten Probengewinnung durch die Methode der Blood spots und anschließender Chelex-Extraktion dazu bei, den Nachweis von *Brugia* Infektionen bedeutend zu beschleunigen und zu vereinfachen.

Die problemlose und zeitsparende Durchführbarkeit der untersuchten Methoden, ihre Sensitivität sowie ihre Anwendbarkeit auf Koinfektionen mit Malaria machen die entwickelte Diagnostikmethode zu einer praktikablen und kostengünstigen Alternative zu herkömmlichen Verfahren, vor allem im Hinblick auf den großen Probenumfang bei der Überwachung von Bekämpfungsprogrammen und die zumeist einfache Ausstattung der Laboratorien in endemischen Ländern.

6 Literaturverzeichnis

Addiss, D (1998). Centers for Disease Control and Prevention. *Bulletin of the world Health Organization*, **76** (supplement 2), 145 - 146.

Addiss DG, Eberhard ML, Lammie PJ, McNeeley MB, Lee SH, McNeeley DM and Spencer HC (1993). Comparative trial of clearing-dose and single high-dose ivermectin and diethylcarbamazine against *Wuchereria bancrofti* microfilaremia. *Am J Trop Med Hyg* **48**: 178 – 185.

Addiss DG, Beach MJ, Streit TG, Lutwick S, LeConte FH, Lafontant JG, Hightower AW and Lammie PJ (1997). Randomized placebo-controlled comparison of ivermectin and albendazole alone and in combination for *Wuchereria bancrofti* microfilaraemia in Haitian children. *Lancet* **350**: 480 – 484

Amaral F, Dreyer G, Figueredo-Silva J, Noroes J, Cavalcanti A, Samico S, Santos A and Coutinho A (1994). Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. *Am J Trop Hyg* **50**: 753 – 759.

Ambroise-Thomas P (1974). Immunological diagnosis of human filariases: present possibilities, difficulties and limitations. *Acta Trop* **31**: 108 – 128.

Baker RH Jr. (1993). Use of PCR in the field. *Parasitol Today* **10**: 117 – 119.

Bawden M, Slaten D and Malone J (1994). QBC: rapid filaria diagnoses from blood – *Mansonella ozzardi* and *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 66.

Bebhani, K (1998). Candidate parasitic diseases. *Bull World Health Organ* **76** (suppl 2): 64 – 67.

Bell D (1967). Membrane filters and microfilariae: a new diagnostic technique. *Ann Trop Med Parasitol* **61**: 220 – 223.

Beltrami EM, Williams IT, Shapiro CN, Chamberland ME (2000). Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol Rev* **13**: 385 – 407.

Bird AC, Sheikh HE, Anderson J and Fuglsang H (1980). Changes in visual function and in the posterior segment of the eye during treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine citrate. *Br J Ophthalmol* **64**: 191 – 200.

Burkardt HJ 2000. Standardization and quality control of PCR analysis. *Clin Chem Lab Med* **38**: 87 – 91.

Carme B, Boulesteix J, Boutes H and Puruehnce MF (1991). Five cases of encephalitis during treatment of loiasis with diethylcarbamazine. *Am J Trop Med Hyg* **44**: 684 – 690.

CDC (1993). Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. *MMWR* **42**: 1 – 38.

Chansiri K, Kwosdak P, Tananyutthawongese C, Sukhumsirichart W, Sarataphan N and Phantana S (2001). Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* **15**: 201 – 207.

Chanteau S, Glaziou P, Moulia-Pelat JP, Plichart C, Luquiaud P and Cartel JL (1994a). Low positive predictive value of anti-*Brugia malayi* IgG and IgG4 serology for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Soc Trop Med Hyg* **88**: 661 – 662.

Chanteau S, Luquiaud P, Failloux AB, Williams SA (1994b). Detection of *Wucheria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 665 – 666.

