

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Professor Dr. Bernhard Fleischer

Diagnose von Filarieninfektionen im Menschen und im Überträger mit  
Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Promotion

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

Sven Pischke  
aus Hamburg

2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:  
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>Seite</b>
1.1.	Filarien	1
1.1.1.	Humanmedizinische Bedeutung der Filarien	1
1.1.2.	Entwicklungszyklus der Filarien	2
1.2.	Onchozerkose	3
1.2.1.	<i>Onchocerca volvulus</i>	3
1.2.2.	Krankheitsbild	3
1.2.3.	Diagnose	5
1.2.4.	Bekämpfung	6
1.3.	Lymphatische Filariose	8
1.3.1.	<i>Wuchereria bancrofti</i> und <i>Brugia</i> spp.	8
1.3.2.	Krankheitsbild	9
1.3.3.	Diagnostik	10
1.3.4.	Bekämpfung	11
1.4.	Fragestellungen	12
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	
2.1.	Patienten	15
2.2.	Stechmücken	19
2.3.	Positive Kontroll-DNA	20
2.4.	Reagenzien	21
2.4.1.	Oligonukleotide	21
2.4.2.	Reagenzien für die PCR	25
2.4.3.	Lösungen, Puffer, Chemikalien	26
2.4.4.	DNA-Konservierungsmaterialien	29
2.5.	Geräte	29
2.6.	Vorgehensweisen	29
2.6.1.	Extraktionsmethoden	29
2.6.2.	PCR	31

2.6.3.	Nachweis von PCR-Produkten	32
2.6.3.1.	Gelelektrophorese	32
2.6.3.2.	DNA-Test Strip	32
2.6.3.3.	ELISA der PCR-Produkte	33
2.6.3.4.	Southern Blotting	34
2.6.4.	Klonierungen und Sequenzierungen	35
2.6.5.	Das Prinzip der internen Kontroll-DNA	36
2.7.	Statistik	39

### **3. Ergebnisse**

3.1.	Verbesserter Nachweis von <i>O. volvulus</i> im Menschen	40
3.1.1.	Entwicklung einer internen Kontroll-DNA	40
3.1.2.	Nachweis der O-150-PCR-Produkte	40
3.1.3.	Nachweis in Hautbiopsien	45
3.2.	Nachweis von <i>B. timori</i>	46
3.2.1.	HhaI-Repeat von <i>B. timori</i>	46
3.2.2.	Molekulare Marker für <i>B. timori</i>	50
3.2.3.	Nachweis von <i>B. timori</i> im Tagblut	51
3.2.4.	Nachweis von <i>B. timori</i> im Sputum	54
3.2.5.	Nachweis von <i>B. timori</i> in Überträgermücken	59
3.2.6.	Simultaner Nachweis von <i>B. timori</i> und <i>W. bancrofti</i>	60
3.2.7.	Simultaner Nachweis von <i>B. timori</i> und <i>P. falciparum</i>	62
3.2.8.	Gefrorener PCR-Mix („Frozen Mix“)	63

### **4. Diskussion**

4.1.	Diagnose der Onchozerkoses	65
4.1.1.	Wahl des richtigen Assays: Test Strips	65
4.1.2.	Erfolgskontrolle des PCR-Assay durch interne Kontrolle	66
4.1.3.	Quantifizierung des PCR-Assay	66
4.1.4.	Weiterführende Ansätze	67
4.2.	Diagnose der <i>B. timori</i> -Filariose	69
4.2.1.	Nachweis des HhaI-Repeat bei <i>B. timori</i>	69

4.2.2.	Nutzen der molekularen Marker	70
4.2.3.	Nutzen der Sputumdiagnostik	70
4.2.4.	Nutzen der Multiplex-	72
4.2.5.	Diagnostik von <i>B. timori</i> im Tagblut	72
4.2.6.	Diagnose von Filarien in Stechmücken	74
4.2.7.	Gefrorener PCR-Mix	74
4.2.8.	Weiterführende Ansätze	75
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf/ Veröffentlichungen/ Kongressteilnahmen/ Abstract-Titel</b>	<b>93</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>100</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Filarien

### 1.1.1. Humanmedizinische Bedeutung der Filarien

Filarien sind weit verbreitete, parasitär in den Geweben von höheren Wirbeltieren lebende Nematoden (Rundwürmer). Beim Menschen kommen mehrere Arten in den Tropen und Subtropen vor (Chiodini et al. 2001). Am häufigsten sind die Erreger der lymphatischen Filariose, die in vielen warmen Ländern in Asien, Afrika und Lateinamerika endemisch ist. *Wuchereria bancrofti* ist in allen drei Kontinenten zu finden, während die beiden anderen Arten, *Brugia malayi* und *Brugia timori* nur in Asien vorkommen (Ashford 2001). Weltweit sind mehr als 120 Millionen Menschen mit den Erregern der lymphatischen Filariose infiziert, davon mehr als 90 % mit *W. bancrofti* (Mak 1987, WHO 1992, Karam & Ottesen 2000). Eine andere wichtige Filarie ist *Onchocerca volvulus*, der Erreger der Onchozerkose oder Flussblindheit in Afrika, im Jemen und in Lateinamerika. Mehr als 18 Millionen Menschen sind infiziert (WHO 1987, 1995).

Beide Krankheiten führen zwar nur bei einem kleinen Teil der Patienten zum Tode, aber viele Erkrankte werden im Laufe der chronischen Infektion zu Invaliden und bei anderen Patienten tritt vorübergehende Arbeitsunfähigkeit auf. Viele Kinder versäumen jahrelang wiederholt den Schulunterricht. Deswegen sind während der neunziger Jahre große Bekämpfungsprogramme begonnen worden, die von der WHO organisatorisch betreut werden. Zur Überwachung dieser Programme ist es notwendig, bessere Methoden für den Nachweis der Filarien zu entwickeln, um den Erfolg oder Misserfolg der Bekämpfungsmaßnahmen beurteilen zu können. Hierzu sollen die in der Dissertation dargestellten Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Diagnostik der Erreger von Onchozerkose und lymphatischer Filariose im Menschen und in den Überträgermücken beitragen.

Nur in Afrika kommen Erkrankungen durch die Wanderfilariae *Loa loa* und durch *Mansonella streptocerca* vor. Die Streptocerciasis ähnelt klinisch der Onchozerkose. Sie muss deswegen differentialdiagnostisch von dieser unterschieden werden. Zwei andere *Mansonella*-

Arten des Menschen gelten als nicht pathogen: *Mansonella perstans* in Afrika und Lateinamerika und *Mansonella ozzardi* in Lateinamerika. Außerdem kann sich der Mensch mit Filarien von Tieren infizieren. Am wichtigsten von den zoonotischen Arten sind die *Dirofilaria*-Arten des Hundes. In den USA kommt es mehrere tausend mal pro Jahr zu Infektionen des Menschen mit dem Hundeherzwurm *Dirofilaria immitis* (Goddard 2000). Diese Infektionen, die selten auch in Europa (Wockel et al. 1993, Pampiglione et al. 1994, Raccurt 1999), Australien und Asien (Lee et al. 2000, Sukpanichnant et al. 1998) klinisch auftreten, verlaufen fast immer selbstlimitierend, da der Mensch als Fehlwirt fungiert und die Parasiten nicht lange in ihm überleben können.

### **1.1.2. Entwicklungszyklus der Filarien**

Die Entwicklung der Filarien ist mit einem Wirtswechsel verbunden (Chiodini et al. 2001, Fischer & Büttner 2002). Bei der Onchozerkose und der lymphatischen Filariose leben die erwachsenen Würmer viele Jahre in den Geweben des Menschen, wo die Weibchen Millionen von ersten Larven (L1) produzieren. Die L1-Larven, auch Mikrofilarien genannt, leben in der Haut oder im Blut. Sie werden bei einer Blutmahlzeit am Menschen von weiblichen Mücken aufgenommen, gelangen in deren Magen und wandern von dort aktiv in die Thoraxmuskulatur der Mücke. Dort entwickeln sich abhängig von der Temperatur im Laufe von 1 – 3 Wochen aus den L1 unter Häutung die L2 und dann die infektiösen dritten Larven (L3). Nur die reifen, infektionstüchtigen L3 wandern in den Kopf der Mücke und warten dort auf eine erneute Blutmahlzeit, bei der sie aktiv in die Haut des gestochenen Menschen eindringen. Nach wenigen Tagen häuten sie sich zur vierten Larve (L4) und nach einigen Wochen erneut zu juvenilen Würmern. Im Laufe mehrerer Wochen wachsen *Brugia* spp. und im Laufe eines Jahres *Wuchereria* und *Onchocerca* zu geschlechtsreifen Männchen und Weibchen heran. Mit der Produktion von Mikrofilarien ist der Entwicklungszyklus geschlossen. Die Verbreitung von Mensch zu Mensch erfolgt bei der Onchozerkose durch Kriebelmücken der Gattung *Simulium* und bei der lymphatischen Filariose durch mehrere Gattungen von Stechmücken, häufig durch *Anopheles* spp. oder *Culex* spp. (WHO 1989, 1992, 1995, Fischer und Büttner 2002).

## **1.2. Onchozerkose**

### **1.2.1. *Onchocerca volvulus***

Die Männchen und Weibchen von *O. volvulus* leben in subkutanen Knoten mit einem Durchmesser von etwa 0,5 – 6 cm, die als Onchozerkome bezeichnet werden. Die erwachsenen Würmer haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von 11 Jahren und eine maximale von wahrscheinlich bis zu 17 Jahren (Plaisier et al. 1991). Die 20 – 60 cm langen Weibchen produzieren mehrfach pro Jahr während der vierwöchigen Produktionszyklen täglich 700 – 1500 Mikrofilarien. Diese wandern in die Lederhaut, wo sie von Simulien aufgenommen werden oder nach 1 – 1 ½ Jahren absterben und von Makrophagen abgebaut werden. Einige Mikrofilarien wandern aus der Haut direkt in die Hornhaut des Auges oder entlang der Gefäße in die Augen ein. Die Mikrofilarien sind das wesentliche pathogene Agens (Hoerauf et al. 2003a). Sie verursachen durch immunpathologische Reaktionen des Menschen die Krankheit Onchozerkose. Diese Reaktionen werden vor allem durch die Proteine der Filarien hervorgerufen. Aber es sind auch Substanzen der obligaten Endobakterien von *O. volvulus* beteiligt, die mit Doxycyclin eliminiert werden können (Hoerauf et al. 2002, 2003b, 2003c).

