

**„Vergleichende Validation von real-time PCR-Assays
für den Nachweis von Cystoisospora belli als
Testvergleich ohne Goldstandard“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
(Dr. med.)

an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

vorgelegt von
Martin Blohm
aus
Neubrandenburg

2023

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.05.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Thomas Jacobs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Ralf Matthias Hagen








Inhaltsverzeichnis

I. Artikel in gedruckter Originalversion: „Comparison of two real-time PCR assays targeting ribosomal sequences for the diagnosis of <i>Cystoisospora belli</i> in human stool samples“	4
II. Zusammenfassende Darstellung der Publikation mit Abkürzungs- und Literaturverzeichnis	5
III. Erklärung des Eigenanteils an der Promotion.....	20
IV. Danksagung.....	22
V. Lebenslauf.....	23
VI. Eidesstattliche Erklärung.....	24

- I. **Artikel in gedruckter Originalversion: „Comparison of two real-time PCR assays targeting ribosomal sequences for the diagnosis of *Cystoisospora belli* in human stool samples“**

Article

Comparison of Two Real-Time PCR Assays Targeting Ribosomal Sequences for the Identification of *Cystoisospora belli* in Human Stool Samples

Martin Blohm ¹, Andreas Hahn ², Ralf Matthias Hagen ³, Kirsten Alexandra Eberhardt ^{4,5}, Holger Rohde ⁶, Gérard Lebouille ⁷, Torsten Feldt ⁸, Fred Stephen Sarfo ⁹, Veronica Di Cristanziano ¹⁰, Hagen Frickmann ^{1,2,†} and Ulrike Loderstädt ^{11,*}

- ¹ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Hospital Hamburg, 20359 Hamburg, Germany; martin2blohm@bundeswehr.org (M.B.); frickmann@bnitm.de (H.F.)
 - ² Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medicine Rostock, 18057 Rostock, Germany; Hahn.andreas@me.com
 - ³ Department of Microbiology and Hospital Hygiene, Bundeswehr Central Hospital Koblenz, 56070 Koblenz, Germany; ralfmatthiashagen@bundeswehr.org
 - ⁴ Institute of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany; ki.eberhardt@uke.de
 - ⁵ Department of Tropical Medicine, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany
 - ⁶ Institute of Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), 20251 Hamburg, Germany; rohde@uke.de
 - ⁷ Tib MolBiol, Eresburgstraße 22-23, 12103 Berlin, Germany; glebouille@tib-molbiol.de
 - ⁸ Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Medical Center Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; Torsten.Feldt@med.uni-duesseldorf.de
 - ⁹ Department of Medicine, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi 00233, Ghana; stephensarfo78@gmail.com
 - ¹⁰ Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital of Cologne, University of Cologne, 50935 Cologne, Germany; veronica.di-cristanziano@uk-koeln.de
 - ¹¹ Department of Hospital Hygiene & Infectious Diseases, University Medicine Göttingen, 37075 Göttingen, Germany
- * Correspondence: ulrike.loderstaedt1@med.uni-goettingen.de; Tel.: +49-551-3965709
† Hagen Frickmann and Ulrike Loderstädt equally contributed to this work.



Citation: Blohm, M.; Hahn, A.; Hagen, R.M.; Eberhardt, K.A.; Rohde, H.; Lebouille, G.; Feldt, T.; Sarfo, F.S.; Di Cristanziano, V.; Frickmann, H.; et al. Comparison of Two Real-Time PCR Assays Targeting Ribosomal Sequences for the Identification of *Cystoisospora belli* in Human Stool Samples. *Pathogens* **2021**, *10*, 1053. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081053>

Academic Editor: Collette Bromhead

Received: 25 July 2021

Accepted: 17 August 2021

Published: 19 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Cystoisospora (C.) belli* is a coccidian parasite associated with acute or chronic gastroenteritis in immunocompromised patients. Dissatisfactory sensitivity of microscopy as the diagnostic standard approach has been described. Here, we comparatively evaluated two real-time PCRs targeting ribosomal RNA gene sequences of *C. belli* in stool in a test comparison without a reference standard applying latent class analysis. Therefore, 1000 stool samples from Ghanaian HIV (human immunodeficiency virus) patients (n = 905) as well as military returnees from the tropics (n = 95) were assessed by both assays in parallel. After the exclusion of 33 samples showing PCR inhibition, 29 and 33 positive results were recorded with the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and the ITS-2 sequence PCR, respectively, resulting in an accuracy-adjusted prevalence of 3.2%. Nearly perfect agreement between both assays was indicated by Fleiss' kappa of 0.933 with sensitivity and specificity of 92.8% and 100% as well as 100% and 99.8% for the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and the ITS-2 sequence PCR, respectively. Both assays proved to be suitable for the diagnosis of *C. belli* in human stool samples with slightly better sensitivity of the ITS-2 sequence assay, while the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR may be considered for confirmatory testing.

Keywords: *Cystoisospora belli*; diagnosis; stool; real-time PCR; test comparison; immunosuppression; HIV; AIDS; soldier; deployment; parasite

1. Introduction

Cystoisospora (C.) belli is an apicomplexan coccidian protozoan parasite causing gastroenteritis in severely immunocompromised patients, e.g., patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) as well as patients undergoing immunosuppressive therapy or chemotherapy of tumors [1,2]. In particular, the association of *C. belli*-induced gastroenteritis with AIDS has repeatedly been described from various international study sites [3–12], while the parasite is rarely isolated from immunocompetent patients with chronic diarrhea [13]. Transmission occurs primarily in the subtropics and tropics via the fecal–oral route due to food or water contaminated with *C. belli* cysts [1]. In local food markets, cockroaches have been identified as likely mechanical vectors of *C. belli* transmission [14]. Further, *Cystoisospora* spp. have been detected in primates in Ghana, but their role in transmission remains uncertain [15]. After infection, the parasites can be found in the epithelium of the intestines, the bile duct and the gallbladder [1,16,17]. In particular for the latter location, however, histological misidentifications have been reported as well [18,19]. In case of systemic dissemination of the parasite in severely immunocompromised patients, *C. belli* can also be found in extra-intestinal locations such as the lamina propria of the small and large intestine, lymphatic nodes, the spleen, the liver and even in blood smears [1,20]. Persisting disease and even relapses of *C. belli*-associated disease, also called cystoisosporiasis, are common in immunocompromised patients [1]. Medical therapy is usually based on cotrimoxazole for 7 to 10 days [1,17].

Although microscopy, usually following acid-fast staining or using the autofluorescing properties of *C. belli*, is the standard diagnostic approach for the detection of *C. belli* in the patients' stool samples [16,21,22], it has early been argued that more sensitive molecular diagnostic assays may facilitate both diagnostic detection of the parasite and insights into the pathogen's transmission and mode of persistence [21,23,24]. Molecular diagnostic approaches for the identification and typing of *C. belli* were frequently focused on ribosomal DNA sequences [25]. So, restriction fragment polymorphisms within the small subunit ribosomal RNA (ssu rRNA) gene have been applied for the differentiation between various genotypes of *C. belli* [24]. Restriction length fragment polymorphisms of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence have been used to demonstrate phylogenetic relationship of *Cystoisospora* spp. with cyst-forming coccidia of the family *Sarcocystidae* [26]. Of note, *Sarcocystis* spp. are observed considerably less frequently than other coccidian parasites in stool samples even from immunodeficient human patients with chronic gastroenteritis [27].

Good agreement between traditional microscopic assessment and the molecular diagnosis of *C. belli* has been reported [28]. Different molecular tools have been introduced for the diagnostic detection of *C. belli* in diagnostic specimens [29], comprising extended range PCR screening [30], traditional block-cycler PCR [31], melting-curve-based real-time PCR [32], as well as in-house [28,33] and commercial [34] probe-based real-time PCR assays. One of those in-house probe-based real-time PCR assays [33] has already been successfully applied in epidemiological screenings in tropical high-endemicity settings [35]. Of note, diagnostic sensitivity of molecular assays for *C. belli* was reported to be better with semi-automated nucleic acid extraction applying an EZ1 automate (Qiagen, Hilden, Germany) compared to traditional column-based nucleic acid extraction applying the QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen Hilden, Germany) [36].

The two in-house real-time PCR assays for *C. belli* described in recent literature target either a 213-base-pair region comprising *C. belli*'s 5.8S rRNA gene and ITS-2 sequence [28] or an 89-base-pair region within *C. belli*'s ITS-2 sequence [33]. For the 5.8S rRNA gene/ITS-2 protocol, a previous assessment had suggested sensitivity and specificity of 93% each [28], while these values were 100% for the ITS-2-protocol [33] as assessed compared to microscopy with limited numbers of stool samples.

The aim of the study presented here was the comparative evaluation of both described in-house real-time PCR assays in a test comparison without a reference standard.

2. Results

2.1. Sensitivity and Specificity of the Real-Time PCR Assays as well as Accuracy-Adjusted Prevalence Calculated Applying Latent Class Analysis and Agreement Kappa between the Assays

From 1000 assessed samples, 33 (3.3%) were excluded from the calculations due to recorded sample inhibition. From the remaining 967 samples, the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR detected *C. belli* in 29 samples (3.0%), the ITS-2 sequence PCR in 33 samples (3.41%). Applying latent class analysis [37,38], sensitivity and specificity of 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and the ITS-2 sequence PCR were 92.8% and 100.0%, respectively, as well as 100.0% and 99.8%, respectively. However, 95%-confidence intervals comprising the complete percentage spectrum resulted from the low absolute numbers of positive test results. The recorded agreement between the two real-time PCR assays was almost perfect according to the definitions of Landis and Koch [39]. Accuracy-adjusted prevalence of *C. belli* as calculated applying LCA was 3.2% for the study population (Table 1). Thereby, only 1 sample positive by both PCR assays and 2 inhibited samples were recorded among the 95 stool samples obtained from the assessed returned soldiers from deployments in the Democratic Republic of the Congo and Gabon, while all other positive PCR results as well as the remaining 31 inhibited samples were detected within the group of the 905 Ghanaian HIV patients.

Table 1. Summary of the latent class analysis (LCA) results and Fleiss' kappa recording the agreement between the assessments.