Cox-Singh J, Mahayet S, Abdullah MS, Singh B (1997). Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *Int J Parasitol* **27**: 1575 – 1577

Cox-Singh J, Pomrehn AS, Rahman HA, Zakaria R, Miller AO and Singh B (1999). Simple blood-spot sampling with nested polymerase chain reaction detection for epidemiology studies on *Brugia malayi*. *Int J Parasitol* **29**: 717-721.

Cox-Singh J, Pomrehn AS, Wolfe ND, Rahman HA, Lu HY, Singh B (2000) Sensitivity of the nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for *Brugia malayi* and significance of "free" DNA in PCR-based assays. *Int J Parasitol* **30**: 1177 – 1179.

Dissanyake S, Watawana I and Piessens WF (1995). Lymphatic pathology in *Wuchereria bancrofti* microfilaraemic infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**: 517 – 521.

Dreyer G, Ottesen EA, Galdiono E, Andrade L, rocha A, Medeiros Z, Moura I, Camisiro I, Beliz F and Coutinho A (1992). Renal abnormalities in microfilaraemic patients with bancroftian filariasis. *Am J Trop Hyg* **46**: 745 – 749.

Dreyer G, Pires ML, Andrade LD, Lopes E, Medeiros Z, Tenorio J, Coutinho A, Noroes J and Figueredo-Silva J (1994). Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and amicrofilaraemic individuals in an endemic area of bancroftian filariasis, Recife, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **88**: 232 – 236.

Dreyer G, Noroes J, Amaral F, Nen A, Medeiros Z, Coutinho A and Addiss D (1995) Direct assessment of the adulticidal efficacy of single-dose ivermectin for bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**: 441 – 443.

Dreyer G, Medeiros Z, Netto J, Leal NC, de Castro LG and Piessens WF (1999). Acute attacks in the extremities of persons living in an area endemic for bancroftian filariasis: differentiation of two syndromes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**: 413 - 417.

Dreyer G, Noroes J, Figueredo-Silva J and Piessens WF (2000). Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: a clinical perspective. *Parasitol Today* **16**: 544 – 548.

Eberhard ML , Roberts IM, Lammie PJ and Lowrie RC, Jr (1988). Comparative densities of *Wuchereria bancrofti* microfilaria in paired samples of capillary and venous blood. *Trop Med Parasitol* **39**: 295 – 298.

Eberhard ML and Lammie PJ (1991). Laboratory diagnosis of filariasis. *Clin Lab Med* **11**: 977 – 1010.

Eberhard ML, Hightower AW, McNeeley DF and Lammie PJ (1992). Long-term suppression of microfilaremia following ivermectin treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**: 87 – 88.

Fischer P, Rubaale T, Meredith SEO and Büttner DW (1996). Sensitivity of a polymerase chain reaction-based assay to detect *Onchocerca volvulus* DNA in skin biopsies. *Parasitol Res* **82**: 395 - 401.

Fischer P, Liu X, Lizotte-Waniewski M, Kamal ICH, Ramzy MR and Williams SA (1999). Development of a quantitative, competitive polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* DNA. *Parasitol Res* **85**: 176 – 183

Fischer P, Supali T, Wibowo H, Bonow I and Williams SA (2000). DNA detection of nocturnally periodic *Brugia malayi* in night and day blood samples by a PCR-ELISA based method including an internal control. *Am J Trop Med Hyg* **62**: 291 – 296.

Fischer P, Wibowo H, Pischke S, Ruckert P, Liebau E, Ismid IS, Supali T (2002). PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. *Ann Trop Med Parasitol* **96**: 809 – 821.

Fischer P, Boakye D and Hamburger J, (2003a). Polymerase chain reaction-based detection of lymphatic filariasis. *Med Microbiol Immunol* **192**: 3 – 7.