Die meisten Simulienarten benötigen sauerstoffreiche, fließende Gewässer zum Brüten. Das erklärt die Verbreitung der Onchozerkose entlang von Flüssen und Bächen und auch den Namen Flussblindheit. Nur in einigen ostafrikanischen Ländern, wie Uganda, brütet *Simulium neavei* auf Krabben, die in langsam fließenden Gewässern leben.

### **1.2.2. Krankheitsbild**

Die erwachsenen Würmer in den Knoten beeinträchtigen die infizierten Menschen meist nur dann, wenn sie kosmetisch oder mechanisch stören (Stingl & Büttner 2000). Entscheidend sind die immunpathologischen Reaktionen des Menschen auf die Mikrofilarien, vor allem auf die Substanzen, die beim Tod der Mikrofilarien frei werden (WHO 1987, 1995). Die Ausprägung der Symptome hängt von der Wurmlast und dem Immunstatuts ab (Cooper et al. 2001). Ebenso wie bei anderen Filariosen gibt es Menschen, bei denen auch in Gebieten mit hohen Prävalenzen der Onchozerkose sich keine erwachsenen Würmer entwickeln. Es lassen sich aber Antikörper nachweisen, sodass anzunehmen ist, dass L3 in die Haut eingedrungen

und getötet worden sind. Diese für die Infektion anscheinend resistenten Menschen werden als putativ immune Personen bezeichnet (WHO 1995, Lawrence 2001).

Ein Teil der infizierten Menschen zeigt klinisch keine manifesten Krankheitszeichen abgesehen von einer Eosinophilie und einer sich im Laufe der Jahre entwickelnden Atrophie der Haut. Häufig klagen die Mikrofilarienträger über Pruritus. Bei vielen Patienten treten rezidivierend über Jahre Schübe von papulärer Dermatitis auf (Anhang von WHO 1995). Im Laufe der Jahrzehnte dauernden chronischen Infektion entwickeln sich atrophische Hautveränderungen, wie papierdünne Haut, fleckige Depigmentationen vor allem an den Schienbeinen (Leopardenhaut) und hängende Hautfalten („hanging groins“). Diese Patienten können sehr hohe Mikrofilarienlasten aufweisen. In den regionalen Lymphknoten entwickelt sich eine Atrophie der Follikel. Die Infektion wird dann als generalisierte Onchozerkose bezeichnet. Im Unterschied dazu können wenige Patienten aufgrund ihrer guten Immunität die Mikrofilarien töten. Sie haben deswegen nur sehr wenige Mikrofilarien. Aber sie entwickeln häufig schwere Hautveränderungen und starke Hyperplasien der vergrößerten regionalen Lymphknoten. Wegen der bei ihnen oft auftretenden Dunkelfärbung der betroffenen Hautpartien wird diese hyperreaktive Onchozerkose nach dem arabischen Wort „aswad“ für schwarz als Sowda bezeichnet (WHO 1987, 1995). Im Hinblick auf dieses immunologische Spektrum der Infektion wird die Onchozerkose, so wie lymphatische Filariose, Lepra und die Leishmaniosen als „spektrale Erkrankung“ bezeichnet.

Als Folge der in die Augen eingewanderten Mikrofilarien entwickeln sich Schäden, die bei einem Teil der Patienten zu Sehstörungen unterschiedlichen Ausmaßes bis hin zur Erblindung führen. Vor allem in der westafrikanischen Savanne können 1 – 5 % der Bevölkerung in Dörfern in Flussnähe erblinden. Mit geschätzten 270 000 an Onchozerkose Erblindeten und 500 000 Sehgeschädigten gehört die Infektion zu den häufigsten Ursachen für Blindheit in Afrika (WHO 1995). Alle Abschnitte der Augen können betroffen sein: Konjunktivitis, Korneatrübungen von der Keratitis punctata bis zu sklerosierenden Keratitis (Hall & Pearlman 2002), Iridozyklitis, Sekundärglaukom, Chorioretinitis, Neuritis und Atrophie des Nervus opticus. Für die Korneatrübung wird aufgrund von Experimenten an Mäusen neuerdings angenommen, dass die zu der Gattung *Wolbachia* gehörenden Endobakterien der Filarien wesentlich an der Entstehung beteiligt sind (Saint-Andre et al. 2002).

In einigen Endemiegebieten, wie im Westen von Uganda, treten häufiger als in den benachbarten nicht endemischen Gebieten Minderwuchs und Epilepsie auf (Kaiser et al. 1996, Boussinesq et al. 2002). Für diese speziell in der Pädiatrie bedeutsamen Erkrankungen (von Harnack & Koletzko 1996) konnte der Zusammenhang mit der Onchozerkose jedoch noch nicht endgültig gesichert werden.

Ein entscheidender Faktor für die Manifestation der Onchozerkose ist die Expositionsdauer im Endemiegebiet. Kürzerer Aufenthalt im Endemiegebiet wie bei Urlaubern und Saisonarbeitern führt nur selten zur Infektion. Wenn diese aber erkranken, dann kommt es häufig zu stärkeren allergischen Beschwerden (Davies 1989). Ob das auf ständige Neuinfektionen, Adaptation des Immunsystems oder genetische Faktoren zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt.

### **1.2.3. Diagnose**

Für die Diagnose einer *O. volvulus*-Infektion werden verschiedene Methoden angewendet: Klinik der Haut- und Augenveränderungen, Palpation von Knoten und eventuell Bestätigung mit Ultraschall oder durch Exstirpation, Nachweis von Mikrofilarien und von Antikörpern (WHO 1987, Gomez-Priego et al. 1993, WHO 1995). Der Nachweis von Antigen spielt bisher kaum eine Rolle (Stingl & Büttner 2000). Mikrofilarien werden mikroskopisch in Hautbiopsien oder mit der Spaltlampe in den Augen, mit PCR (Meredith et al. 1991, Felleisen 1992, Bradley & Unnasch 1996) oder indirekt mit dem Mazzotti-Test nachgewiesen.

Das am häufigsten angewendete Verfahren ist die mikroskopische Untersuchung von kleinen Hautbiopsien, sogenannten „skin snips“. Diese werden in Pufferlösung inkubiert und nach mehreren Stunden werden ausgewanderte Mikrofilarien durch geschulte Untersucher mikroskopisch gezählt. Dabei müssen sie von den Mikrofilarien von *M. streptocerca*, die ebenfalls in der Haut leben, unterschieden werden. Weil nur etwa 70 % der in einer Hautbiopsie vorhandenen Mikrofilarien auswandern, kann man die Ausbeute dadurch erhöhen, dass die Haut mit Collagenase-Lösung verdaut wird, sodass man alle Mikrofilarien sichtbar machen und zählen kann (Fischer et al. 1996). Die Mikroskopie wird häufig als Goldstandard verwendet. Die Versuche, statt einer Biopsie nur das durch Ritzen der Haut gewonnene Material zu verwenden, wie bei der Lepra, hat sich nicht bewährt (Toe et al. 1998).

Bei der nach einem mexikanischen Forscher benannten Mazzotti-Reaktion handelt es sich um einen nicht invasiven, hoch empfindlichen indirekten Nachweis von Mikrofilarien. Nach lokaler Anwendung von Diethylcarbamazin in Nivea-Lotion kommt es nach zwei Tagen zu einer papulären Reaktion der behandelten Haut aufgrund der getöteten Mikrofilarien (Toe et al. 2000, Boatin et al. 2002). Dieses Verfahren hat sich bewährt. Es ist in Westafrika während der letzten Jahre zur Entdeckung von neuen Infektionen in Gebieten mit jahrelanger Simulienbekämpfung verwendet worden. Der Nachteil ist der logistische Aufwand, weil die Menschen in den Dörfern zweimal aufgesucht werden müssen.

Von mehreren Untersuchern konnte während der letzten Jahre gezeigt werden, dass *O. volvulus* mit der PCR in Hautbiopsien nachgewiesen werden kann (Zimmermann et al. 1994, WHO 1995, Fischer et al. 1996). Dabei wird das Ov-150-Repeat verwendet, bei dem es sich um ein Tandem-Repeat mit einer 150 Basenpaare langen Sequenz handelt, das 4000 mal im Genom von *O. volvulus* wiederholt ist. Versuche, *O. volvulus* mit der PCR in Blut oder Urin nachzuweisen, waren jedoch bisher nicht erfolgreich (Chandrashekar 1997, Vincent et al. 2000).

Wie in der Infektiologie üblich, hat es viele Versuche gegeben, die Immundiagnostik auch für die Diagnose der Onchozerkose zu verwenden (WHO 1995, Harnett et al. 1998, Vincent et al. 2000 u. a.). Während sich die früheren Tests mit Wurmextrakten wegen ihrer geringen Spezifität nur als Suchreaktionen bei Rückkehrern aus den Tropen für die individuelle Diagnostik eigneten, haben während der letzten Jahre mehrere Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen sehr hohe Spezifität erkennen lassen (Tawill et al. 1995 mit Ov33, Mpagi et al. 2000 mit Ov20, einem Retinol-bindenden Protein). Der am weitesten entwickelte und sehr spezifische Nachweis ist der Ov16-Card-Test von Weil und Mitarbeitern (1997, 2000). Bisher ist es aber aus finanziellen Gründen nicht gelungen, einen dieser Tests kommerziell anzubieten.