PCR	n	Positives (%)	Sensitivity (0.95 CI)	Specificity (0.95 CI)	Kappa (0.95 CI)
5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR	967	29 (3.00)	0.928 (0, 1)	1 (n.e.)	0.933
ITS-2 sequence PCR	967	33 (3.41)	1 (0, 1)	0.998 (0,1)	(0.868, 0.998)
Prevalence (0.95 CI)			0.032 (0.010, 0.092)		

0.95 CI = 95% confidence interval. n = number. n.e. = not estimable.

2.2. Comparison of the Recorded Cycle Threshold (Ct) Values

When comparing the recorded cycle threshold (Ct) values of both *C. belli*-specific real-time PCR assays, both the means and the medians of the Ct values as recorded with both assays were very similar with differences of less than 1 Ct step. The same applied for the recorded standard deviations (Table 2). When focusing on the Ct values in the ITS-2 sequence PCR of the 4 samples that went undetected in the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR, the recorded values ranged between 33.96 and 35.50 and thus above the recorded Ct mean and median values. However, they were still within the range of the standard deviations and lower than the highest Ct values recorded by the ITS-2 sequence PCR (Table 2).

Table 2. Cycle threshold (Ct) values as recorded for both *C. belli*-specific real-time PCR assays.

PCR	n	Mean (SD)	Median (Min, Max)
5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR	29	31.57 (4.14)	31.45 (23.98, 38.24)
ITS-2 sequence PCR	33	30.66 (4.27)	31.33 (23.62, 36.89)

0.95 CI = 95% confidence interval. n = number.

3. Discussion

The study was performed to comparatively assess the diagnostic accuracy of two previously described real-time PCR assays targeting ribosomal sequences of *C. belli* [28,33] in a test comparison without a reference standard [37,38]. To ensure increased pretest-probability, residual DNA eluates from stool samples of HIV patients from tropical Ghana [40–42] and of soldiers after tropical deployment in the Democratic Republic of the Congo and Gabon [43] were chosen for the assessments, so *C. belli* infections could

be considered as likely [1–12]. In people living with HIV/AIDS, prevalence values for *C. belli* in stool samples ranging between 0.4% and 15% in a left-shifted distribution had been recorded previously [3–12]. Thereby, prevalence rates higher than 5% had been predominantly observed in symptomatic patients with advanced AIDS-associated immunosuppression as reported from Mali [10] as well as in HIV-patients in Central and South America [6,9] compared to lower prevalence rates in Sub-Saharan African [3–5,11] or South East Asian [7] HIV-patients.

The calculated test accuracy-adjusted *C. belli* prevalence of 3.2% for a population comprising predominantly Ghanaian HIV patients within different stages of the infection was well in the expected range and in line with previous reports [3–5,11]. The single positively tested stool sample from a subpopulation of 95 German soldiers after deployment in Central Africa, in contrast, confirms the expectation of low prevalence, because cystoisosporiasis is rare in subpopulations without specific preselection for immunosuppression [13]. Indeed, to the best of the authors' knowledge, this is the first published case of a German soldier presenting with PCR-based evidence of *C. belli*, while a recent surveillance report on infectious diseases in German soldiers after tropical deployments failed to indicate any cystoisosporiasis cases [43]. As both applied PCRs detected a positive result, with Ct values of 35.31 in the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and of 31.33 in the ITS-2 sequence PCR, respectively, a false positive result can be considered as unlikely. So, this case confirms the previous observation that individual cases of cystoisosporiasis in immunocompetent hosts have a high likelihood of going undetected in case of sole reliance on microscopic diagnosis [24], because the respective stool sample had been previously assessed by microscopy with a negative result for *C. belli* as reported elsewhere [43].

For both comparatively assessed real-time PCR assays, the applied latent class analysis suggested excellent specificity close to 100%. With focus on sensitivity, the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR scored slightly poorer than the ITS-2 sequence PCR, with calculated values of 92.8% and 100%, respectively. Although the low numbers of positive samples resulted in broad 95%-confidence intervals, the calculated sensitivity values obtained from the test comparison without a reference standard nearly perfectly matched previously reported values in comparison to microscopy of 93% for the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR assay [28] and of 100% for the ITS-2 sequence PCR assay [33], respectively. In contrast to a previous assessment [28], however, it could be shown that specificity of the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR is considerably better than the previously recorded 93% [28] and virtually 100% instead. This result is not surprising, as sensitivity restrictions of microscopy-based diagnosis of protozoa in human stool samples, even if performed by well-trained personnel from reference laboratories, have been reported [44,45], so it is likely that presumed false positive real-time PCR results from the previous assessment [28] had in fact indicated true positive stool samples which had gone undetected by microscopy due to low parasite loads.

Noteworthy, almost perfect agreement [39] between both assessed real-time PCR assays was recorded. Thereby, the discrepancies were simply due to 4 additional positive results of the ITS-2 sequence PCR, while all positive results of the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR could be confirmed by the competitor assay. So, if higher sensitivity is desired, the ITS-2 sequence PCR assay is preferable, while the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR may be considered for confirmation testing.

Interestingly, the Ct values of the samples positive in the ITS-2 sequence PCR but negative in the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR were higher than the average value albeit lower than the maximum recorded Ct values in the ITS-2 sequence PCR. So, it remains questionable whether stochastic effects of target DNA quantities close to the limit-of detection alone may have accounted for the discrepant results. As differentiation between sensitivity and specificity problems may be challenging on an individual level, a positive result in the more sensitive ITS-2 sequence PCR alone may be considered to define a probable case of a *C. belli* infection. In case of an additional positive result in the slightly more specific 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR, such a probable case could become a

confirmed case. Considering the excellent specificity values of both PCR assays, however, a practical need for combined screening and confirmation testing for *C. belli* in stool is at least debatable and its usefulness will largely depend on the expected pretest probability as well as on the prevalence-dependent predictive values in line with Bayes' theorem [37].

The study has a number of limitations. First, microscopic results were not available for the most residual materials and thus could not be included as a reference standard. Accordingly, latent class analysis was chosen for a test comparison without a reference standard [37,38]. Second, although samples with a comparably high pretest probability were chosen for the assessments [40–42], cystoisosporiasis remains a rare disease. Accordingly, low absolute numbers of positive samples were recorded, leading to large 95%-confidence intervals in the LCA-assessments. Accordingly, considering the rare occurrence of the disease and the scarce availability of reference materials for respective test comparisons, a residual uncertainty regarding the reliability of the calculated test characteristics remains. Third, potential effects of nucleic acid extraction on the diagnostic sensitivity of the applied *C. belli*-specific real-time PCRs were not assessed, while such influences had been indicated by a previous report [36]. Although this report had suggested increased sensitivity after semi-automated EZ-1-based nucleic acid extraction (Qiagen, Hilden, Germany) compared to the column-based QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen), we preferred the column-based nucleic acid extraction from the stool samples due to comparably lower sample inhibition rates, as reported elsewhere [46]. Indeed, the inhibition rates of the samples from the soldiers were in the expected range for column-based nucleic acid extraction with 2.1% (2/95) [46]. In contrast, the inhibition rate of the Ghanaian stool samples was moderately higher, with 3.4% (31/905); most likely a consequence of challenging sample storage and transport conditions associated with studies in the Sub-Saharan tropics as discussed elsewhere [37,47].

4. Materials and Methods

4.1. Study Population

A total of 1000 residual nucleic acid extractions from stool samples obtained from Ghanaian HIV patients (n = 905) (descriptions of the population in [40–42]) and German military returnees from tropical deployments in the Democratic Republic of the Congo and Gabon (n = 95) (description of the population in [43]) were included in the assessments in order to ensure an appropriate pretest probability. At the time of the test comparison, the samples were between 7 and 14 years of age. The residual DNA had been stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to the analyses. Microscopical results were not available. Patient-specific data such as age, sex, or medical history are not provided in line with the ethical clearance, allowing the use of fully anonymized residual materials for test comparisons only. This lack of information is an admitted violation of the STARD (Standards for Reporting Diagnostic Accuracy) criteria [48].

4.2. Nucleic Acid Extraction

Nucleic acids from the stool samples had been extracted using the QIAamp stool DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described by the manufacturer. After nucleic acid extraction, the eluates had been stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the assessments.

4.3. Applied Real-Time PCR Assays

Two *C. belli*-specific in-house real-time PCR assays targeting a 213-base-pair fragment of the combined 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence [28] as well as an 89-base-pair fragment of the ITS-2 sequence alone [33] were applied in this study with all sample materials. The oligonucleotides are shown in Table 3.

Both assays were run on magnetic induction cyclers (MIC, Bio Molecular Systems Ltd., London, UK) applying the following protocol: Initial heating to $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min followed by 45 cycles of denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s and annealing as well as amplification at $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 s with a subsequent final step of cooling to $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 s. The reaction mix

consisted of HotStarTaq mastermix (Qiagen) and a final Mg^{2+} concentration of 5 mM for both assays. For the 5.8S rRNA gene/ITS-2 assay, primer concentrations were 0.3 pmol/ μ L and the probe concentration 0.2 pmol/ μ L; for the ITS-2 assay, primer concentrations were 0.06 pmol/ μ L and the probe concentration 0.2 pmol/ μ L. The assays were run in 20 μ L volumes with 5 μ L DNA eluate. Each run was accompanied by a positive control based on a plasmid (pEX-A128 vector backbone with the insert sequence as shown in the Table A1) and a negative control using PCR-grade water. An inhibition control PCR targeting Phocid herpes virus DNA as described previously [49] was run as well. The limits of detection (lod) of both assays were calculated applying a dilution series of the positive control plasmid and the software SciencePrimer.com (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>, last accessed on 13 July 2021). Thereby, the calculated lod was <10 copies/ μ L for both assays.

Table 3. Oligonucleotides as applied with the 213-base-pair fragment of the combined 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence [28] as well as with the 89-base-pair fragment of the ITS-2 sequence alone [33].

Forward Primer Name	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Name	Reverse Primer Sequence	Probe Name	Probe Sequence
Real-time PCR targeting a combined 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence fragment of <i>C. belli</i>					
Cys Ib-213-F	5'-GGATATTCCC TGCAGCATGT-3'	Cys Ib-213-R	5'-CGGGACACA ACTCAACTG-3'	Cys Ib-213-P	5'-GTCACAGCG GCGTTACGC-3'
Real-time PCR targeting the ITS-2 sequence of <i>C. belli</i>					
Cys Ib-40-F	5'-ATATTCCCTGCAG CATGTCTGTTT-3'	Cys Ib-129-R	5'-CCACACGCGT ATTCCAGAGA-3'	Cys Ib-81-P	5'-CAAGTTCTGCTC ACGCGTTCTGG-3'

4.4. Exclusion Criteria

Inhibited residual DNA samples as indicated by the applied inhibition control PCR [49] were excluded from further statistical assessments.