Fischer P, Bonow I, Supali T, Rückert P and Rahmah N (2003b). Combination of serological and PCR-based assays for screening of blood spots to detect *Brugia timori* infections. *Ann Trop Med Parasitol* (submitted).

Freedman DO (1998). Immunopathogenesis of human lymphatic filariasis. *Parasitol Today* **14**: 229 – 234.

Freedman DO and Berry RS (1992). Rapid diagnosis of bancroftian filariasis by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Am J Trop Med Hyg* **47**: 787 – 793.

Freedman DO, Almeida Filho PJ, Besh S, Silva MC, Braga C and Maciel A (1994). Lymphoscintigraphic analysis of lymphatic abnormalities in symptomatic and asymptomatic human filariasis. *J Infect Dis* **170**: 927 – 933.

Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Büttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R and Fleischer B (1999). Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* **103**: 11 – 18.

Iqbal SS, Chambers JP, Brubaker RR, Goode MT and Valdes JJ (1999). Detection of *Yersinia pestis* using branched DNA. *Mol Cell Probes* **13**: 315 – 320.

Ismail MM, Jayakody RL, Weil GJ, Mirmalan N, Jayasinghe KSA, Abeyewickrema W, Revzi Sherif MH, Rajaratnam HN, Amaresekera N, de Silva DCL, Michalski ML and Dissanaikie AS (1998). Efficacy of single-dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 94 – 97.

Jayakody RL, DeSilva CSS and Weerasinghe WI (1993). Treatment of bancroftian filariasis with albendazole: evaluation of efficacy and adverse reactions. *Trop Biomed* **10**: 19 – 24.

Kamal IH, Fischer P, Adly M, El Sayed AS, Morsy ZS, Ramzy RM, 2001. Evaluation of a PCR-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in *Culex pipiens* from an Egyptian village with a low prevalence of filariasis. *Ann Trop Med Parasitol* **95**: 833 – 841.

Kanda T, Joesoef A, Imai Y, Suzuki H and Yoneyama K (1979). Microfilaral periodicity analysis of the survey data from six localities in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **10**: 32 – 50.

Kimura E, Penaia L and Spears GFS (1985). The efficacy of annual single-dose treatment with diethylcarbamazine citrate against diurnally subperiodic bancroftian filariasis in Samoa. *Bull World Health Organ* **63**: 1097 – 1106.

Klepp J (2000). DNA Detection Test Strip for rapid detection of digoxigenin- or biotin-labeled PCR products. *Roche Mol Biochem – Biochemica* **2**: 14 – 16.

Klüber S, Supali T, Williams SA, Liebau E, Fischer P (2001) Rapid PCR-based detection of *Brugia malayi* DNA from blood spots by DNA Detection Test Strips™. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 169 – 170.

Knott J (1939). A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* **33**: 191.

Kwok S (1990). Procedures to minimize PCR-product carry-over. (In: Persing DH, Smith TF, Tenover CF, White JT (eds.) Diagnostic molecular microbiology principles and applications. Washington: *American Society for Microbiology* **1993**: 149 – 159.

Lamballerie de X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C and de Micco P (1992). A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol* **143**: 785 – 790

Lo Y, Mehal WZ, Fleming K (1990). False positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet* **1**: 679.

Lizotte MR, Supali T, Partono F and Williams SA (1994). A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 314 – 321.

McCabe ER (1991). Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods Appl* **1**: 99 – 106.

McCarthy JS, Zhong M, Gopinath R, Ottesen EA, Williams SA and Nutman TB (1996). Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection. *J Infect Dis* **173**: 1510 – 1514.

McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG (1975). Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg* **69**: 509 – 514.

McReynolds LA, De Simone SM and Williams SA (1986). Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 797 – 801.

Michael E, Grenfell BT and Bundy DAP (1994). The association between microfilaraemia and disease in lymphatic filariasis. *Proc R Soc Lond B* **256**: 33 – 40.

Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Pani SP, Kumaraswami V, Kubicka U, Lukomska B, Dworzynski A, Swoboda E. and Meisel-Mikoljczyk (1977). Bacteriologic studies of skin, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with filarial lymphoedema. *Am J Trop Med Hyg* **57**: 7 – 15.

Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Lukomska B and Kubicka U (1993). Skin changes in filarial and non-filarial lymphoedema of the lower extremities. *Trop Med Parasitol* **44**: 40-44.

Ottesen EA (1985). Efficacy of diethylcarbamazine in eradicating infection with lymphatic-dwelling filariae in humans. *Rev Infect Dis* **7**: 341 – 356.

Ottesen EA (1994). The human filariases: new understandings, new therapeutic strategies. *Curr Opin Infect Dis* **7**: 550 – 558.

Ottesen EA (2000) The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. *Trop Med Int Health* **5**: 591 – 594 .

Ottesen EA, Weller PF, Lunde MN and Hussain R (1982). Endemic filariasis on a Pacific Island. II. Immunologic aspects: immunoglobulin, complement, and specific antifilarial IgG, IgM, and IgE antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **31**: 953 – 961.

Ottesen EA, Skvaril F, Tripathy SP, Poindexter RW and Hussain R (1985). Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol* **134**: 2707 – 2712.

Ottesen EA, Duke BO, Karam M and Behbehani K (1997). Strategies and tools for the control / elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Organ* **75**: 491 – 503.

Ottesen EA, Dowdle WR, Fenner F, Habermehl K-O, John TJ, Koch MA, Medley GF, Muller AS, Ostroff SM and Zeichhardt H (1998). Biological criteria for the eradication of infectious diseases. In: *The eradication of infectious diseases*, Dowdle WR and Hopkins DR (eds.) John Wiley & Sons, West Sussex pp 47 – 49.

Pani SP, Srividya A and Rajagopalan PK (1991). Clearance of microfilaraemia following diethylcarbamazine (DEC) therapy in periodic *Wuchereria bancrofti* infection: relation with age, sex, microfilaria count and clinical status. *Trop Biomed* **8**: 59 – 65.

Pani SP, Yuvaraj J, Vanamail P, Dhanda V, Michael E, Grenfell BT and Bundy DA (1995). Episodic adenolymphangitis and lymphoedema in patients with bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**: 72 – 74.

Partono F (1987). The spectrum of disease in lymphatic filariasis. *CIBA Found Symp* **127**: 15 – 31.

Partono F and Purnomo (1987). Periodicity studies of *Brugia malayi* in Indonesia: recent findings and a modified classification of the parasite. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**: 657 – 662.

Pischke S, Büttner DW, Liebau E and Fischer P (2002). An internal control for the detection of *Onchocerca volvulus* DNA by PCR-ELISA and rapid detection of specific PCR products by DNA Detection Test Strips. *Trop Med Int Health* **7**: 526 – 531.

Purnomo, Dennis DT, Partono F, (1977). The microfilaria of *Brugia timori* (Partono et al. 1977 = Timor microfilaria, David and Edeson, 1964): morphologic description with comparison to *Brugia malayi* of Indonesia. *J Parasitol* **63**: 1001-1006.

Rahmah N, Lim BH, Anuar AK, Shenoy RK, Kumaraswami V, Hakim SL, Chotechuang P, Kanjanopas K and Ramachandran CP (2001a). A recombinant antigenbased IgG4 ELISA for the specific and sensitive detection of *Brugia malayi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 280 – 284.

Rahmah N, Supali T, Shenoy RK, Lim BH, Kumaraswami V, Anuar AK, Hakim SL, Hayati MI, Chan BT, Suharni M and Ramachandran CP (2001b). Specificity and Sensitivity of a rapid dipstick test (Brugia Rapid) in the detection of *Brugia malayi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 601 – 604.