Für den für die Überwachung von Bekämpfungsmaßnahmen wichtigen Nachweis von *O. volvulus* in den Simulien werden die mikroskopische Untersuchung von seziierten Mücken (WHO 1987, 1995) und die PCR verwendet (Oskam et al. 1996, Yameogo et al. 1999).

#### **1.2.4. Bekämpfung**

Bei der Bekämpfung der Onchozerkose werden mehrere Ziele angestrebt: Verminderung der Morbidität, lokale Eliminierung des Erregers und schließlich vielleicht einmal die Ausrottung

des Erregers (Bebhani 1998). Diese Ziele wurden und werden vor allem mit zwei Strategien verfolgt. Solange es keine für die Massenbehandlung geeigneten Medikamente gab, stand die Bekämpfung der Simulien durch der Anwendung von larviziden Insektiziden wie Temephos im Vordergrund. Das größte Vorhaben war das „Onchocerciasis Control Programme in West Africa“ (OCP, WHO 1995, Fischer & Büttner 2002, Remme 2004). Mit dem Simulationsprogramm „Onchosim“ (Plaisier et al. 1990), das entomologische und parasitologische Daten verwendete, wurde der Fortschritt des Programm gemessen und der Erfolg geschätzt. Das sehr erfolgreiche OCP wurde 2002 vom „African Programme for Onchocerciasis Control“ (APOC) abgelöst.

Nach der Entwicklung des nebenwirkungsarmen Ivermectin wurden Programme mit Massenbehandlung der Bevölkerung in den endemischen Gebieten geplant. Das „Onchocerciasis Elimination Program for the Americas“ (OEPA) plant die Eliminierung von *O. volvulus* in Amerika. Deswegen werden alle Menschen in den endemischen Dörfern der sechs betroffenen Länder behandelt (Blanks et al. 1998, Remme 2004). Das APOC plant zunächst nur die Verminderung der Morbidität durch Reduktion der Übertragung. Es besteht die Hoffnung, dass vielleicht später auch die Eliminierung der Filarie gelingen wird. Zur Zeit werden nur alle Menschen in Gebieten mit einer Endemizität von mehr als 40 % behandelt (WHO 2001, Richards et al. 2001, Remme 2004).

Bei APOC und OEPA werden vier Phasen unterschieden (WHO 2001), die unterschiedliche Anforderungen an die Diagnostik stellen. In der ersten Phase vor der Massenbehandlung werden in ausgedehnten Surveys die Basisdaten erhoben. Dafür werden vor allem die Knotenpalpation und sehr selektiv der Mikrofilariennachweis verwendet (TDR 1992). In den 14 – 16 Jahren der zweiten Phase wird mit Ivermectin behandelt bis die Mikrofilarien verschwunden sind. Die Abnahme von Morbidität und Parasitenlast wird dabei verfolgt. Es kommt vor allem darauf an, einerseits festzustellen, ob alle Mikrofilarien aus der Bevölkerung verschwunden sind und andererseits, dass keine neuen Mikrofilarienträger in den behandelten Gebieten auftauchen, sei es durch Wiederaufnahme der Mikrofilarienproduktion von behandelten Weibchen, sei es durch infizierte Immigranten. Von den Ergebnissen der überwachenden Diagnostik hängt es ab, wann die aufwendige und kostspielige Massenbehandlung mit Ivermectin beendet werden kann und ob sie gegebenenfalls wieder aufgenommen werden muss. Diese Überwachung muss auch während der Zertifizierung der

Eliminierung und in der vierten post-endemischen Phase fortgesetzt werden (Guzman et al. 2002).

Hierzu möchte die in der Dissertation dargestellte Verbesserung des Mikrofilariennachweis mit der PCR durch Einbeziehung einer internen Kontrolle einen Beitrag leisten. Da während der späten zweiten, der dritten und vierten Phase keine Übertragung mehr stattfinden darf, muss die PCR so gestaltet werden, dass möglichst wenige oder gar keine falsch negativen Resultate erzielt werden (Nutman et al. 1996).

### **1.3. Lymphatische Filariose**

#### **1.3.1. *Wuchereria bancrofti* und *Brugia* spp.**

Die nur wenige Zentimeter langen Männchen und Weibchen von *Wuchereria* und *Brugia* leben vor allem in den Lymphknoten und Lymphgefäßen der unteren Körperhälfte (WHO 1992). Die von den weiblichen Filarien produzierten Mikrofilarien leben im Blut. Sie werden bei der Blutmahlzeit von Stechmücken der Gattungen *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* und *Mansonia* aufgenommen. Die Larven entwickeln sich im Thorax der Mücke und wandern bei erneutem Stich in die Haut eines Menschen ein. Die weitere Entwicklung gleicht der für *O. volvulus* beschriebenen. Für die Embryogenese sind *W. bancrofti* und *B. malayi* auf Endobakterien der Gattung *Wolbachia* angewiesen. Außerdem gibt es Anzeichen dafür, dass die Wolbachien für die Entwicklung der L3 zu L4 benötigt werden und dass dies durch Antibiotika beeinflusst werden kann (Rajan 2004). *W. bancrofti* und *B. malayi* können deswegen auch mit einer mehrwöchigen Kur mit Doxycyclin behandelt werden. (Hoerauf et al. 2003b). Zu Beginn dieser Arbeit war für *B. timori* noch nicht aufgezeigt worden, dass dieser Wolbachien enthält. Für die Diagnostik ist es wichtig, dass bei bis zu 50 % der Infizierten nur adulte Filarien und keine Mikrofilarien beobachtet werden.

Die Mikrofilarien haben sich an die Stechgewohnheiten der Mücken angepasst: sie leben in der Lunge, wenn die Mücken nicht stechen und sie wandern in das periphere Blut zu den Tageszeiten, während der die betreffenden lokalen Überträgermücken vorwiegend stechen, also meistens in der Nacht. Bei tagsüber stechenden *Aedes* sind sie dagegen auch am Tag im peripheren Blut (White 1989, WHO 1992). Die für das Brüten der Stechmücken benötigten Gewässer sind sehr unterschiedlich. Es können bei *Anopheles* Teiche, Gräben oder

Regenpfützen sein. *Culex* brüten auch ganz in der Nähe des Menschen in kleinen Wasserbehältern und *Aedes* in Blattachseln, Wasseransammlungen in Bäumen und leeren Schalen von Kokosnüssen. Als Vektor von *B. timori* auf der Insel Flores ist *Anopheles barbirostris* nachgewiesen worden. Ob diese Art auch als Vektor auf der Insel Alor fungiert, war bislang nicht bekannt.

Die in vielen warmen Ländern vorkommende häufige *W. bancrofti* ist relativ gut erforscht. Auch *B. malayi* in Süd- und Ostasien ist viel untersucht worden. Dagegen ist die auf einige der kleinen Sundainseln beschränkte *B. timori* bisher nur wenig studiert worden. Deswegen konzentrierten sich die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe und damit auch meine auf diese Filarie. Ihr Vorkommen ist zwar geographisch beschränkt, aber örtlich können die Prävalenz und auch die Morbidität hoch sein. Von *B. malayi* gibt es subperiodische Formen bei Hauskatzen, wilden Raubtieren und einigen Affenarten. Diese zoonotischen Formen können auf den Menschen übertragen werden. Nur bei Tieren kommen einige weitere *Brugia*-Arten vor, wie *B. pahangi*.

### **1.3.2. Krankheitsbild**

Die lymphatische Filariose manifestiert sich in verschiedenen Endemiegebieten, und abhängig von der Erregerart, sehr unterschiedlich. Früher wurden meist nur infizierte Menschen ohne klinische Symptome und verschiedene akute und chronische Erkrankungen beschrieben (WHO 1992). Viele Fragen zur Pathogenese können noch nicht ausreichend beantwortet werden. So wird die Rolle der Wolbachien noch sehr unterschiedlich diskutiert (Taylor & Hoerauf 1999, Taylor 2002). Die Forschungen der letzten Jahre haben aber doch zu einem besseren Verständnis geführt. Dazu ist viel von der brasilianischen Arbeitsgruppe um Gerusa Dreyer beigetragen worden (Dreyer et al. 2002). Im Gegensatz zur Onchozerkose sind die erwachsenen Würmer für die meisten Manifestation das wesentliche pathogene Agens. Sie verursachen die akute filarienbedingte Lymphangitis (AFL) und in deren Folge chronische Lymphangiektasien und Verschluss der Lymphgefäße. Das führt zu Lymphozelen, Chylozelen, Hydrozelen und Lymphfisteln. Bei Fisteln im Bereich der ableitenden Harnwege kann Chylurie auftreten. Einzelne Filarien können zu Wurmknötchen in Skrotum, Mamma, Lunge und anderen Organen führen, vor allem wenn die Filarien sterben.

Als Folge der pathologischen Veränderungen der Lymphgefäße können pathogene und auch nur gering pathogene Bakterien und Pilze der Haut sich im Lymphsystem etablieren und zu akuten Entzündungen führen: die rezidivierende, akute Dermatolymphangioadenitis (ADLA).

Als deren Folge kommt es zur langsam zunehmenden Entwicklung eines chronischen Lymphödems bis hin zur Elefantiasis. Diese kann zur Invalidität führen. Das chronische Lymphödem fördert die Entstehung von kleinen Hautläsionen, die den Bakterien als Eintrittspforten dienen. Während *W. bancrofti* vor allem bei Männern zu erheblichen Erkrankungen im Bereich des Genitales führt, ist das bei den beiden *Brugia*-Arten nicht der Fall. Bei ihnen tritt möglicherweise häufiger Elefantiasis auf (Davis 1989). Inwieweit die lymphatische Filariose zu einer erhöhten Mortalität führt, ist nicht genau bekannt. Über den Ausfall an Arbeitsfähigkeit und Invalidität gibt es jedoch Daten (Kumaraswami 2000).