4.5. Statistics

Sensitivity and specificity of both assays as well as accuracy-adjusted *C. belli*-prevalence within the study population were identified applying latent class analysis (LCA) [37,38]. Fleiss' kappa for the agreement between the assays was calculated and interpreted as described previously [39]. Further, the cycle threshold values of both assays were compared. The statistical analysis was performed using the software Stata/IC 15.1 for Mac 64-bit Intel (College Station, TX, USA).

4.6. Ethics

Ethical clearance for the comparative test evaluation with fully anonymized residual sample materials was provided by the medical association of Hamburg, Germany, (reference number: WF-011/19, obtained on 11 March 2019) without requirement for informed consent.

5. Conclusions

In conclusion, the performed test evaluation without a reference standard confirmed suitability of both assessed real-time PCR assays for the diagnosis of *C. belli* in human stool samples. If optimum sensitivity is desired, the ITS-2 sequence PCR assay should be applied. In contrast, the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR assay may be considered for confirmation testing due to excellent specificity if confirmation of a diagnostic detection of *C. belli* is intended.

Author Contributions: Conceptualization, H.F., G.L. and U.L.; methodology, M.B., A.H. and H.F.; software, M.B. and A.H.; validation, M.B.; formal analysis, A.H.; investigation, M.B. and A.H.; resources, H.F., K.A.E., T.F., F.S.S., V.D.C. and U.L.; data curation, M.B. and A.H.; writing—original draft preparation, M.B. and H.F.; writing—review and editing, M.B., A.H., R.M.H., K.A.E., H.R., G.L.,

T.F., F.S.S., V.D.C., H.F. and U.L.; supervision, H.F., H.R. and R.M.H.; project administration, H.F.; funding acquisition, H.F. and U.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by grant 36K2-S-45 1922 “Evaluation and optimization of molecular diagnostic tests for tropical parasitic diseases for surveillance and risk assessment purposes in tropical deployment settings—a German–French cooperation project between the German Armed Forces Hospital Hamburg and the Military Hospital Laveran, Marseille” of the German Ministry of Defense (MoD) awarded to Hagen Frickmann. We acknowledge support by the Open Access Publication Funds of the Göttingen University.

Institutional Review Board Statement: Ethical clearance for the comparative test evaluation with fully anonymized residual sample materials was provided by the medical association of Hamburg, Germany, (reference number: WF-011/19, obtained on 11 March 2019) without requirement for informed consent. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are presented in the article. Raw data can be provided on reasonable request.

Acknowledgments: Simone Priesnitz and Annett Michel are gratefully acknowledged for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: G.L. is a representative of the company Tib MolBiol, 12103 Berlin, Germany. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A

Table A1. Positive control plasmid insert used for the *C. belli*-specific real-time PCRs.

Positive Control Sequence Insert

```
5'-GGCGCTGTGGGGATATCCCTGCAGCATGTCTGTTTCAGTGTCTCTGAAGTTCAAGTTCCTGC
TCACGCGCTTCTGGGGGTGTCTCTGGAATACGCGTGTGGCAGTGTGACTGGATGTCTTGGGT
GTTGAGAAACAAGCTACTTGTGCTTCTAGAAAGCCGAACGTCATCCGAAATAGTCACAGCGGC
GTTTACGCGATCAAACAGTGTGAGTTGTGTCCCGAACATCTTTG-3'
```

References

- Dubey, J.P.; Almeria, S. *Cystoisospora belli* infections in humans: The past 100 years. *Parasitology* **2019**, *146*, 1490–1527. [[CrossRef](#)]
- Lindsay, D.S. *Cystoisospora* species insights from development in vitro. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *5*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gassama, A.; Sow, P.S.; Fall, F.; Camara, P.; Guèye-N’diaye, A.; Seng, R.; Samb, B.; M’Boup, S.; Aïdara-Kane, A. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int. J. Infect. Dis.* **2001**, *5*, 192–198. [[CrossRef](#)]
- Wumba, R.; Longo-Mbenza, B.; Menotti, J.; Mandina, M.; Kintoki, F.; Situakibanza, N.H.; Kakicha, M.K.; Zanga, J.; Mbanzulu-Makola, K.; Nseka, T.; et al. Epidemiology, clinical, immune, and molecular profiles of microsporidiosis and cryptosporidiosis among HIV/AIDS patients. *Int. J. Gen. Med.* **2012**, *5*, 603–611.
- Wumba, R.; Longo-Mbenza, B.; Mandina, M.; Odio, W.T.; Biligui, S.; Sala, J.; Breton, J.; Thellier, M. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite* **2010**, *17*, 321–328. [[CrossRef](#)]
- Rivero-Rodríguez, Z.; Hernández, A.; Bracho, Á.; Salazar, S.; Villalobos, R. Prevalence of intestinal microsporidia and other intestinal parasites in hiv positive patients from Maracaibo, Venezuela. *Biomedica* **2013**, *33*, 538–545. [[PubMed](#)]
- Saksirisampant, W.; Prownobon, J.; Saksirisampant, P.; Mungthin, M.; Siripatanapipong, S.; Leelayoova, S. Intestinal parasitic infections: Prevalences in HIV/AIDS patients in a Thai AIDS-care centre. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2009**, *103*, 573–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moreno-Camacho, A.; López-Vélez, R.; Muñoz Sanz, A.; Labarga-Echevarría, P. Intestinal parasitic infections and leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enferm. Infecc. Y Microbiol. Clin.* **1998**, *16* (Suppl. S1), 52–60.
- Raccurt, C.P.; Fouché, B.; Agnamey, P.; Menotti, J.; Chouaki, T.; Totet, A.; Pape, J.W. Presence of *Enterocytozoon bieneusi* associated with intestinal coccidia in patients with chronic diarrhea visiting an HIV center in Haiti. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *79*, 579–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Konate, A.; Minta, D.; Diarra, M.; Dolo, A.; Dembele, M.; Diarra, B.; Maiga, M.Y.; Traore, H.A.; Doumbo, O. Intestinal parasitosis during AIDS diarrhoea. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **2005**, *98*, 33–35. [[PubMed](#)]

11. Gassama, A.; Thiaw, B.; Dia, N.M.; Fall, F.; Camara, P.; Hovette, P.; Perret, J.L.; Gueye-Ndiaye, A.; Mboup, S.; Sow, P.S.; et al. Infective etiology of diarrhea in adults with HIV infection in Dakar: A case-control study on 594 patients. *Dakar Med.* **2001**, *46*, 46–50. [[PubMed](#)]
12. Höfler, W. Current questions in parasitology and infection prevention. *Das Öffentliche Gesundh.* **1990**, *52*, 432–437.
13. Koltas, I.S.; Elgun, G.; Demirkazık, M. The importance of real-time polymerase chain reaction method in diagnosis of intestinal parasites in cases with diarrhea. *Trop. Biomed.* **2017**, *34*, 895–902. [[PubMed](#)]
14. Dokmaikaw, A.; Suntaravitun, P. Prevalence of Parasitic contamination of cockroaches collected from fresh markets in Chachoengsao province, Thailand. *Kobe J. Med. Sci.* **2020**, *65*, E118–E123. [[PubMed](#)]
15. Teichroeb, J.A.; Kutz, S.J.; Parkar, U.; Thompson, R.C.; Sicotte, P. Ecology of the gastrointestinal parasites of *Colobus vellerosus* at Boabeng-Fiema, Ghana: Possible anthrozoönotic transmission. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2009**, *140*, 498–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Noor, M.; Katzman, P.J.; Huber, A.R.; Findeis-Hosey, J.J.; Whitney-Miller, C.; Gonzalez, R.S.; Zhou, Z.; N'kodia, H.D.; Skonick, K.; Abell, R.L.; et al. Unexpectedly high prevalence of *Cystoisospora belli* infection in acalculous gallbladders of immunocompetent patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **2019**, *151*, 100–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Akateh, C.; Arnold, C.A.; Benissan-Messan, D.; Michaels, A.; Black, S.M. *Cystoisospora belli* gallbladder infection in a liver transplant donor. *Case Rep. Infect. Dis.* **2018**, *2018*, 3170238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Swanson, E.A.; March, J.K.; Clayton, F.; Couturier, M.R.; Arcega, R.; Smith, R.; Evason, K.J. Epithelial inclusions in gallbladder specimens mimic parasite infection: Histologic and molecular examination of reported *Cystoisospora belli* infection in gallbladders of immunocompetent patients. *Am. J. Surg. Pathol.* **2018**, *42*, 1346–1352. [[CrossRef](#)]
19. Gopinath, A.; Mubeen, A.; Baskovich, B.; Ginn, A.; Shukri, A.; Menes, M.; Kenneth, K.; Makary, R.; Herrera, G.A.; Masood, S.; et al. Ultrastructural characteristics of gallbladder epithelial inclusions mimicking *Cystoisospora*. *Am. J. Clin. Pathol.* **2020**, *153*, 88–93. [[CrossRef](#)]
20. Velásquez, J.N.; di Risio, C.A.; Etchart, C.B.; Chertcoff, A.V.; Nigro, M.G.; Pantano, M.L.; Ledesma, B.A.; Vittar, N.; Carnevale, S. First report of *Cystoisospora belli* parasitemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Acta Parasitol.* **2016**, *61*, 172–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Cama, V.A.; Mathison, B.A. Infections by intestinal coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clin. Lab. Med.* **2015**, *35*, 423–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Curry, A.; Smith, H.V. Emerging pathogens: *Iso*spora, *Cyclo*spora and microsporidia. *Parasitology* **1998**, *117*, S143–S159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Legua, P.; Seas, C. *Cystoisospora* and *Cyclospora*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2013**, *26*, 479–483. [[CrossRef](#)]
24. Woon, S.A.; Yang, R.; Ryan, U.; Boan, P.; Prentice, D. Chronic *Cystoisospora belli* infection in an immunocompetent Myanmar refugee—Microscopy is not sensitive enough. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Resende, D.V.; Pedrosa, A.L.; Correia, D.; Cabrine-Santos, M.; Lages-Silva, E.; Meira, W.S.; Oliveira-Silva, M.B. Polymorphisms in the 18S rDNA gene of *Cystoisospora belli* and clinical features of cystoisosporosis in HIV-infected patients. *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 679–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Samarasinghe, B.; Johnson, J.; Ryan, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Exp. Parasitol.* **2008**, *118*, 592–595. [[CrossRef](#)]
27. Agholi, M.; Shahabadi, S.N.; Motazedian, M.H.; Hatam, G.R. Prevalence of enteric protozoan oocysts with special reference to *Sarcocystis cruzi* among fecal samples of diarrheic immunodeficient patients in Iran. *Korean J. Parasitol.* **2016**, *54*, 339–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Taniuchi, M.; Verweij, J.J.; Sethabutr, O.; Bodhidatta, L.; Garcia, L.; Maro, A.; Kumburu, H.; Gratz, J.; Kibiki, G.; Houpt, E.R. Multiplex polymerase chain reaction method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and microsporidia in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *71*, 386–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Verweij, J.J.; Stensvold, C.R. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 371–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Murphy, S.C.; Hoogestraat, D.R.; Sengupta, D.J.; Prentice, J.; Chakrapani, A.; Cookson, B.T. Molecular diagnosis of cystoisosporiasis using extended-range PCR screening. *J. Mol. Diagn.* **2011**, *13*, 359–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Müller, A.; Bialek, R.; Fätkenheuer, G.; Salzberger, B.; Diehl, V.; Franzen, C. Detection of *Iso*spora *belli* by polymerase chain reaction using primers based on small-subunit ribosomal RNA sequences. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *19*, 631–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lalonde, L.F.; Reyes, J.; Gajadhar, A.A. Application of a qPCR assay with melting curve analysis for detection and differentiation of protozoan oocysts in human fecal samples from Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *89*, 892–898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ten Hove, R.J.; van Lieshout, L.; Brienen, E.A.; Perez, M.A.; Verweij, J.J. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Iso*spora *belli* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *61*, 280–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stark, D.; Roberts, T.; Ellis, J.T.; Marriott, D.; Harkness, J. Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *78*, 149–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Huibers, M.H.W.; Moons, P.; Maseko, N.; Gushu, M.B.; Iwajomo, O.H.; Heyderman, R.S.; Boele van Hensbroek, M.; Brienen, E.A.; van Lieshout, L.; Calis, J.C.J. Multiplex real-time PCR detection of intestinal protozoa in HIV-infected children in Malawi:

- Enterocytozoon bieneusi* is common and associated with gastrointestinal complaints and may delay BMI (nutritional status) recovery. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2018**, *37*, 910–915. [[CrossRef](#)]
36. Menu, E.; Mary, C.; Toga, I.; Raoult, D.; Ranque, S.; Bittar, F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 206. [[CrossRef](#)]
 37. Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds—a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Qu, Y.; Tan, M.; Kutner, M.H. Random effects models in latent class analysis for evaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* **1996**, *52*, 797–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 39. Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 40. Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; et al. *Helicobacter pylori* coinfection is associated with decreased markers of immune activation in ART-naïve HIV-positive and in HIV-negative individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 1615–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 41. Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with higher CD4 T cell counts and lower HIV-1 viral loads in ART-naïve HIV-positive patients in Ghana. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143388. [[CrossRef](#)]
 42. Tanida, K.; Hahn, A.; Eberhardt, K.A.; Tannich, E.; Landt, O.; Kann, S.; Feldt, T.; Sarfo, F.S.; Di Cristanziano, V.; Frickmann, H.; et al. Comparative assessment of in-house real-time PCRs targeting enteric disease-associated microsporidia in human stool samples. *Pathogens* **2021**, *10*, 656. [[CrossRef](#)]
 43. Schawaller, M.; Wiemer, D.; Hagen, R.M.; Frickmann, H. Infectious diseases in German military personnel after predominantly tropical deployments: A retrospective assessment over 13 years. *BMJ Mil Health* **2020**. [[CrossRef](#)]
 44. Utzinger, J.; Botero-Kleiven, S.; Castelli, F.; Chiodini, P.L.; Edwards, H.; Köhler, N.; Gulletta, M.; Lebbad, M.; Manser, M.; Matthys, B.; et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: A comparison among European reference laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 267–273. [[CrossRef](#)]
 45. Frickmann, H.; Hoffmann, T.; Köller, T.; Hahn, A.; Podbielski, A.; Landt, O.; Loderstädt, U.; Tannich, E. Comparison of five commercial real-time PCRs for in-vitro diagnosis of *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayentanensis*, and *Dientamoeba fragilis* in human stool samples. *Travel. Med. Infect. Dis.* **2021**, *41*, 102042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Frickmann, H.; Hinz, R.; Hagen, R.M. Comparison of an automated nucleic acid extraction system with the column-based procedure. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2015**, *5*, 94–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 47. Loderstädt, U.; Hagen, R.M.; Hahn, A.; Frickmann, H. New developments in PCR-based diagnostics for bacterial pathogens causing gastrointestinal infections—a narrative mini-review on challenges in the tropics. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 48. Bossuyt, P.M.; Reitsma, J.B.; Bruns, D.E.; Gatsonis, C.A.; Glasziou, P.P.; Irwig, L.; Lijmer, J.G.; Moher, D.; Rennie, D.; De Vet, H.C.W.; et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* **2015**, *351*, h5527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 49. Niesters, H.G. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* **2001**, *25*, 419–429. [[CrossRef](#)]

II. Zusammenfassende Darstellung der Publikation mit Abkürzungs- und Literaturverzeichnis

Vergleichende Validation von real-time PCR-Assays für den Nachweis von *Cystoisospora belli* als Testvergleich ohne Goldstandard

Einleitung

Bei *Cystoisospora belli* (*C. belli*), früher *Isospora belli*, handelt es sich um einen fäkal-oral übertragbaren, eukaryotischen Einzeller. [1] Der weltweit vorkommende Erreger ist in tropischen und subtropischen Regionen der Welt endemisch und wird zumeist durch kontaminiertes Trinkwasser und Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen. [2-5] *C. belli* verursacht das Krankheitsbild der Cystoisosporiasis.

Als bevorzugter Pathogenitätsmechanismus von *C. belli* gilt die Penetration des menschlichen Darmepithels mit weiterführender Vermehrung in selbigem, um als Resultat zum Teil schwere Gastroenteritiden mit wässrigen Diarrhoen auszulösen. Auch eine epitheliale Persistenz ist beschrieben und kann zu rezidivierenden Symptomatiken, selbst nach initial erfolgreicher medikamentöser Behandlung führen. Bei chronischen mit *C. belli* assoziierten Krankheitsverläufen können schwere Malabsorptionssyndrome und kritische Gewichtsverluste auftreten. [1,6]

Der Befall anderer Organsysteme wie zum Beispiel Milz, Leber, Lymphknoten, Niere sowie Gallenblase ist bekannt, begünstigt inflammatorische Prozesse innerhalb dieser Kompartimente und dient zudem der Erregerpersistenz im Wirt oder in Wirtsorganismen. [7-11]

Eminente klinische Bedeutung besitzt der Erreger bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere infolge einer HIV-Infektion oder im Zusammenhang mit chemotherapeutischen bzw. immunsuppressiven Behandlungskonzepten maligner oder automimmunvermittelter Grunderkrankungen. [12,13]

Bei einer HIV-Infektion ist die Schwere der klinischen Verläufe abhängig von der Anzahl der CD4-positiven T-Helferzellen (cluster of differentiation 4-Rezeptor = CD4-Rezeptor). Eine Zunahme parasitärer Infektionsfälle kann insbesondere mit einem Abfall der T-Helferzellen unterhalb von 200 Zellen/Mikroliter verzeichnet werden. [14-16]

Mit Durchfällen assoziierte Infektionskrankheiten stellen bei HIV-positiven sowie bei Patienten mit stark eingeschränkter Immunkompetenz immer noch eine relevante Ursache für hohe Sterblichkeitsraten, insbesondere in Entwicklungsländern und Regionen der Welt ohne

geeignete medikamentöse Therapie der Grunderkrankung, dar. [17] Dabei werden 90% der Durchfallerkrankungen bei HIV-Patienten auf Parasiten zurückgeführt. [18]

Bei der im Vordergrund der Behandlung stehenden medikamentösen Therapie von klinisch manifesten Verlaufsformen der Cystoisosporiasis hat sich die Verabreichung von Cotrimoxazol (Trimethoprim und Sulfamethoxazol) als sehr effektiv und kostengünstig etabliert. [18,19] Als Alternative wurden beispielsweise die Anwendung von Sulfadoxin-Pyrimethamin und Roxithromycin beschrieben, letzteres insbesondere bei Unverträglichkeiten oder Allergien gegenüber Sulfonamiden. Trotz erfolgreicher initialer Behandlung sind bei dem zuvor erwähnten Risikokollektiv Rezidive zu verzeichnen, welche auf die obengenannten Persistenzstrategien von *C.belli* zurückzuführen sind.