Rahmah N, Shenoy RK, Nutman TB, Weiss N, Gilmour K, Maizels RM, Yazdanbakhsh M and Sartono E (2003). Multicentre laboratory evaluation of Brugia Rapid dipstick test for detection of brugian filariasis. *Trop Med Int Health* **8**: 895 - 900.

Santiago-Stevenson D, Oliver-Gonzales J and Hewitt RI (1947). Treatment of filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamy-4-methylpiperazine hydrochloride ("Hetrazan"). *JAMA* **135**: 708 – 712.

Shenoy RK, Sandhya K, Suma TK and Kumaraswami V (1995). A preliminary study of filariasis related acute adenolymphangitis with special reference to precipitating factors and treatment modalities. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **26**: 301 – 305

Shenoy RK, Dalia S, John A, Suma TK and Kumaraswami V (1999). Treatment of the microfilaraemia of asymptomatic brugian filariasis with single doses of ivermectin, diethylcarbamazine or albendazole, in various combinations. *Ann Trop Med Parasitol* **93**: 643 – 651.

Shenoy RK, John A, Hameed S, Suma TK and Kumaraswami V (2000). Apparent failure of ultrasonography to detect adult worms of *Brugia malayi*. *Ann Trop Med Parasitol* **94**: 77 – 82.

Supali T, Ismid IS, Ruckert P and Fischer P (2002a) Treatment of *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* infection in Indonesia using DEC or a combination of DEC and albendazole: adverse reactions and short-term effects on microfilariae. *Trop Med Int Health* **7**: 894 – 901

Supali T, Wobowo H, Ruckert P, Fischer K, Ismid IS, Purnomo, Djuardi Y and Fischer P (2002b) High prevalence of *Brugia timori* infection in the highland of Alor Island, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **66**: 560 – 565.

Taylor MJ (2002). *Wolbachia* endosymbiotic bacteria of filarial nematodes. A new insight into disease pathogenesis and control. *Arch Med Res* **33**: 422 – 424.

Taylor MJ and Hoerauf A (2001). A new approach to the treatment of filariasis. *Curr Opin Infect Dis* **14**: 727 – 731.

Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RCY and Kara UAK (1999). Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf Tests in a clinical environment. *J Clin Microbiol* **37**: 1269 – 1273.

Tempkin O (1945). A report on the medicinal treatment of filariasis bancrofti. National Research Council, Division of Medical Sciences, Office of Medical Information, Washington, DC.

Walsh PS, Metzger DA and Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**: 506 – 513.

Waters AP and McCuchan TF (1989). Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* **1**: 1343 – 1346.

Weil GJ, Lammie Pf and Weiss N (1997). The ICT filariasis test: a rapid format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitol Today* **13**: 401 – 404.

Williams SA, DeSimone SM and McReynolds LA (1988). Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* **28**: 163 – 170.

Williams SA, Nicolas L, Lizotte-Waniewski M, Plichart C, Luquiaud P, Nguyen LN and Moulia-Pelat JP (1996). A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**: 384 – 387.

Witte MH, Jamal S, Williams WH, Witte CL, Kumaraswami V, McNeil GC, Case TC and Panicker TMR (1993). Lymphatic abnormalities in human filariasis as depicted by lymphoscintigraphy. *Arch Intern Med* **153**: 737 – 744.

WHO (1974). Third report of the WHO Expert Committee on Filariasis. *WHO Tech Rep Ser* **542**: 9 – 13.

WHO (1985). Lymphatic pathology and immunopathology in filariasis: report of the twelfth meeting of the Scientific Working Group on Filariasis. Mimeographed document WHO/TDR/FIL-SWG (12)/85.3.

WHO (1992). Lymphatic filariasis: the disease and its control. *WHO Tech Res Ser* **821**: 1 - 71.

Xie H, Bain O and Williams SA (1994). Molecular phylogenetic studies on brugian filariae using Hhal repeat sequences. *Parasite* **1**: 255 – 260.