In seltenen Fällen tritt eine durch Mikrofilarien in der Lunge bedingte hyperergische tropische pulmonale Eosinophilie (TPE) auf. Diese und andere Lungenveränderungen im Rahmen der Filariose können u. U. im Thoraxröntgenbild erkennbar sein (Urabe et al. 2001). Die durch die adulten Filarien verursachten Knoten in der Lunge sind gelegentlich vom Bronchialkarzinom nur schwer zu unterscheiden (Gomez-Merino et al. 2002).

Auch bei der lymphatischen Filariose werden, wie bei der Onchozerkose, ungewöhnlich heftige Verläufe bei infizierten Personen beobachtet, die nicht permanent in endemischen Gebieten leben (Koya et al. 1998). Ebenso wie bei der Onchozerkose gibt es Menschen die eine putative Immunität gegen die Erreger der lymphatischen Filariose zeigen (Kumaraswami 2000, Lawrence et al. 2001).

### **1.3.3. Diagnostik**

Die Diagnose setzt einen anamnestisch zu erfragenden Aufenthalt im Endemiegebiet voraus. Klinisch sind vor allem die chronischen Manifestationen, wie Lymphödem und bei der Infektion mit *W. bancrofti* die Hydrozele von Bedeutung. Die parasitologische Diagnose erfolgt durch den mikroskopischen Nachweis von Mikrofilarien im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten oder mit einer PCR (Lizotte et al. 1994, Klüber et al. 2001). Bei Männern mit *W. bancrofti*-Infektion können erwachsene Filarienweibchen mit Ultraschall als tanzende Würmer beobachtet werden („filaria dance sign“, Mand et al. 2003).

Immundiagnostische Nachweise von Antikörpern sind für beide Gattungen entwickelt worden (WHO 1992, Soeyoko 1993, Chandrashekar 1997, McCarthy 2000, Ramah et al. 2001, Noordin et al. 2004). Die immundiagnostischen Tests auf Antikörper können zwar mit Tagblut durchgeführt werden. Aber sie zeigten früher oft nur unspezifisch eine Infektion mit

Filarien an und ließen wegen der Kreuzreaktionen nicht erkennen, um welche Art es sich handelte (Lammie et al. 2004). Viele Tests blieben auch nach dem Tod der Filarien viele Jahre positiv, sodass nicht zu bestimmen war, ob noch eine aktive Infektion vorlag. Als Suchtests für die individuelle Diagnostik sind sie gut geeignet. Für die Überwachung von Bekämpfungsmaßnahmen wünscht man sich aber präzisere Methoden (Singh 1997). Für *B. timori* gibt es bisher nur wenige Untersuchungen über diagnostische Tests (Maizels et al. 1983).

Für die meisten Erreger der lymphatischen Filariose ist für den Nachweis der Mikrofilarien die Gewinnung von Nachtblut erforderlich. Das bereitet nicht nur logistische Schwierigkeiten, sondern es wird auch von der Bevölkerung oft nicht gerne geduldet. Deswegen sind vereinfachte Nachweise von Filarien-DNA mit neuen PCR-Assays entwickelt worden (Hyde 1973), und für *B. malayi* von Fischer et al. (2000) und Klüber et al. (2002). Diese Tests basieren auf dem Nachweis des etwa 60 000 mal pro Genom vorkommenden HhaI-Repeats. Es war bei Beginn meiner Untersuchungen noch nicht bekannt, ob *B. timori* auf der indonesischen Insel Alor über dieselbe Version des HhaI-Repeats verfügt wie *B. malayi* und wie die *B. timori*-Filarien auf der Insel Flores (Xie et al. 1994a). Deswegen war es ein Ziel meiner Untersuchungen, die PCR für *B. timori* zu adaptieren. Zugleich sollte untersucht werden, wie der PCR-Assay mit Tagblut durchgeführt werden konnte und ob es möglich war, *B. malayi* und *B. timori* molekularbiologisch zu unterscheiden.

Im Rahmen der PCR-Diagnostik wurden auch Techniken entwickelt, die den Filarien-Nachweis unabhängig von Blutproben ermöglichen. So gelang es, *W. bancrofti* im Sputum mit der PCR nachzuweisen (Abbasi et al. 1996).

#### **1.3.4. Bekämpfung**

Im Auftrag der WHO haben in den neunziger Jahren zwei Expertengruppen sechs Infektionskrankheiten identifiziert, bei denen die Biologie der Erreger die Annahme berechtigt, dass sie möglicherweise ausgerottet werden können. Dazu gehört die lymphatische Filariasis (Bebehani 1998). Die 50. Weltgesundheitsversammlung hat dann 1997 (Ottesen et al. 1997) einen Beschluss zur Eliminierung der lymphatischen Filariasis gefasst (WHO 2002). Im folgenden Jahr hat die WHO das „Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis“ (GPELF) begonnen (Ottesen 2002, WHO 2002, Molyneux and Zagaria 2002, Molyneux 2003), das aufgrund des Beschlusses der Weltgesundheitsversammlung von vielen

internationalen, nationalen staatlichen und von Nicht-Regierungs-Organisationen (NGO) unterstützt wird, die eine „Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis“ gebildet haben.

Die zwei strategischen Ziele sind die Unterbrechung der Übertragung und die Reduktion der Morbidität. Um die Übertragung zu unterbrechen, wird die Bevölkerung in den endemischen Gebieten einmal im Jahr mit Diethylcarbamazin (DEC) und Albendazol behandelt (Karam & Ottesen 2000, Supali et al. 2002, Shenoy et al. 2002, WHO 2002b). Nur in Afrika wird anstelle von DEC Ivermectin verwendet. Die Behandlung der Krankheitserscheinungen erfolgt nach Möglichkeit in der von Dreyer et al. (2002) beschriebenen Weise. Die epidemiologische Identifizierung der endemischen Gebiete erfolgte durch Surveys, bei denen klinisch auf Lymphödem und Hydrozele und parasitologisch auf Antigen von *W. bancrofti* im Tagblut oder auf Mikrofilarien der *Brugia* spp. im Nachtblut untersucht wurde.

Ebenso wie bei der Onchozerkose ist es wichtig, nachdem die Massenbehandlung begonnen wurde, besser geeignete Methoden für die Überwachung der Behandlung zu entwickeln. Diese müssen spezifisch, sehr sensitiv, nicht zu teuer und auch in wenig entwickelten Endemiegebieten durchführbar sein. Sie sollten auch mit Tagblut zu guten Ergebnissen führen. Dabei geht es um den Nachweis der Filarien sowohl beim Menschen als auch in den Überträgermücken. Weil das Filarienprogramm möglichst mit anderen Bekämpfungsprogrammen kombiniert werden soll, ist es erwünscht, Multiplex-PCR-Assays für mehrere Erreger zu entwickeln.

Mit dieser Zielsetzung habe ich die in den Fragestellungen (1.4.) genannten Untersuchungen für die Diagnose von *B. timori* durchgeführt. Eine internationale Gruppe von Experten und Wissenschaftlern hat bei einem „LF Research Forum“ 2003 in Philadelphia einen strategischen Plan für Forschungen zur Unterstützung des GPELF entwickelt (LF Research Forum 2004). Die in dieser Dissertation dargestellten Untersuchungen über die PCR bei lymphatischer Filariose stimmen mit den Empfehlungen des LF Research Forums zur Detektion der DNA weitgehend überein.

#### **1.4. Fragestellungen**

Die Überwachung der Ergebnisse der Massenbehandlung bei den weltweiten Programmen zur Bekämpfung von Onchozerkose (APOC, OEPA) und lymphatischer Filariose (GPELF) erfordert die Entwicklung besserer diagnostischer Methoden. Ziel des Promotionsvorhabens

war es deswegen, einige der auf dem Nachweis der DNA von *O. volvulus* und *B. timori* basierenden Tests für diese Filarieninfektionen zu verbessern.

### **PCR-Diagnostik der Onchozerkose**

Das Ziel war es, den Nutzen einer internen Kontroll-DNA zur Vermeidung von falsch negativen Befunden zu zeigen und die Möglichkeit einer Schätzung der Mikrofilarienlast aufgrund einer DNA-Bestimmung mit einem ELISA zu untersuchen. Ein Vergleich der Sensitivität von ELISA und DNA-Detection-Test Strip sollte zeigen, welches dieser beiden Verfahren besser für den Nachweis von Ov-150-PCR-Produkten geeignet ist.

### **PCR-Diagnostik der lymphatischen Filariose**

Diese Untersuchungen sollten einen Beitrag leisten zur Diagnostik der bisher nur wenig untersuchten Infektion mit *B. timori*, die auf den kleinen Sundainseln in Indonesien und Timor vorkommt. Zunächst war zu zeigen, ob und wie der für *B. malayi* entwickelte PCR-Assay auf *B. timori* übertragbar ist.

Außerdem sollten Methoden zur einfachen molekularbiologischen Unterscheidung von *B. malayi* und *B. timori* entwickelt werden, um die morphologische Unterscheidung (Purnomo et al. 1977), die geschulte Entomologen erfordert, zu ersetzen. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob *B. timori* ebenso wie die anderen Filarien, für die dies schon bekannt war, über Wolbachien verfügt.

Um die aufwendige Probensammlung von Nachtblut zu vermeiden, sollte eine Technik entwickelt werden, um *B. timori* mit der PCR-Methodik auch im Tagblut nachzuweisen. Dabei ging es um die Konservierung der Blutproben für den Transport vom Dorf zum Labor in einem Entwicklungsland. Drei Konservierungsmethoden wurden untersucht: Zusatz von EDTA, Guanidinthiocyanat oder Urea zum Blut als Konservierungsmittel.

Um die Blutentnahme durch ein nicht invasives Verfahren zu ersetzen, wurde die Möglichkeit geprüft, ob *B. timori* mit der PCR im Sputum nachzuweisen ist, wie es für *W. bancrofti* gezeigt worden war (Abbasi et al. 1996).