Immunkompetente Träger, zum Beispiel Reiserückkehrer aus den Endemiegebieten, können ebenfalls behandlungswürdige klinische Symptome, aber auch selbstlimitierende bzw. deutlich mildere bis asymptomatische Erkrankungsverläufe präsentieren. [20-26]

Der zuverlässige Erregernachweis stellt die Voraussetzung für eine zielgerichtete Therapie des Patienten dar. So gilt der stuhlmikroskopische Nachweis von Oozysten bislang als Standardnachweismethode bzw. „Goldstandard“ für die Diagnostik der Cystoisosporiasis. Diese Methode bietet aufgrund einer hohen Untersucherabhängigkeit allerdings Nachteile in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, besonders in Nicht-Endemiegebieten. Der Begriff „Goldstandard“ ist insofern irreführend, da er per Definition eine jeweils hundertprozentige Sensitivität und Spezifität impliziert. Gründe für die eingeschränkte diagnostische Akkuratheit der Oozystenmikroskopie sind beispielsweise die deutlich niedrigeren Inzidenzen in Nicht-Endemiegebieten und damit folglich eine geringere Diagnostikexpertise. [27-29] Aber auch eine nicht ausreichende Verfügbarkeit von Testmöglichkeiten (speziell in den Endemiegebieten) ist als problematisch in Hinblick auf Mortalität und Morbidität von vulnerablen Patientenkollektiven zu betrachten. [30]

Standardisierbare sowie standardisiert reproduzierbare Nachweisverfahren, wie die PCR-Methode, bieten potentiell eine sinnvolle Ergänzung bzw. einen diagnostischen Mehrwert, wie in dieser Dissertation untersucht, gegenüber der gegenwärtigen Goldstandard-Methode. [31] Mögliche Vorteile, insbesondere bezüglich der Sensitivität, wurden im Rahmen von vorausgegangenen Publikationen bereits diskutiert. [32,33]

Derzeit existieren jahrelange Anwendungserfahrungen vor allem zu den zwei *C. belli*-spezifischen real-time PCR-Assays von Ten Hove et al. 2008 [34] sowie Taniuchi et al. 2011 [35], wobei der zuerst erwähnte Assay bereits erfolgreich in epidemiologischen Screenings in tropischen Hochendemiegebieten eingesetzt wurde [34,36]. Der Assay von Taniuchi et al. wurde in Hinsicht auf Sensitivität und Spezifität mit der herkömmlichen Mikroskopiediagnostik verglichen. Beide Nachweismethoden zeigten in kleineren Evaluationen eine gute

Übereinstimmung mit dem Erwartungswert [35]. Die übrige Datenlage in Bezug auf die hier gegenständliche Alternativdiagnostik und deren Diagnostikgüte ist jedoch gering, so dass für den hier vorgestellten Testvergleich der beiden Assays für ein Format ohne Referenzstandard entschieden wurde.

Material und Methoden

In diesem Zusammenhang erschien es sinnvoll, eine vergleichende Validation der bereits existenten PCR-Assays von Ten Hove und Taniuchi anhand eines größeren Patientenkollektivs im Umfang von 1000 aufgereinigten Stuhlproben ohne „Goldstandard“ durchzuführen. Die Rekrutierung dieser Proben erfolgte einerseits aus einem Kollektiv von ghanaischen HIV-Patienten mit (n=905) sowie aus einem weiteren Kollektiv deutscher Soldaten (n=95), die als Tropenrückkehrer im Rahmen ihrer besonderen Auslandsverwendung Dienst in der Demokratischen Republik Kongo bzw. in Gabun leisteten. Hervorzuheben ist hierbei die vermutete substanzielle Vortestwahrscheinlichkeit der ghanaischen HIV-Patienten in Bezug auf eine mögliche *C.belli*-Infektion, aufgrund der oben geschilderten starken Assoziation mit einer HIV-Infektion.

Die beiden etablierten PCR-Assays detektieren ribosomale RNA-Gensequenzen (Darstellung der entsprechenden Oligonukleotide in Tabelle 3 der Originalpublikation) von *C. belli*. Dies betrifft einerseits die ITS2-Sequenz (Spacer-2-region) in beiden Assays sowie zusätzlich die 5,8S-Untereinheit der ribosomalen RNA im Assay von Taniuchi et al. [35]

Ergebnisse

Von den 1000 getesteten Stuhlproben mussten 33 ausgeschlossen werden, da Hinweise auf eine Probenhemmung vorlagen. Hierbei konnten im Kollektiv der ghanaischen Probanden 31 sowie im Kollektiv der Soldatenrückkehrer 2 gehemmte Proben detektiert werden. Die Inhibitionen wurde anhand der ausbleibenden real-time Detektion von PhHV-1- [Phocid Herpes Virus type 1-] DNA auf dem für die Inhibitionskontroll-PCR genutzten Kombiplasmid (Tabelle A1 der Originalpublikation) nachgewiesen. Die Gesamtzahl der auswertbaren Proben verringerte sich daher auf n=967.

33 positive Ergebnisse konnten durch das Prozessieren des Assays „ITS-2-Sequenz“ (Ten Hove et al.) detektiert werden, 29 durch den Alternativ-Assay „5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz“ (Taniuchi et al., Tabelle 1 der Originalpublikation). Besondere Beachtung fand ein positives Resultat aus dem Soldatenkollektiv, welches durch beide Assays bestätigt werden konnte. Ein

entsprechendes Ergebnis in einem deutschen Soldatenkollektiv war zuvor noch nicht publiziert worden.

Durch Anwendung der Latent-Class-Analyse (latent class analysis; LCA) wurde eine genauigkeitsbereinigte Prävalenz von 3,2% bestimmt. Die ebenfalls LCA-gestützt berechnete Sensitivität und Spezifität der beiden Assays ergaben:

- a) 100 % Sensitivität und 99,8 % Spezifität für die ITS-2-Sequenz-PCR sowie
- b) 92,8 % Sensitivität und 100 % Spezifität für die 5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR.

Die Übereinstimmungen der Assays wurden nach Fleiss' Kappa berechnet und erbrachten einen Wert von 0,933, was eine nahezu perfekte Konkordanz bestätigte (Tabelle 1 der Originalpublikation).

Der Vergleich der ermittelten Ct-Werte ergab eine geringe Abweichung für die Mittelwerte und Mediane. Für die ITS-2-Sequenz-PCR ergaben sich Werte von 30,66 (Mittelwert) und 31,33 (Median) gegenüber der 5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR mit 31,57 (Mittelwert) und 31,45 (Median). Ebenfalls konnte eine relativ gute Übereinstimmung bei den Standardabweichungen von 4,27 (ITS-2-Sequenz-PCR) zu 4,14 (5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR) beobachtet werden (Tabelle 2).

Beim Vergleich der beiden Assays wurden bei der adaptierten Vorgehensweise nach Ten Hove et al. 4 zusätzliche positive PCR-Signale für *C. belli* im Vergleich zum Taniuchi-Assay detektiert. Die hierbei aufgezeichneten Ct-Werte für die diskordant gemessenen Proben lagen zwischen 33,96 und 35,50 und damit über den verzeichneten Ct-Mittel- und Medianwerten. Sie lagen jedoch immer noch unterhalb der im Rahmen der Studie gemessenen Höchstwerte (hier 36,89).

Diskussion

Die in der Publikation berechnete genauigkeitsbereinigte Prävalenz von 3,2%, welche abzüglich des soldatischen Kollektivs für die ghanaischen Probanden 3,49% beträgt, ist mit bekannten Prävalenzwerten für *C. belli* bei HIV/AIDS-Erkrankten anderer Veröffentlichungen der Vorjahre vergleichbar und liegt daher im erwartbaren Bereich. Diese Arbeiten ergaben Prävalenzen zwischen 0,4% und 15% mit einer linksverschobenen Verteilung [37-46]. Hohe Prävalenzraten von mehr als 5% konnten insbesondere bei stark immunsupprimierten Patienten mit vorangeschrittener Grunderkrankung in Mittel- und Südamerika [40,43] sowie Mali [44] erhoben werden. Niedrigere Prävalenzraten zeigten sich in der Subsahararegion generell [37,38,45] sowie in Südostasien. Die hier (überwiegend) ghanaischen HIV-Patienten

in verschiedenen Krankheitsstadien können also am ehesten der zuletzt erwähnten Prävalenzgruppe zugeordnet werden.

Besondere Aufmerksamkeit erzielte das positive Einzelergebnis in der deutschen soldatischen Teilpopulation. Bei insgesamt 95 untersuchten Probanden kann am ehesten von einem zufälligen Befund ausgegangen werden, da aufgrund der generellen gesundheitlichen Voraussetzungen dieses Kollektivs (keine bekannte Immunsuppression, aufwendige Gesundheitsversorgung/Prävention durch den zentralen Sanitätsdienst der Bundeswehr) das Auftreten einer Cystoisosporiasis weitaus weniger wahrscheinlich ist [31]. Da für diese Probe beide PCR-Assays mit akzeptablen Ct-Werten von 35,3 in der 5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR und von 31,3 in der ITS-2-Sequenz-PCR einen positiven Befund auswiesen, ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines falsch positiven Befundes gering. Vielmehr ist dieser positive Befund nach gegenwärtiger Kenntnis sogar der erste veröffentlichte PCR-basierte Nachweis für *C. belli* bei einem deutschen Soldaten. In einem aktuellen Überwachungsbericht zu Infektionskrankheiten bei deutschen Soldaten nach Einsatz in den Tropen konnten keine Hinweise zu bekannten Cystoisosporiasisfällen ermittelt werden [47]. In diesem Kontext erhärtet sich die Annahme, dass eine alleinige mikroskopische Diagnostik keine Detektion bei mutmaßlich niedriger Parasitenlast ermöglicht hätte, was die oben geschilderten Hinweise auf eine mögliche Überlegenheit eines PCR-Screening gegenüber der klassischen Mikroskopie stützt. Dies gilt umso mehr, da die in Rede stehende Stuhlprobe nach mikroskopischer Diagnostik am NRZ (Nationales Referenzzentrum, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin), wo von hinreichender mikroskopischer Erfahrung ausgegangen werden darf, mit negativem Ergebnis für *C. belli* befundet wurde [47]. Die Aussagekraft solcher Einzelfälle bleibt jedoch beschränkt. Schlussendlich könnte dennoch gefolgert werden, dass einzelne Fälle von Cystoisosporiasis insbesondere bei immunkompetenten Wirten, wo mit niedriger Parasitenlast gerechnet werden kann, mittels alleiniger mikroskopischer Diagnostik mit hoher Wahrscheinlichkeit unentdeckt bleiben würden [25].