Zhang L, Zhan B, Wang J and Feng X (1995). Application of *Plasmodium falciparum* DNA extract from dried blood spot of a *falciparum* malaria patient in polymerase chain reaction. *Chong Bing Za Zhi* **13**: 120 – 122.

Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizotte-Wniewski M, Chanteau S, Nutman TB, Ottesen EA and Williams SA (1996). A polymerase chain reaction assay for the detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 357 – 363.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Fleischer Direktor des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin, Hamburg danke ich für die Betreuung meiner Dissertation.

Herrn PD Dr. P. Fischer, Abteilung für Helminthologie, danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und vielen guten Ratschlägen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Dr. T. Supali, Parasitologisches Institut der Universität Jakarta, Indonesien, möchte ich mich für die Gastfreundschaft in Jakarta sowie für die Hilfe bei den Feldarbeiten in Indonesien bedanken.

Herrn P. Rückert und der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) danke ich für die logistische Unterstützung bei den Feldarbeiten in Indonesien. Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des Filarienbekämpfungsprogramms auf Alor.

Der Vereinigung der Freunde zur Förderung der Tropenmedizin, Hamburg danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Studienaufenthaltes in Indonesien.

Danken möchte ich außerdem allen Mitarbeitern der Laborgruppe Fischer, insbesondere Frau I. Bonow für die stets bereitwillige Hilfe und Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simone Dorothea Klüber
 Geburtsdatum, Ort: 31. Juli 1977 in Fulda
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 bis 1987 Grundschole Langenbieber
 1987 bis 1993 Realschulzweig der Biebertalschule Hofbieber
 1993 bis 1996 Gymnasiale Oberstufe am Marianum Fulda, Abitur im Juli 1996

Hochschulausbildung

10.1996 – 09.1999 Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg
 10.1999 – 06.2003 Medizinstudium an der Universität Hamburg
 18. August 1998 Ärztlichen Vorprüfung, Marburg
 31. August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Marburg
 19. März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Hamburg
 2002 – 2003 Praktisches Jahr
 11. Juni 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Hamburg

Auslandsaufenthalte

12.02.2001 – 14.03.2001 Famulatur in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
 im Military Hospital Accra, Ghana
 07.10.2002 – 08.12.2002 Teil des Chirurgietertials des Praktischen Jahres im Kilimanjaro
 Christian Medical Centre (KCMC), Moshi, Tanzania (Allgemeinchirurgie)
 09.12.2002 – 02.02.2003 Teil des PJ-Tertials für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
 im KCMC, Moshi, Tanzania

Berufliche Tätigkeiten

seit 01.01.2005 Tätigkeit als Ärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
 im AK-Altona, Hamburg

Promotion

Ab Februar 2000 Beginn der Promotionsarbeit in der Sektion Molekulare Parasitologie
 des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin in Hamburg
 29.04.2001 – 08.06.2001 Forschungsaufenthalt zu Feldarbeiten im Rahmen der Doktorarbeit
 auf Alor und in Jakarta (Indonesien)

Publikationen

Originalarbeit:

Klüber S, Supali T, Williams SA, Liebau E and Fischer P (2001). Rapid PCR-based detection of *Brugia malayi* DNA from blood spots by DNA Detection Test Strips™. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**: 169 – 170.

Abstracts:

Klüber S, Supali T, Wibowo H, Bonow I, Williams SA and Fischer P (2000). Detection of *Brugia malayi* DNA in blood spot samples from Indonesia by PCR-ELISA. 49th Annual Meeting of The American Society of Tropical Medicine and Hygiene in Washington. *Am J trop Med Hyg* **63**: (Suppl) 589.

Pischke S, **Klüber S**, Supali T, Rückert P, Bonow I and Fischer P (2002). PCR-based detection of *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. 20. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Lübeck-Travemünde, Germany.

Erklärung

hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den _____

Simone Klüber