Da das erste Ziel des GPELF die Unterbrechung der Übertragung ist, sollte die PCR-Diagnostik auf die Überträgermücken von *B. timori* auf der indonesischen Insel Alor angewendet werden, was für *B. malayi* bereits gemacht worden war (Liu et al. 1998). Dabei galt es, die für die Übertragung auf Alor verantwortliche Stechmücke zu identifizieren.

Im Hinblick auf die Integration verschiedener Bekämpfungsprogramme bei den Gesundheitsdiensten sollten Multiplex-PCR-Assays für Koinfektionen von *B. timori* mit *W. bancrofti* oder mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* anhand von Blutproben von infizierten Menschen und an Mücken-Pools untersucht werden.

Um eine Vereinfachung und Standardisierung von PCR-Assays zu ermöglichen, sollte überprüft werden, ob es möglich ist, PCR-Ansätze ohne deutliche Einschränkung der Sensitivität des Assays wiederholt einzufrieren und aufzutauen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten**

#### **2.1.1. Proben von Patienten mit Onchozerkose**

Der Basisgesundheitsdienst des Distrikts Kabarole in Westuganda begann 1991 mit ausführlichen Surveys in den Dörfern der Gemeinde Kigoyera (Fischer et al. 1993). Direkt im Anschluss an die Untersuchung der Dorfbewohner wurde allen eine Behandlung mit Ivermectin angeboten, die dann jährlich wiederholt wurde. In den Jahren 1992 –1996 wurden Stichproben der Bevölkerung in Kigoyera nachuntersucht. Es zeigte sich, dass die Mikrofilarienlast erwartungsgemäß bei den behandelten Menschen erheblich gesunken war. Weil die geplanten Studien zur Entwicklung und Verbesserung von PCR-Assays im Hinblick auf die Überwachung der behandelten Bevölkerung geplant und deswegen Mikrofilarienträger mit niedrigen Mikrofilarienlasten erwünscht waren, wurden von 108 behandelten Erwachsenen, die 1992 oder 1995 untersucht wurden, Hautproben für die PCR konserviert. Zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung lag die letzte Ivermectinbehandlung jeweils 10 – 12 Monate zurück.

Jeweils zwei Hautbiopsien wurden im Beckenbereich mit Holthstanzen entnommen. Diese Körperstelle ist eine der bevorzugten Lokalisationen der adulten Würmer (Abb. 1) und vor allem der Mikrofilarien. Sie dominiert jedoch nur bei erwachsenen Afrikanern während bei afrikanischen Kindern und in Zentralamerika andere Onchozerkom-Lokalisationen vorherrschen (Gillespie et al. 2001). An unserer Studie nahmen nur erwachsene Ugander teil.

**Abb. 1: Onchozerkom mit Atrophie in der Lumbalregion bei einem Patienten aus Uganda (Foto: Prof. Dr. Büttner)**



Eine der Biopsien wurde in eine mit PBS gefüllte Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert (Fischer et al. 1993), sodass die Mikrofilarien (Mf) auswandern konnten. Am nächsten Morgen wurden die ausgewanderten Mikrofilarien mikroskopisch gezählt, die Hautstücke wurden gewogen und die Mikrofilariendichte wurde als Anzahl Mf pro mg Haut berechnet. Die zweite Probe wurde in 80 % Ethanol fixiert und bis zum Beginn meiner Untersuchungen im November 2000 bei 4° C aufbewahrt. Die Stanzen wurden vor der Benutzung in frisch angesetzter Glutaraldehydlösung desinfiziert, den Empfehlungen der WHO zur Vermeidung einer Ansteckung mit HIV entsprechend (WHO 1989).

Patienten mit hohen Knotenlasten wurden Nodulektomien angeboten, die von einem ugandischen Chirurgen im Hospital in Fort Portal durchgeführt wurden. Aus einigen dieser Onchozerkome wurden die adulten *O. volvulus* mit der Collagenase-Technik isoliert (Schulz-Key 1988), sodass Würmer für molekularbiologische Studien zur Verfügung standen.

Während der Surveys für die Identifizierung von hyperendemischen Onchozerkosegebieten wurden Anfang der neunziger Jahre in dem Distrikt Bundibuyo westlich des Ruwenzori-Gebirges in mehreren Dörfern hohe Prävalenzen von *M. streptocerca* und *M. perstans* entdeckt (Fischer et al. 1997). In diesem Distrikt war Onchozerkose nicht endemisch. Abgesehen von wenigen Personen, die ihre Onchozerkose im Kongo erworben hatten, enthielt keine von hunderten untersuchten Hautbiopsien *O. volvulus*. Auch konnten die Entomologen keine anthropophagen Simulien in diesem Gebiet entdecken. Die Abwesenheit von Onchozerkose wurde durch immundiagnostische Untersuchungen der gesammelten Seren mit den sehr spezifischen rekombinanten Antigenen Ov33 und Ov20 bestätigt (Tawill et al. 1995, Mpagi et al. 2000). Von den während der Surveys 1995 entnommenen Hautproben waren ein Teil für molekularbiologische Studien konserviert worden. Ich habe Hautproben von 19 Personen, die sicher keine Onchozerkose hatten, für meine PCR-Studien als negative Kontrollen verwendet. Dabei war es wichtig, dass bei sieben der 19 Personen Mikrofilarien von *M. streptocerca* in der Haut gefunden worden waren, weil die Streptocerciasis von der Onchozerkose unterschieden werden muss.

Die Surveys wurden im Rahmen des ugandischen Onchozerkoseprogramm durchgeführt. Den assoziierten Studien hatte die zuständige Kommission im Gesundheitsministerium in Entebbe zugestimmt. Der Nodulektomie für wissenschaftliche Zwecke war von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg zugestimmt worden. Alle Personen wurden von dafür geschulten

Beratern (Counsellors trained by The AIDS Support Organization Uganda, TASO) ausführlich aufgeklärt. Nur bei Einverständnis wurden die entsprechenden Proben entnommen. Auch bei fehlender Zustimmung zur Probenentnahme wurde die Ivermectinbehandlung angeboten. Außerdem wurden Notfälle und vor allem bei Kindern akute Erkrankungen während der Surveys behandelt.

### **2.1.2. Patienten mit *Brugia timori*-Infektion**

In Indonesien kommen alle drei Erreger der lymphatischen Filariasis vor. Auf der zu den kleinen Sundainseln gehörenden Insel Alor nördlich von Timor ist *W. bancrofti* an der Küste endemisch und *B. timori* im zentralen Hochland (Supali et al. 2002). Im Rahmen des GPELF und des nationalen indonesischen Filariasis-Bekämpfungsprogramm wurden im Frühjahr 2001 auf Alor Surveys durchgeführt und anschließend wurde die Bevölkerung in den endemischen Dörfern mit DEC und Albendazol behandelt (Fischer et al. 2002, Supali et al. 2002, Oqueka et al. 2005). Auf Alor wurden in 1075 Blutproben keine Doppel-Infektionen mit beiden Parasiten gefunden.

Die von mir untersuchten Proben stammten alle aus dem in 880 m Höhe gelegenen Dorf Mainang, in welchem aufgrund seiner Lage nur Infektionen mit *B. timori* und keine mit *W. bancrofti* zu finden waren. In diesem Dorf waren 586 Personen untersucht worden. Den an der Studie teilnehmenden Personen wurden venöse Nacht- und Tagblutproben entnommen. Je 1 ml Tag- und Nachblut von jedem Teilnehmer wurden mit der Filtermethode auf Mikrofilarien untersucht (Polycarbonat-Filter mit 5 µm Porendurchmesser von Millipore, Eschborn, Deutschland, WHO 1997). Anschließend wurden die mit Giemsa-Lösung gefärbten Filter bei 100facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht und die gefundenen Mikrofilarien ausgezählt. Insgesamt wurden bei 157 (27 %) Personen Mikrofilarien von *B. timori* gefunden. Die mediane Mikrofilariendichte lag bei 138 Mf / ml Nachtblut. Bei 77 Patienten (13%) wurden Lymphödeme oder bereits massive Elefantiasis beobachtet. Von einigen Personen wurden nach kurzer körperlicher Betätigung, die das Abhusten erleichtern sollte, Sputumproben gewonnen.

Als Positivprobe (vgl. 2.3.) im Rahmen der PCR-Experimente stand mir extrahierte *B. malayi*-DNA von der indonesischen Insel Sulawesi, die nordöstlich von Alor liegt, zur

Verfügung. Diese DNA war im Rahmen von anderen Untersuchungen (Fischer et al. 2000, Klüber et al. 2001) extrahiert worden.

Die im Rahmen von HhaI-Sequenzvergleichen per PCR und Gelelektrophorese analysierte *B. pahangi*-DNA (vgl. 3.2.1.) war freundlicherweise von S.A. Williams zur Verfügung gestellt worden (vgl. Xie et al. 1994a).

Die von mir im Rahmen der Multiplex-PCR verwandte *W. bancrofti*-DNA stammte von mit *W. bancrofti* infizierten Patienten von Alor.

Die Studie war vom indonesischen Gesundheitsministerium genehmigt worden. Eine ethische Clearance wurde vom Ethical Committee of the Medical Faculty, University of Indonesia, Jakarta erteilt. Dr. Supali, mit der im Rahmen dieses Projektes kooperiert wurde, und ihre Mitarbeiter gehören zur Universität Jakarta. An der Studie nahmen nur Personen teil, die älter als fünf Jahre waren. Von allen Teilnehmern und bei den Kindern von den Erziehungsberechtigten wurde nach entsprechender Aufklärung die Zustimmung zur Probenentnahme eingeholt.

Im Rahmen dieses Aufenthaltes und der Folgeaufenthalte 2002, 2003 und 2004 (Oqueka et al. 2005) wurden auch sozialmedizinische und hygienische Beratungsgespräche (Abb. 2) und eine Massenbehandlung mit DEC und Albendazol durchgeführt, die aber nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.