Als Maß für die diagnostische Akkuratheit eines diagnostischen Tests müssen Sensitivität und Spezifität begutachtet werden. Im Vergleich der beiden hier betrachteten real-time-PCR-Assays ergab die angewandte Latent-Class-Analyse eine hervorragende Spezifität von nahezu 100%. Dies konnte für die Sensitivität der ITS-2-Sequenz-PCR mit einem Wert von 100% wiederholt werden, wohingegen die Sensitivitätsschätzung für die 5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR mit einem Wert von 92,8% etwas schlechter ausfiel. Der, im Verhältnis zu hypothetischen noch größer angelegten Studien, geringe n-Wert an positiv-getesteten Proben des hiesigen Studienkollektivs hat breite 95%-Konfidenzintervalle zur Folge. Dennoch stimmten die hier berechneten Sensitivitätswerte ohne Referenzstandard nahezu deckungsgleich mit den zuvor berichteten Werten im Vergleich zur Mikroskopie von 93 % für den 5,8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR-Assay (92,8%) [35] bzw. von 100% für das ITS-2-

Sequenz-PCR-Assay [34] überein. Dabei konnte der Assay der 5.8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR deutlich bessere Werte für die Spezifität als in der Vergangenheit erzielen (100% vs. 93%) [35]. Als ursächlich für diese zuvor scheinbar reduziert gemessene Spezifität können insbesondere Sensitivitätseinschränkungen der mikroskopischen Diagnostik von Protozoen in menschlichen Stuhlproben diskutiert werden. Die Detektionsfähigkeit des menschlichen Auges hinsichtlich Protozoen in komplexer Probenmatrix ist selbst bei besonders qualifizierten Diagnostikern von Referenzlaboren einer PCR-Methode meist unterlegen [48,49], auch weil im Rahmen einer PCR-Diagnostik bereits Fragmente bzw. kleinere Bestandteile des Erregers nachgewiesen werden, die durch menschliche Sinne nicht zu detektieren sind. So führt in der mikroskopischen Diagnostik lediglich die Sichtung von Oozysten zu einem positiven Resultat. Der zuvor erhobene Spezifitätswert von 93% kann daher am ehesten über als falsch positive gewertete Real-Time-PCR-Ergebnisse aus der vorherigen Untersuchung [35] erklärt werden, welche aufgrund einer geringen Parasitendichte in der Mikroskopie unentdeckt blieben.

Im Vergleich der beiden hier getesteten PCR-Assays zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung, wobei Diskordanz lediglich für 4 zusätzliche positive Ergebnisse der ITS-2-Sequenz-PCR bestand. Alle weiteren positiven Ergebnisse der 5.8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR konnten auch durch den Vergleichs-Assay abgebildet werden. Hierbei ist zu bemerken, dass die ermittelten Ct-Werte der 4 diskordant als positiv getesteten Stuhlproben höher als der durchschnittlich ermittelte Ct-Wert des 5.8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR-Assays waren, wenn auch unterhalb des Maximalwertes (Ct-Wert 36,89), der im Rahmen der Studie mit dem ITS-2-Sequenz-PCR-Assay gemessen wurde. Die etwas bessere Sensitivität ist somit wohl am ehesten Folge einer geringfügig niedrigeren technischen Nachweisgrenze des ITS-2-Sequenz-PCR-Assays.

Bei dem Wunsch nach einer höheren Sensitivität wäre der ITS-2-Sequenz-PCR-Assay somit vorzuziehen, während die 5.8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR für Bestätigungstests in Betracht gezogen werden kann. Angesichts der hervorragenden Spezifitätswerte beider PCR-Assays ist jedoch ein praktischer Bedarf an kombinierten Screening- und Bestätigungstesten für *C. belli* im humanen Stuhl fraglich.

Bestehende Einschränkungen bei der Interpretation der hier ermittelten Ergebnisse sollen nicht unerwähnt bleiben. Der initial betitelte „Goldstandard“ der Diagnostik von *C. belli*, die Mikroskopie, konnte nicht für alle der hier getesteten Stuhlproben zum Abgleich herangezogen werden, sodass ein Testvergleich ohne Referenzstandard mittels Latent-Class-Analyse zur Schätzung der diagnostischen Akkuratheit gewählt wurde [50,51]. Weiterhin ist die Cystoisosporiasis eine seltene Erkrankung, was trotz vergleichsweise hoher Prätestwahrscheinlichkeit der hier gewählten Stuhlproben [52-54] aufgrund der insgesamt dennoch geringen Zahl positiver PCR-Ergebnisse zu großen 95-%-Konfidenzintervallen in der

Latent-Class-Analyse geführt hat. Die Seltenheit der Erkrankung und schwierige Beschaffung von geeigneten Referenzmaterialien hat zu Folge, dass die Zuverlässigkeit der berechneten Testcharakteristika weiterhin mit einer Restunsicherheit belegt ist.

Da zur diagnostischen Verwertbarkeit der Stuhlproben eine Aufreinigung bzw. Nukleinsäureextraktion notwendig war und es bereits Berichte über diesbezügliche Einflüsse auf die Testsensitivität gab [55], soll hier auf die Bevorzugung des säulenbasierten QIAamp DNA Stool Mini Kits (Qiagen) gegenüber der halbautomatischen EZ-1-basierten Nukleinsäureextraktion (Qiagen) eingegangen werden. Im erwähnten Bericht [55] wurde zwar eine bessere Sensitivität für die halbautomatische Extraktion beschrieben, gleichzeitig konnte die säulenbasierte Extraktion durch eine geringere Probenhemmungsrate überzeugen [56], weshalb die Wahl bei der Extraktion der n = 1000 Stuhlproben somit auf das säulenbasierte QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) fiel.

Die ermittelten Hemmraten lagen mit 2,1 % (2/95 im soldatischen Kollektiv) im erwarteten Bereich [57], wohingegen die Hemmungsrate bei den ghanaischen Stuhlproben mit 3,4% (31/905) etwas erhöht war. Als ursächlich wurden am ehesten die Probenlagerungs- und Transportbedingungen angesehen, was auch in anderen Publikationen als mögliche Einflussgrößen diskutiert wurde (ebenfalls Tropenregion, südlich der Sahara) [50,58].

Konklusion: Zusammenfassend sind beide der hier beschriebenen real-time-PCR-Assays für die Diagnose von *C. belli* in menschlichen Stuhlproben geeignet, wobei der ITS-2-Sequenz-PCR-Assay bei dem Wunsch nach optimierter Sensitivität angewendet werden sollte. Der 5.8S rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR-Assay kommt aufgrund seiner hervorragenden Spezifität für Bestätigungstests in Betracht, falls die Bestätigung eines diagnostischen Nachweises von *C. belli* sinnvoll und notwendig erscheint.

Zusammenfassung in Deutscher und Englischer Sprache

Cystoisospora (C.) belli ist ein den Kokzidien zugehöriger Parasit, der bei immungeschwächten Patienten mit akuter oder chronischer Gastroenteritis assoziiert ist. Die Empfindlichkeit der Mikroskopie als diagnostisches Standardverfahren wird als unzureichend beschrieben. In der hier vorgestellten Studie wurden zwei Echtzeit-PCRs, die auf ribosomale RNA-Gensequenzen (Tabelle 3) von *C. belli* im Stuhl abzielen, in einem Testvergleich ohne Referenzstandard unter Verwendung der Latent-Class-Analyse (LCA) vergleichend untersucht. Dazu wurden insgesamt 1000 Stuhlproben, zum großen Teil von ghanaischen HIV-Patienten (n = 905) sowie soldatischen Einsatzrückkehrern aus den Tropen (n = 95) mit beiden Tests parallel untersucht. Nach dem Ausschluss von 33 Proben, die eine PCR-Hemmung (Sequenz Kombiplasmid siehe Tabelle A1) zeigten, wurden 29 bzw. 33 positive Ergebnisse mit der 5,8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-spezifischen PCR bzw. der ITS-2-Sequenz-spezifischen PCR registriert, was zu einer genauigkeitsbereinigten Prävalenz im untersuchten Kollektiv von 3,2% führte. Eine nahezu perfekte Übereinstimmung zwischen beiden Assays wurde durch Fleiss' Kappa von 0,933 bei einer Sensitivität und Spezifität von 92,8% und 100% sowie 100% und 99,8% für die 5,8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR bzw. die ITS-2-Sequenz PCR belegt (Tabelle 1). Beide Tests erwiesen sich als geeignet für den Diagnose von *C. belli* in menschlichen Stuhlproben mit einer etwas besseren Empfindlichkeit des ITS-2-Sequenz-Assays, während die 5,8S-rRNA-Gen/ITS-2-Sequenz-PCR zur Bestätigungstestung aufgrund ihrer geringfügig höheren Spezifität in Betracht gezogen werden kann.

Cystoisospora (C.) belli is a coccidian parasite associated with acute or chronic gastroenteritis in immunocompromised patients. Dissatisfactory sensitivity of microscopy as the diagnostic standard approach has been described. Here, two real-time PCRs targeting ribosomal RNA gene sequences (table 3) of *C. belli* in stool in a test comparison were comparatively evaluated without a reference standard applying latent class analysis. Therefore, 1000 stool samples mostly obtained from Ghanaian HIV (human immunodeficiency virus) patients (n = 905) as well as from military returnees from the tropics (n = 95) were assessed by both assays in parallel. After the exclusion of 33 samples showing PCR inhibition (positive control plasmid insert, table A1), 29 and 33 positive results were recorded with the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and the ITS-2 sequence PCR, respectively, resulting in an accuracy-adjusted prevalence of 3.2%. Nearly perfect agreement between both assays was indicated by Fleiss' kappa of 0.933 with sensitivity and specificity of 92.8% and 100% as well as 100% and 99.8% for the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR and the ITS-2 sequence PCR, respectively (table 1). Both assays proved to be suitable for the diagnosis of *C. belli* in human stool samples with slightly better sensitivity of the ITS-2 sequence assay, while the 5.8S rRNA gene/ITS-2 sequence PCR may be considered for confirmatory testing.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS.....	Acquired Immunodeficiency Syndrome
CD4.....	cluster of differentiation 4
Ct-Wert.....	Cycle threshold, Schwellenwertzyklus
C. belli.....	<i>Cystoisopora belli</i>
DNA.....	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
HIV.....	Human Immunodeficiency Virus
ITS (ITS2-Sequenz).....	internal transcribed spacer
LCA.....	latent class analysis, Latent-Class-Analyse
NRZ.....	Nationales Referenzzentrum, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
PCR.....	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PhHV-1.....	Phocine herpesvirus 1
RNA.....	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rRNA.....	ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure

Literaturverzeichnis

1. Dubey, J.P.; Almeria, S. *Cystoisospora belli* infections in humans: The past 100 years. *Parasitology* 2019, 146, 1490–1527.
2. Fitsum Bekele, Teha Shumbej. Fruit and vegetable contamination with medically important helminths and protozoans in Tarcha town, Dawuro zone, South West Ethiopia. *Res Rep Trop Med.* 2019 Apr 30;10:19-23. doi: 10.2147/RRTM.S205250. eCollection 2019.
3. Fitsum Bekele, Tamirat Tefera, Gelila Biresaw, Tsegaye Yohannes. Parasitic contamination of raw vegetables and fruits collected from selected local markets in Arba Minch town, Southern Ethiopia. *Infect Dis Poverty.* 2017 Mar 7;6(1):19. doi: 10.1186/s40249-016-0226-6.
4. A. Dokmaikaw, P. Suntaravitun. Prevalence of Parasitic Contamination of Cockroaches Collected from Fresh Markets in Chachoengsao Province, Thailand. *J Med Sci.* 2020 Feb 10;65(4):E118-E123.
5. Pennapa Chamavit, Panupong Sahaisook, Nunthawadee Niamnuy. The majority of cockroaches from the Samutprakarn province of Thailand are carriers of parasitic organisms. *EXCLI J.* 2011 Nov 22;10:218-222. eCollection 2011.
6. J A DeHovitz, J W Pape, M Boncy, W D Johnson Jr. Clinical manifestations and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1986 Jul 10;315(2):87-90. doi: 10.1056/NEJM198607103150203.
7. D A Benator, A L French, L M Beaudet, C S Levy, J M Orenstein. *Isospora belli* infection associated with acalculous cholecystitis in a patient with AIDS. *Ann Intern Med.* 1994 Nov 1;121(9):663-4. doi: 10.7326/0003-4819-121-9-199411010-00006.
8. Mahmoud Agholi, Elham Aliabadi, Gholam Reza Hatam. *Cystoisosporiasis*-related human acalculous cholecystitis: the need for increased awareness. *Pol J Pathol.* 2016;67(3):270-276. doi: 10.5114/pjp.2016.63779.
9. Hideo Takahashi, Gavin A Falk, Michael Cruise, Gareth Morris-Stiff. Chronic cholecystitis with *Cystoisospora belli* in an immunocompetent patient. Hideo Takahashi et al. *BMJ Case Rep.* 2015 Jun 11;2015:bcr2015209966. doi: 10.1136/bcr-2015-209966.
10. C Restrepo, A M Macher, E H Radany. Disseminated extraintestinal isosporiasis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1987 Apr;87(4):536-42. doi: 10.1093/ajcp/87.4.536.
11. J F Michiels, P Hofman, E Bernard, M C Saint Paul, C Boissy, V Mondain, Y LeFichoux, R Loubiere. Intestinal and extraintestinal *Isospora belli* infection in an AIDS patient. A second case report. J F Michiels et al. *Pathol Res Pract.* 1994 Nov;190(11):1089-93; discussion 1094. doi: 10.1016/S0344-0338(11)80908-8.
12. A Curry, H V Smith. Emerging pathogens: *Isospora*, *Cyclospora* and microsporidia. *Parasitology.* 1998;117 Suppl:S143-59. doi: 10.1017/s0031182099004904.

13. Bruno Fernandes Sanches, Joana Morgado, Nuno Carvalho, Rui Anjos. Multiple parasitic infections in a cardiac transplant recipient. *BMJ Case Rep.* 2015 Jun 24;2015:bcr2014207033. doi: 10.1136/bcr-2014-207033.
14. Chinnambedu R Swathirajan, Ramachandran Vignesh, Ambrose Pradeep, Sunil S Solomon, Suniti Solomon, Pachamuthu Balakrishnan. *Occurrence of enteric parasitic infections among HIV-infected individuals and its relation to CD4 T-cell counts with a special emphasis on coccidian parasites at a tertiary care centre in South India. Indian J Med Microbiol. Jan-Mar 2017;35(1):37-40. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_16_164.*
15. Márcia Benedita de Oliveira-Silva, Leonardo Rodrigues de Oliveira, Júlio César Possati Resende, Bethânea Crema Peghini, Luiz Eduardo Ramirez, Eliane Lages-Silva, Dalmo Correia. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop. Sep-Oct 2007;40(5):512-5. doi: 10.1590/s0037-86822007000500004.*
16. Ajay Malik, Janmeet Kulaar, Rajat Shukla, Vibha Dutta. Triple protozoal enteropathy of the small intestine in an immunocompromised male: A rare histopathology report. *J Crohns Colitis.* 2012 Mar;6(2):236-9. doi: 10.1016/j.crohns.2011.08.010. Epub 2011 Sep 16.
17. Kahsay Huruy, Afework Kassu, Andargachew Mulu, Netsanet Worku, Teshome Fetene, Simon Gebretsadik, Fantahun Biadlegne, Yeshambel Belyhun, Abebe Muche, Aschalew Gelaw, Belay Anagaw, Sisay Yifru, Yemataw Wondie, Asseggedech Bekele, Moges Tiruneh, Dieter Reissig, Feleke Moges. Intestinal parasitosis and shigellosis among diarrheal patients in Gondar teaching hospital, northwest Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2011 Oct 31;4:472. doi: 10.1186/1756-0500-4-472.
18. Sangeeta Kulkarni, Sudhir Patsute, Suvarna Sane, Madhuri Chandane, Pallavi Vidhate, Arun Risbud. Enteric pathogens in HIV infected and HIV uninfected individuals with diarrhea in Pune. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013 Oct;107(10):648-52. doi: 10.1093/trstmh/trt067. Epub 2013 Aug 4.
19. Masashi Ohno, Osamu Inatomi, Takayuki Imai, Kenichiro Takahashi, Shigeki Bamba, Keiji Konishi, Masaya Sasaki, Ryoji Kushima, Akira Andoh. Chronic cystoisosporiasis in an immunocompetent adult: A case report. *Masashi Ohno et al. Medicine (Baltimore).* 2021 Mar 12;100(10):e24890. doi: 10.1097/MD.00000000000024890.
20. Reza Shafiei, Mohsen Najjari, Ali Kargar Kheirabad, Golamreza Hatam. Severe Diarrhea Due To *Cystoisospora belli* Infection in an HTLV-1 Woman. *Iran J Parasitol.* Jan-Mar 2016;11(1):121-5.
21. C Junod. *Isospora belli* coccidiosis in immunocompetent subjects (a study of 40 cases seen in Paris). *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1988;81(3):317-25.
22. N Shaffer, L Moore. Chronic travelers' diarrhea in a normal host due to *Isospora belli*. *J Infect Dis.* 1989 Mar;159(3):596-7. doi: 10.1093/infdis/159.3.596.

23. C S Peters, S B Kathpalia, A L Chittom-Swiatlo, C A Kallick, R Sherer, F E Kocka. *Isospora belli* and *Cryptosporidium* sp. from a patient not suspected of having acquired immunodeficiency syndrome. *C S Peters et al. Diagn Microbiol Infect Dis.* 1987 Nov;8(3):197-9. doi: 10.1016/0732-8893(87)90173-8.
24. Masashi Ohno, Osamu Inatomi, Takayuki Imai, Kenichiro Takahashi, Shigeki Bamba, Keiji Konishi, Masaya Sasaki, Ryoji Kushima, Akira Andoh. Chronic cystoisosporiasis in an immunocompetent adult: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2021 Mar 12;100(10):e24890. doi: 10.1097/MD.00000000000024890.
25. Ana Pérez-Ayala, Begonia Monge-Maillo, Marta Díaz-Menéndez, Francesca Norman, José A Pérez-Molina, Rogelio López-Vélez. Self-limited travelers' diarrhea by *Isospora belli* in a patient with dengue infection. *J Travel Med.* 2011 May-Jun;18(3):212-3. doi: 10.1111/j.1708-8305.2010.00494.x. Epub 2011 Feb 7.
26. S Gupta, S Narang, V Nunavath, S Singh. *Chronic diarrhoea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites.* *Indian J Med Microbiol.* 2008 Apr-Jun;26(2):172-5. doi: 10.4103/0255-0857.40536.PMID: 18445958
27. Sze-Ann Woon, Rongchang Yang, Una Ryan, Peter Boan, David Prentice. Chronic *Cystoisospora belli* infection in an immunocompetent Myanmar refugee - microscopy is not sensitive enough. *BMC Infect Dis.* 2016 May 21;16:221. doi: 10.1186/s12879-016-1558-3.
28. Laura F Lalonde, Julissa Reyes, Alvin A Gajadhar. Application of a qPCR assay with melting curve analysis for detection and differentiation of protozoan oocysts in human fecal samples from Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Nov;89(5):892-8. doi: 10.4269/ajtmh.13-0106. Epub 2013 Sep 9.
29. Arun Gopinath, Aysha Mubeen, Brett Baskovich, Amber Ginn, Amal Shukri, Manual Menes, Keyler Kenneth, Raafat Makary, Guillermo A Herrera, Shahla Masood, Ahmad Alkhasawneh. Ultrastructural Characteristics of Gallbladder Epithelial Inclusions Mimicking *Cystoisospora*. Arun Gopinath et al. *Am J Clin Pathol.* 2020 Jan 1;153(1):88-93. doi: 10.1093/ajcp/aqz137.
30. Luis A Marcos, Eduardo Gotuzzo. Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis.* 2013 Aug;26(4):295-301. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283630be3.
31. I S Koltas, G Elgun, M Demirkazık. The importance of Real-Time Polymerase Chain Reaction method in diagnosis of intestinal parasites in cases with diarrhea. *Trop Biomed.* 2017 Dec 1;34(4):895-902.
32. Manish Katiyar, Reena Gulati, Sudhakar Pagal, Nonika Rajkumari, Rakesh Singh. Molecular detection of *Cystoisospora belli* by single-run polymerase chain reaction in stool samples. *Indian J Gastroenterol.* 2021 Sep 27. doi: 10.1007/s12664-021-01170-y.
33. Sean C Murphy, Daniel R Hoogestraat, Dhruva J Sengupta, Jennifer Prentice, Andrea Chakrapani, Brad T Cookson. Molecular diagnosis of cystoisosporiasis using extended-range PCR screening. *J Mol Diagn.* 2011 May;13(3):359-62. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.01.007. Epub 2011 Mar 31.