**Abb. 2: Schulungsprogramm: Im Rahmen sozialmedizinischer und hygienischer Beratung werden Patienten auf Alor in die Pflege der Lymphödeme eingewiesen.**

**(Foto: PD Dr. Fischer)**

## **2.2. Stechmücken**

Ebenfalls im Frühjahr 2001 und im Dezember 2001 wurden von einigen Einwohnern Alors Stechmücken gefangen und konserviert (Fischer et al. 2002). Die Mücken wurden nachts zwischen 19.00 und 6.00 Uhr von geschulten Fängern am Körper gefangen („human bait method“, Gillespie et al. 2001). Das war der Zeitraum, während dessen die nachtaktiven Mücken zur Blutmahlzeit anfliegen. Die Mücken wurden dann in der Mittagssonne getrocknet. Ein indonesischer Entomologe unterteilte die gesammelten Mücken nach morphologischen Kriterien in *A. barbirostris* und *Culex*, andere Anopheles-Spezies, wie *A. maculatus*, *A. subpictus* und *A. sundaicus* wurden nur vereinzelt gefangen.

Die sortierten Mücken wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu einer der beiden Gattungen in Gefäße gegeben, sodass sich mehrere Pools mit jeweils Mücken derselben Gattung ergaben. Dieses Verfahren der Bildung von Pools („pooling“) wird für epidemiologische Studien, bei denen die PCR verwendet wird, üblicher Weise benutzt (Hoti et al. 2001, Williams et al. 2002, Goodman et al. 2003). Es ermöglicht eine schnelle und einfache Testung großer Probenkollektive. So werden z. B. auch Proben aus Blutspenden gepoolt, um eine schnelle und kostengünstige Testung auf Infektionen wie HIV oder Hepatitis vorzunehmen (Schottstedt et al.1997). Findet man einen Pool mit Infektionen, so werden die in diesem Pool enthaltenen Blutproben erneut einzeln getestet, um den infizierten Spender zu erkennen. Bei Verwendung von Pools müssen weniger Tests durchgeführt werden, als wenn jede Probe einzeln untersucht wird.

Im Gegensatz zum Pool-Verfahren bei Blutspendern, poolten wir immer die ganzen Mücken und behielten kein Restmaterial übrig. Individuelle Aussagen über einzelne Mücken sind so nicht möglich. Sie sind in diesen epidemiologischen Untersuchungen jedoch irrelevant, sodass kein Material einzelner Mücken verwendet werden musste.

So wurden 1266 Mücken aus Mainang auf Alor mit der PCR untersucht: 61 Pools mit 642 *Anopheles* und 33 Pools mit 624 *Culex*. Weitere Mücken aus Mainang wurden für Vorversuche verwendet (vgl. 3.2.5.).

## **2.3. Positive Kontroll-DNA**

### **2.3.1. Positivprobe mit *O. volvulus***

Als positive Kontrolle wurde für die *O. volvulus*-Experimente DNA benutzt, welche von mir durch DNA-Extraktion aus adulten Würmern gewonnen wurde. Hierfür wurden Würmer aus Uganda nach folgendem Protokoll behandelt, um die DNA zu extrahieren.

In 80% Ethanol konservierte Würmer wurden in PBS gewaschen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zermörsert. Nach Zugabe von 500 µl NET-Puffer, 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 50 µl 10 % SDS wurde gut gemischt und die Suspension wurde 2 Stunden bei 56° C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurden 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol unter dem Abzug hinzugegeben, dann wurde 5 Minuten gemischt und 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Phenol-

Chloroform-Extraktion wiederholt. Nun wurde die DNA mit 0,1 Volumenanteil 3 M Na-Acetat und 1000 µl 100 % Ethanol über Nacht bei  $-20^{\circ}$  C gefällt. Am nächsten Morgen wurde 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %tigem Ethanol gewaschen. Nach abschließendem 10-minütigem Trocknen bei  $60^{\circ}$  C wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

Durch Herstellen einer Verdünnungsreihe erhielt ich positive Kontrollen verschiedener DNA-Konzentrationen. Dies war beim Austesten der richtigen Reagenzienkonzentration für PCR, ELISA und DNA-Detection-Test Strips ein wichtiges Instrument, das mir half, die beste Konzentration der internen Kontroll-DNA (siehe unten) zu erkennen. Zudem ermöglichte mir dieses Vorgehen, den Zusammenhang zwischen den von mir erhobenen quantitativen ELISA-Daten und dem realem DNA-Konzentrationsabfall zu charakterisieren (vgl. 2.6.5.).

### **2.3.2. Positivprobe mit *B. timori***

Als positive Kontrollen wurde für die *B. timori*-HhaI-PCR-Experimente zunächst *B. malayi*-DNA verwendet (vgl. 3.1.2.), später stand *B. timori*-DNA zur Verfügung, die aus extrahiertem und positiv getestetem Probenmaterial bezogen wurde oder für die ich einzelne nicht extrahierte Mikrofilarien verwandte. Diese wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen unter dem Mikroskop gesucht und es konnten dann einzelne Mikrofilarien vom Objektträger abpipettiert werden. Sie wurden in wählbaren Mengen von Wasser verdünnt, mit einem Vortex gründlich gemischt und bei  $95^{\circ}$  C kurz gekocht. Ein DNA-Nachweis war so auch ohne weitere Extraktionsprozedur möglich. Ohne den Zellaufschluss lagen intakte Mikrofilarien definierter Konzentration vor. Diese konnte man zum Nachweis der Effizienz von Extraktionsmethoden benutzen, indem man sie garantiert negativem Testmaterial, z. B. meinem eigenen Blut, in definierten Konzentrationen zusetzte. So ließ sich der Extraktionserfolg abschätzen.

## **2.4. Reagenzien**

### **2.4.1. Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Biotechnologies (Köln, Deutschland) bezogen. Für jede PCR werden zwei Primer benötigt (Schnell & Mendoza 1997). Das sind DNA-Fragmente, die möglichst spezifisch an die beiden Enden der zu amplifizierenden Ziel-

Sequenz binden. Dann erfolgte mittels des Schlüsselenzyms, der Polymerase, in einer von einem Thermocycler gesteuerten Reaktion, der PCR, mit Hilfe weiterer Reagenzien die Amplifikation des Targets. Für Sequenzierungs-Reaktionen nach der Kettenabbruch-Methode wird hingegen nur ein Primer benötigt, der es ermöglicht, die DNA-Sequenz mit einem Big-Dye-Farbstoff zu markieren. Dieser Farbstoff ermöglicht mittels Sequenzierung ein Ablesen der DNA-Sequenz.

Die folgende Tabelle listet die für meine Experimente verwendeten Primer jeweils paarweise zusammengehörig auf. Ihre DNA-Sequenz, das Target, für das sie verwendet wurden, und eine Referenz, die mit diesen Primern erzielte Ergebnisse darstellt, werden ebenfalls aufgeführt. Außerdem wurden von PD Dr. P. Fischer zur Verfügung gestellte Ascaris-Primer für die Sputumuntersuchung verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Primer**

Name des Primers	Nukleotid-Sequenz	Referenz	Target
HhaI-F HhaI-R	5`GCGCATAAATTCATCAGC3` 5`GCGCAAACCTTAATTACAAAAGC3`	Williams et al. 1988	<i>Brugia</i> HhaI-Repeat
Pf-F Pf-R	5`GCTACATATGCTAGTTGCCAGAC3` 5`CGTGTACCATACATCCTACCAAC3`	Laserson et al. 1994	<i>P. falciparum</i>
Ov-S3 Ov-S4	5`ATCAATTTTGCAAAATGCG3` 5`AATAACTGATGACCTATGACC3`	Fischer et al. 1996	<i>O. volvulus</i> , O-150-Repeat
Nv-1 Nv-2	5`CGTGATGGCATCAAAGTAGCG3` 5`CCCTCACTTACCATAAGACA3`	Williams et al. 1996	<i>W. bancrofti</i> , Ssp1-Repeat
HhaI-nF HhaI-nR	5`CTTACATTAGACAAGGAAATTGGT3` 5`CCAGCACTGGTACAATGCACG3`	Persönliche Mitteilung Dr. Fischer	Innerhalb des HhaI (nested-PCR-Primer)
Cox2-F	5`AATTCTTATGTTTTTTGTTG3`	Persönliche Mitteilung	Mitochondriale DNA von <i>B.</i>

Cox2-R	5`TTCCAACACTCCAAAGAAG3`	Dr. Fischer	<i>malayi</i> und <i>B. timori</i>
5S spacer-F	5`GTTAAGCAACGTTGGGCCTGG3`	Xie et al.	Ribosomale
5S spacer-R	5`TTGACAGATCGGACGAGAATG3`	1994b	Filarien-DNA
ITS-2-F	5`TCGATGAAGAACGCAGCT3`	Gasser et al.	Nematoden-DNA
ITS-2-R	5`TTAGTTTCTTTTTCCTCCGCT3`	1996	
Wol-16S-F	5`CTACCTGGTAGTACGGAATAATT3`	Fischer et al.	Wolbachien-DNA
Wol-16S-R	5`TCACCTCTACACTAGGAATTCCT3`	2002	
Wol-FTSZ-F	5`CTTGGTGCTGGTGCTTTGCCT3`	Fischer et al.	Wolbachien-DNA
Wol-FTSZ-R	5`TACCAATCATTGCTTTACCCA3`	2002	
M13-F	5`TCGTGACTGGGAAAAC3`	Invitrogen:	Vektor-
M13-R	5`CAGGAAACAGCTATGAC3`	TA-Cloning Manual	spezifischer Primer
T7	5`GTAATACGACTCACTATAGGGC3`	Invitrogen: TA-Cloning Manual	Sequenzier- Primer

Um ein PCR-Produkt mit Southern Blotting, DNA-Detection-Test Strip oder ELISA erkennbar zu machen, benötigt man biotinierte PCR-Produkte und eine digoxigenierte, bzw. für den ELISA fluoreszinierte, Sonde. Zur Biotinilierung der Produkte wurden folgende mit Biotin gekoppelte Primer verwendet: HhaI-R, HhaI-nR, OVS3 und NV2. In digoxigenerter Form lag der HhaI-nF-Primer vor, was eine PCR-Erfolgskontrolle unmittelbar nach der PCR ermöglichte.

Sequenzierungsreaktionen wurden meist an PCR-Produkten in biotinierter Form durchgeführt, da diese aufgrund meiner Testungen hierfür schon vorlagen. In den seltenen Fällen, in denen der Einbau in den Vektor nicht gelang, wurde auf nicht biotinierte Produkte zurückgegriffen. Tabelle 2 stellt die verwendeten Sonden dar, welche sowohl in fluoresziniertes, als auch in digoxigenerter Form vorlagen.

**Tabelle 2: Verwendete DNA-Sonden**

Sonden- Bezeichnung	Sequenz	Einsatzzweck
HhaI-Sonde	5`ACGTGAATTGTACCAGTGCTGGTCG3`	<i>B. timori</i> / <i>B. malayi</i> - Diagnostik mittels HhaI-Repeat (Klüber et al. 2001)
Bm-control	5`TTACGTCGCCCTTCGCTAGTCTCT3`	Nachweis einer internen Kontroll-DNA für das HhaI- Repeat (Klüber et al. 2001)
O.v.-S2	5`AATCTCAAAAAACGGGTACATAC3`	<i>O. volvulus</i> - Diagnostik mittels O-150-Repeat (Zimmermann et al. 1993)
O.v.I.K.- Sonde	5`AGTCTGTATGCGTATC3`	Nachweis der <i>O. volvulus</i> internen Kontroll-DNA (Sonde entspricht komplementärem Strang der internen Kontroll-DNA an den Positionen 40-56)

Als interne Kontroll-DNA wurde ein von der Virologie am BNI mittels ABI DNA Synthesizer (Applied Biosystems Instruments, Foster City, CA, USA) synthetisiertes 106 bp langes DNA-Fragment verwendet, welches im Randbereich Bindungsstellen für die O-150-Primer, Ov-S3 und Ov-S4, aufwies. Diese interne Kontroll-DNA hatte die Sequenz:

5`ATC AAT TTT GCA AAA TGC GTT TTG GAC CCA ATT CGA ATG GAT ACA GCA  
TAC AGA CTC GAA TAT TTT TCT TAG GAC CCA ATT CAG GGT CAT AGG TCA  
TCA GTT ATT A`3.

## 2.4.2. Reagenzien für die PCR

Es wurde hauptsächlich mit zwei verschiedenen Polymerasen gearbeitet, die große Unterschiede hinsichtlich der für sie idealen Anwendungsgebiete zeigten. In der *O. volvulus*-O-150-Diagnostik hat sich die DNAzyme II-Polymerase (Biometra, Göttingen) bewährt. Diese ist eine kostengünstige Polymerase, die in aktiver Form vorliegt. Für die *B. timori*-HhaI-Diagnostik zeigte hingegen die Hotstar-Polymerase (Qiagen, Hilden) bessere Resultate (vgl. 3.2.4.). Diese Polymerase ist zwar teurer als die DNAzymeII-Polymerase, ist jedoch, da sie einen Aktivierungsschritt am Anfang der PCR benötigt, spezifischer als die DNAzymeII.

### Routinemäßige PCR-Ansätze

-Ein O-150-PCR-Ansatz enthielt für 1 Probe:

1 µl DNAzymeII-Polymerase (2 U/ µl) ,  
Je 1 µl Primer (20 pm/ µl) ,  
2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM),  
5 µl 10x Puffer,  
12 µl dNTP's (1,25 pm/ µl),  
25,5 µl H<sub>2</sub>O,  
1 µl Probe,  
1 µl interne Kontroll-DNA (500 fg/ µl).

-Ein HhaI-PCR-Ansatz enthielt für 1 Probe:

0,25 µl HotStarPolymerase (5 U/ µl),  
Je 1 µl Primer (20 pm/ µl),  
4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM),  
5 µl 10x Puffer,  
8 µl dNTP's (1,25 pm/ µl),  
28,75 µl H<sub>2</sub>O,  
plus 1-2 µl Probe.  
Puffer und MgCl<sub>2</sub> waren im Lieferumfang der jeweiligen Polymerase enthalten.

Für Sputumproben wurde im Rahmen der *B. timori*-Untersuchungen ein DNAzymeII-Ansatz verwendet, der bis auf die HhaI-Primer anstelle der S3/ S4-Primer dem typischen O-150-Ansatz entsprach. Da hierbei Kreuzreaktionen zu beobachten waren (vgl. 3.2.4.), wurde die DNAzymeII-Polymerase bis auf die bereits erwähnte *O.volvulus*-Skin Snip-Studie nicht weiter verwandt.

Alle anderen PCR-Ansätze, deren Zusammensetzung nicht gesondert erwähnt wird, wurden entsprechend dem „*Brugia*-HhaI-Protokoll“ hergestellt.

Für sogenannte M13-PCR-Reaktionen, bei denen eine eingebaute Zielsequenz aus einem Vektor heraus amplifiziert wird (s.u.), verwendete ich 30-47 µl PCR-Supermix (Invitrogen, Leek, NL) und fügte je 1 µl M13-F- und M13R-Primer (10 µM) und 1-2 µl Proben-DNA hinzu.

### 2.4.3. Lösungen, Puffer, Chemikalien

Die von mir verwendeten Materialien bezog ich von den in Tabelle 3 angegebenen Quellen.

**Tabelle 3: Materialien und ihre Herkunft**

Quelle	Material
Applied Biosystems, Nieuwerkerk, NL	Big Dye für Sequenzierungen
Biometra, Göttingen	Primer und Sonden, DNA-zymeII-Polymerase
Biomol, Hamburg	Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch
BioRad, Richmond, USA	Sodiumdodecylsulfat (SDS)
BNI, Hamburg	Interne Kontroll-DNA (hergestellt von der Virologie am BNI mittels Applied Biosystems Instruments DNA Synthesiser), Big Dye (für Sequenzierungen)
Boehringer, Mannheim	Ampicillin
Invitrogen, Leek, NL	PCR-Supermix, TA-Cloning-Kit, SOC-Medium
Labsystems, Helsinki, Finland	Combiplate 8 EB, Cliniplate Cat. No. 95029100
Merck, Darmstadt	Anorganische Salze, Säuren, Basen und Puffersubstanzen
New England Biolabs, Beverly, MA,USA	Restriktionsenzyme
PeQLab, Erlangen	100 bp- und 1000 bp-DNA-Leiter, dNTP's, Loadind Dye
Roche, Mannheim	DNA Detection Test Strips™, Anti-FI-Ap Fab Fragment, Anti-Dig-Ap-Konjugat, Anti-Fluorescein Ap-konjugierter Antikörper
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Proteinase K, Streptavidin, AP-Substrattabletten,

Ethidiumbromid, Triton-X-100, Tween 20, LB-Medium,  
Agar, Dithiothreitol (DTT), Restriktionsenzyme

Qiagen, Hilden

HotStarTaq™-Polymerase, Qiaprep Spin Miniprep Kit,  
Qia DNA Purifikation Kit, Qia Blood Mini Kit,  
Qia Tissue Mini Kit, DNAeasy-Kit

Die benutzten Lösungen wurden wie in Tabelle 4 angegeben hergestellt.

**Tabelle 4: Lösungen und ihre Herstellung**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<u>4x AP Substrat-Puffer (18° C)</u>	NaHCO <sub>3</sub>	1,69 g
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,51 g
	MgCl <sub>2</sub>	0,41 g
	H <sub>2</sub> O ad	500 ml
<u>Assay-Puffer</u>	Diethanolamine (DEA, Sigma)	5,5 ml
	H <sub>2</sub> O ad	500 ml
	MgCl <sub>2</sub> (zuvor auf pH 10 bringen)	5 g
<u>Denaturierungslösung</u>	0,5 M NaOH	20 g
	1,5 M NaCl	87,66 g
	H <sub>2</sub> O ad	1 l
<u>DIG-Puffer 1</u>	0,1 M Maleinsäure	11,6 g
	0,15 M NaCl	8,8 g
	H <sub>2</sub> O ad	1 l
	(pH 7,5)	
<u>DIG-Puffer 2</u>	10 %ige Blockierungsvorratslg.	100 ml
	DIG-Puffer 1	900 ml
<u>DIG-Puffer 3</u>	1 M Tris-Puffer pH 8	100 ml
	0,1 M NaCl	5,84 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (0,05 M)	10,17 g
	H <sub>2</sub> O ad	1 l
	(pH 9,5)	
<u>DIG-Waschpuffer</u>	DIG-Puffer 1 mit 0,4 % Tween 20	
<u>DSP-Puffer (18°C)</u>	1M Tris, pH 8,0	10 ml
	1M KCl	25 ml
	1M MgCl <sub>2</sub>	1,25 ml
	H <sub>2</sub> O ad	500 ml

<u>DSP-Spezial-Puffer (frisch)</u>	DSP-Puffer	980 µl
	Proteinase K (10 mg/ ml)	15 µl
	Tween 20	5 µl
<u>Hybridisierungslösung</u>	Formamid	50 ml
	10 % Blockierungsvorratslsg.	20 ml
	20x SSC	25 ml
	Laurylsacrosin (100 mg/ ml)	1 ml
	10 % SDS	200 µl
	H <sub>2</sub> O 3,8 ml	
<u>Hybridisierungs- waschpuffer 1</u>	20x SSC	10 ml
	10 % SDS	200 µl
	H <sub>2</sub> O ad	100 ml
<u>Hybridisierungs- waschpuffer 2</u>	20x SSC	500 µl
	10 % SDS	200 µl
	H <sub>2</sub> O ad	100 ml
<u>Neutralisierungslösung</u>	1 M Tris	121 g
	3 M NaCl	175,3 g
	H <sub>2</sub> O ad	100 ml
	(pH 9,5)	
<u>RBCL-Puffer (4° C)</u> ( <u>R</u> ed- <u>B</u> lood- <u>C</u> ell- <u>L</u> ysis- <u>P</u> .)	Saccharose	171,2 g
	1 M Tris, pH 7,6	5 ml
	1 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O	316,3 ml
	Triton X-100	5 ml
<u>20x SSC</u>	NaCl	174 g
	Natriumzitat-Dihydrat	88,2 g
	H <sub>2</sub> O ad	1 l
	(pH 9,5)	
<u>50x TAE</u>	2 M Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA-Lsg. (pH 8,0)	100 ml
	H <sub>2</sub> O ad	1 l
<u>TE-Puffer</u>	0,5 M Tris	60,5 g
	0,5 M EDTA-Lsg. (pH 8,0)	100 ml
	H <sub>2</sub> O ad	1 l

#### **2.4.4. DNA-Konservierungsmaterialien**

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit ist der Vergleich der Brauchbarkeit verschiedener Blutproben-Konservierungs- und Extraktionsmethoden zur Erhaltung der DNA unter tropischen Bedingungen. Diese Fragestellung behandelte ich an Blutproben aus Mainang, welche jeweils mit Guanidin, Urea und EDTA konserviert worden waren und mit den entsprechenden Extraktionsmethoden anschließend aufbereitet wurden (vgl. 2.6.1.).