34. Ten Hove, R.J.; van Lieshout, L.; Brienen, E.A.; Perez, M.A.; Verweij, J.J. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 61, 280–283.
35. Taniuchi, M.; Verweij, J.J.; Sethabutr, O.; Bodhidatta, L.; Garcia, L.; Maro, A.; Kumburu, H.; Gratz, J.; Kibiki, G.; Houpt, E.R. Multiplex polymerase chain reaction method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and microsporidia in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, 71, 386–390.
36. Huibers, M.H.W.; Moons, P.; Maseko, N.; Gushu, M.B.; Iwajomo, O.H.; Heyderman, R.S.; Boele van Hensbroek, M.; Brienen, E.A.; van Lieshout, L.; Calis, J.C.J. Multiplex real-time PCR detection of intestinal protozoa in HIV-infected children in Malawi: *Enterocytozoon bieneusi* is common and associated with gastrointestinal complaints and may delay BMI (nutritional status) recovery. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018, 37, 910–915.
37. Gassama, A.; Sow, P.S.; Fall, F.; Camara, P.; Guèye-N'diaye, A.; Seng, R.; Samb, B.; M'Boup, S.; Aïdara-Kane, A. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int. J. Infect. Dis.* 2001, 5, 192–198.
38. Wumba, R.; Longo-Mbenza, B.; Menotti, J.; Mandina, M.; Kintoki, F.; Situakibanza, N.H.; Kakicha, M.K.; Zanga, J.; Mbanzulu-Makola, K.; Nseka, T.; et al. Epidemiology, clinical, immune, and molecular profiles of microsporidiosis and cryptosporidiosis among HIV/AIDS patients. *Int. J. Gen. Med.* 2012, 5, 603–611.
39. Wumba, R.; Longo-Mbenza, B.; Mandina, M.; Odio, W.T.; Biligui, S.; Sala, J.; Breton, J.; Thellier, M. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite* 2010, 17, 321–328.
40. Rivero-Rodríguez, Z.; Hernández, A.; Bracho, Á.; Salazar, S.; Villalobos, R. Prevalence of intestinal microsporidia and other intestinal parasites in hiv positive patients from Maracaibo, Venezuela. *Biomedica* 2013, 33, 538–545.
41. Saksirisampant, W.; Prownebon, J.; Saksirisampant, P.; Mungthin, M.; Siripatanapipong, S.; Leelayoova, S. Intestinal parasitic infections: Prevalences in HIV/AIDS patients in a Thai AIDS-care centre. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2009, 103, 573–581.
42. Moreno-Camacho, A.; López-Vélez, R.; Muñoz Sanz, A.; Labarga-Echevarría, P. Intestinal parasitic infections and leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enferm. Infecc. Y Microbiol. Clin.* 1998, 16 (Suppl. S1), 52–60.
43. Raccurt, C.P.; Fouché, B.; Agnamey, P.; Menotti, J.; Chouaki, T.; Totet, A.; Pape, J.W. Presence of *Enterocytozoon bieneusi* associated with intestinal coccidia in patients with chronic diarrhea visiting an HIV center in Haiti. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 79, 579–580.
44. Konate, A.; Minta, D.; Diarra, M.; Dolo, A.; Dembele, M.; Diarra, B.; Maiga, M.Y.; Traore, H.A.; Doumbo, O. Intestinal parasitosis during AIDS diarrhoea. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2005, 98, 33–35. [PubMed] Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals
45. Gassama, A.; Thiaw, B.; Dia, N.M.; Fall, F.; Camara, P.; Hovette, P.; Perret, J.L.; Gueye-Ndiaye, A.; Mboup, S.; Sow, P.S.; et al. Infective etiology of diarrhea in adults with HIV infection in Dakar: A case-control study on 594 patients. *Dakar Med.* 2001, 46, 46–50.

- 46 (12). Höfler, W. Current questions in parasitology and infection prevention. *Das Öffentliche Gesundh.* 1990, 52, 432–437.
47. Schawaller, M.; Wiemer, D.; Hagen, R.M.; Frickmann, H. Infectious diseases in German military personnel after predominantly tropical deployments: A retrospective assessment over 13 years. *BMJ Mil Health* 2020.
48. Utzinger, J.; Botero-Kleiven, S.; Castelli, F.; Chiodini, P.L.; Edwards, H.; Köhler, N.; Gulletta, M.; Lebbad, M.; Manser, M.; Matthys, B.; et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: A comparison among European reference laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16, 267–273.
49. Frickmann, H.; Hoffmann, T.; Köller, T.; Hahn, A.; Podbielski, A.; Landt, O.; Loderstädt, U.; Tannich, E. Comparison of five commercial real-time PCRs for in-vitro diagnosis of *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, and *Dientamoeba fragilis* in human stool samples. *Travel. Med. Infect. Dis.* 2021, 41, 102042.
50. Hahn, A.; Podbielski, A.; Meyer, T.; Zautner, A.E.; Loderstädt, U.; Schwarz, N.G.; Krüger, A.; Cadar, D.; Frickmann, H. On detection thresholds—a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta Trop.* 2020, 205, 105377.
51. Qu, Y.; Tan, M.; Kutner, M.H. Random effects models in latent class analysis for evaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* 1996, 52, 797–810.
52. Eberhardt, K.A.; Sarfo, F.S.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Geldmacher, C.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; et al. *Helicobacter pylori* coinfection is associated with decreased markers of immune activation in ART-naïve HIV-positive and in HIV-negative individuals in Ghana. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 61, 1615–1623.
53. Sarfo, F.S.; Eberhardt, K.A.; Dompok, A.; Kuffour, E.O.; Soltau, M.; Schachscheider, M.; Drexler, J.F.; Eis-Hübinger, A.M.; Häussinger, D.; Oteng-Seifah, E.E.; et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with higher CD4 T cell counts and lower HIV-1 viral loads in ART-naïve HIV-positive patients in Ghana. *PLoS ONE* 2015, 10, e0143388.
54. Tanida, K.; Hahn, A.; Eberhardt, K.A.; Tannich, E.; Landt, O.; Kann, S.; Feldt, T.; Sarfo, F.S.; Di Cristanziano, V.; Frickmann, H.; et al. Comparative assessment of in-house real-time PCRs targeting enteric disease-associated microsporidia in human stool samples. *Pathogens* 2021, 10, 656.
55. Estelle Menu, Charles Mary, Isabelle Toga, Didier Raoult, Stéphane Ranque, Fadi Bittar. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res Notes*. 2018 Mar 27;11(1):206. doi: 10.1186/s13104-018-3300-2.
56. Loderstädt, U.; Hagen, R.M.; Hahn, A.; Frickmann, H. New developments in PCR-based diagnostics for bacterial pathogens causing gastrointestinal infections—a narrative mini-review on challenges in the tropics. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2021, 6, 96.

57. Frickmann, H.; Hinz, R.; Hagen, R.M. Comparison of an automated nucleic acid extraction system with the column-based procedure. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2015, 5, 94–102.
58. Bossuyt, P.M.; Reitsma, J.B.; Bruns, D.E.; Gatsonis, C.A.; Glasziou, P.P.; Irwig, L.; Lijmer, J.G.; Moher, D.; Rennie, D.; De Vet, H.C.W.; et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015, 351, h5527.

III. Erklärung des Eigenanteils an der Promotion

Die Publikationsdissertation mit dem Titel „Vergleichende Validation von real-time PCR-Assays für den Nachweis von *Cystoisospora belli* als Testvergleich ohne Goldstandard“ wurde unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf-Matthias Hagen (Klinischer Direktor der Abteilung Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Bundeswehrzentralkrankenhauses Koblenz) sowie Herrn Prof. Dr. Holger Rohde (Leitender Oberarzt des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) durch mich, Martin Blohm, zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin verfasst.

Im Zuge der Erstautorenschaft hatte ich an der zu Grunde liegenden Publikation „Comparison of Two Real-Time PCR Assays Targeting Ribosomal Sequences for the Identification of *Cystoisospora belli* in Human Stool Samples“ einen wesentlichen Anteil. Die Erstellung des Studiendesigns entsprang aus der Zusammenarbeit von Herrn Prof. (APL) Dr. med. Hagen Frickmann (Klinischer Direktor Abteilung für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg) mit Herrn Dr. Gérard Lebouille (Wissenschaftler, Assay-Designer sowie Customer-Support der Firma TIB Molbiol Berlin) sowie Frau Dr. med. Ulrike Loderstädt (Institut für Krankenhaushygiene und Infektiologie der Universitätsmedizin Göttingen).

Die Durchführung sämtlicher Versuchsreihen wurden nach technisch-methodischer Einarbeitung durch Frau Anett Michel (betreuende Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin, Abteilung für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg) von mir eigenständig durchgeführt. Hierbei notwendige wissenschaftliche Detailanpassungen, Beratungen sowie die generelle Projektadministration wurden durch Herrn Prof. (APL) Dr. med. Hagen Frickmann begleitet. Die statistische und softwareseitige Auswertung der erhobenen Daten erfolgte maßgeblich durch Priv.-Doz. Dr. rer. medic. habil. Andreas Hahn (Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock). Weitere Unterstützung bei der Finalisierung der Publikation erfolgten neben den bereits genannten Ko-Autoren sowie Betreuern durch: Dr. med. Kirsten Alexandra Eberhardt (Berhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg), Priv.-Doz. Dr. med. Torsten Feldt (Bereichsleiter Tropenmedizin, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Universitätsklinikum Düsseldorf), Prof. Dr. med. Fred Stephen Sarfo (Department of Medicine Kwame Nkrumah University of Science and Technology in Kumasi, Ghana) und Dr. med. Veronica Di Cristanziano (Bereichsleiterin Serologische Diagnostik, Institut für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie der Uniklinik Köln).

Es wurden keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen genutzt.

Berlin, den 30.10.2023

M. Blohm

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Publikationsdissertation unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre:

- Herrn Prof. Dr. Hagen Frickmann für die wissenschaftliche Betreuung der Publikation sowie dessen unermüdliche fachliche und kollegiale Unterstützung,
- Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralf-Matthias Hagen als Doktorvater,
- Herrn Prof. Dr. Holger Rohde als Vertreter des Betreuers und Ansprechpartner von der Seite des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie
- Frau Anett Michel als betreuende Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin.

Meiner Ehefrau Laura Blohm danke ich für Ihre tatkräftige Unterstützung und Motivation.

V. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

VI. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

M. Blohm