Für die Guanidin-Konservierung wurden 200 µl 8 M Guanidin-Thiocyanat mit 200 µl Blut versetzt. Für die EDTA-Methode wurden 50 µl 0,5 M EDTA mit 200 µl Blut versetzt. Bei der Urea-Konservierung gab man zu 200 µl 16 M Urea 200 µl Blut.

#### **2.5. Geräte**

ABI GeneAmp PCR System 9700 (ABI, Foster City, CA, USA)

Eppendorf-Pipetten, 1-10 µl- Pipette, 10-100 µl- Pipette, 100-1000 µl- Pipette (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

Eppendorf-Tischzentrifuge, (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

Eppendorf-Thermomixer, (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

PE-Thermocycler, (Perkinson Elmer, Applied Biosystems, Nieuwerkerk, NL)

Gelelektrophoresekammer (Fröbel Labor Technik, Wasserburg)

Photometer, Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Freiburg)

ELISA Reader (Anthos Mikrosysteme, Krefeld)

Vakuumblotter (Biometra Göttingen)

Hybridisierungssofen Compact Line OV 4 (Biometra, Göttingen)

#### **2.6. Vorgehensweisen**

##### **2.6.1. Extraktionsmethoden**

Die Skin Snip-Proben aus Uganda wurden nach folgendem Protokoll behandelt (Fischer et al. 1996, 1998; Pischke et al. 2002):

Zunächst wurden die Skin Snips in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, anschließend wurden 25 µl NET-Puffer, 2,5 µl 10 % SDS und 0,25 µl 1 M DTT hinzugegeben. Nach einer Stunde

Inkubation bei 56° C, wurden 100 µl NET-Puffer und 1 µl Proteinase K hinzugegeben. Nach zwei weiteren Stunden Erhitzen bei 56° C und 10 Minuten bei 95° C wurden 130 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt. Es wurde fünf Minuten gut gemischt und 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Waschung wurde wiederholt. Es wurden 13 µl 3 M Na-Acetat und 260 µl 100 % Ethanol hinzugegeben. Dann wurde 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und es wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst. Zuletzt wurde die Probe, zwecks Nukleasen-Inaktivierung, fünf Minuten bei 95° C inkubiert.

Die DNA aus den EDTA-Blutproben (vgl. 2.4.4.) aus Indonesien wurde durch folgende Methode extrahiert: 200 µl EDTA-Blutprobe wurden mit 500 µl TE-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gründlich gemischt und dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zwei Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde einmal mit 500 µl TE, dann mit 500 µl RCBL gewaschen. Jetzt wurden 200 µl DSP-Spezial-Puffer hinzugefügt, es wurde gründlich gemischt und zwei Stunden inkubiert bei 60° C. Nach einer Stunde wurde die Inkubationszeit vorübergehend für ein weiteres Vermischen unterbrochen. Nach der Inkubation wurde die im DSP-Spezial-Puffer enthaltene Proteinase K durch 15-minütiges Erhitzen bei 95° C inaktiviert, dann wurde kurz zentrifugiert.

Die Urea-Proben wurden nach demselben EDTA-Protokoll extrahiert, zumal Vorversuche gezeigt hatten, dass die eigentliche Urea-Proben-Extraktionsmethode (Gelhaus et al. 1995) keine Steigerung der Sensitivität versprach.

Die Guanidin-Proben wurden nach dem folgendem Protokoll extrahiert.

1 ml 6 M Natriumjodid und 10 µl Silica wurden zu 100 µl Guanidin-Blutprobe hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und eine Stunde auf Eis aufbewahrt. Nach kurzer Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand vorsichtig verworfen. Waschpuffer (0,01 M Tris HCl, pH 7,5; 0,05 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8, Ethanol 50 %) wurde hinzugegeben. Nach kurzem Mischen und erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Pellets wurden anschließend mit 100 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Abschließend wurde das Silica-Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Für die Extraktion der DNA aus Sputum-Proben wurde von mir zunächst das bereits bei *Wuchereria* erfolgreich etablierte Protokoll verwendet (Abbasi et al. 1996, 1999). Nachdem dieses Protokoll sich als erfolglos erwiesen hatte (vgl. 3.2.4.) und auch Abwandlungen des Protokolls durch mehrfach modifizierte Zeiten und Konzentrationen keinen Erfolg erbracht hatten, probierte ich die Extraktion mittels eines kommerziellen Kits (Qiagen, DNA-Tissue-Mini-Extraction-Kit). Diese DNA-Isolierung (gemäß Qiagen-Anleitung) brachte erfolgreiche Resultate und so ließ sich erstmalig *Brugia*-DNA in Sputumproben nachweisen (vgl. 3.2.4.).

Die Moskito-Pools wurden in 180 µl PBS homogenisiert und anschließend mittels DNAeasy-Kit (Qiagen) extrahiert .

## 2.6.2. PCR

Aufgrund der Unterschiede in der Amplifikationseffizienz zwischen der DNAzymeII- und der HotStar-Polymerase wurde DNAzymeII für die O-150-Amplifikation verwendet und HotStar für die HhaI-PCR benutzt (vgl. 3.2.4.).

Für alle PCR-Prozesse mit Ausnahme der Klonierungs- und Sequenzierungsschritte und der Plasmodien-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

95° C	15 min		
55° C	2 min		
72° C	30 sek	}	35 Zyklen
94° C	30 sek		
55° C	30 sek		
72° C	5 min		
4° C	bis Entnahme		

Für die Plasmodien-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

95° C	12 min		
50° C	2 min		
72° C	45 sek	}	35 Zyklen
95° C	20 sek		
52° C	45 sek		
72° C	5 min		
4° C	bis Entnahme		

## **2.6.3. Nachweis von PCR-Produkten**

### **2.6.3.1. Gelelektrophorese**

Die verbreitetste Methode zum Nachweis von PCR-Produkten ist die Gelelektrophorese. Für die diagnostische Anwendung wurden in dieser Studie 5 µl PCR-Produkt auf ein 1,5 %tiges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid (0,0006 %) 10 Minuten gefärbt. Nach 15 Minuten Entfärben in deionisiertem Wasser wurden die Banden unter einer UV-Beleuchtung mittels einer Kamera dokumentiert.

### **2.6.3.2. DNA-Test Strip**

Ein anderes, sehr spezifisches Nachweisverfahren von PCR-Produkten ist der DNA-Test Strip (Klüber et al. 2001). Dieser Schnelltest funktioniert, indem man 10 µl biotiniertes PCR-Produkt mit 5 µl sogenannten „labelled dinucleotids“ fünf Minuten bei 95° C hybridisiert. Für die Herstellung der „labelled dinucleotids“ werden 10 µl einer für die Target-Sequenz spezifischen digoxigenierten Sonde (vorherige Konzentration, je nach Target zwischen 1 ng/µl und 16 ng/µl) in 90 µl ELISA-Puffer verdünnt. Die empfehlenswerte Konzentration der Sonde in den „labelled dinucleotids“ sollte für das O-150-Repeat 2 ng/µl betragen. Eine stärkere Verdünnung senkt die Sensitivität der Versuche, eine schwächere verursacht nur unnötigen Sondenverbrauch und fördert lediglich die Detektion von Kontaminationen. Die entsprechende Konzentration für das HhaI-Repeat sollte hingegen 16 ng/µl betragen, da hiermit in Vorversuchen die besten Resultate erzielt wurden.

Nach der Hybridisierung wurden die Proben 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Dann wurden 5 µl des Produktes auf das weiße Auftragungsfeld des Test Strip pipettiert. Nach circa einer Minute färbt sich entweder nur die Kontroll-Linie, dann ist der Test negativ und keine Target-DNA nachweisbar oder es färben sich zwei Linien und der Test ist positiv. Quantitative Aussagen aufgrund der Intensität der gefärbten Positiv-Linie zu machen, ist nur sehr bedingt möglich und erfordert Übung. Für quantitative Aussagen muss die Verdünnung der Sonde verändert werden. Bleibt ein PCR-Produkt auch bei stärkerer Verdünnung nachweisbar, während ein anderes ehemals positives nun negativ erscheint, so weiß man, in welchem mehr DNA enthalten war. Vergleichend kann man nun anhand mehrerer Strips DNA-

Konzentrationsunterschiede ermitteln. Ein solches Verfahren ist auf Grund des hohen Verbrauchs an Test Strips und der damit verbundenen Kosten, ein Strip kostet circa einen Euro, für die ständige Anwendung ungeeignet.

### **2.6.3.3. ELISA der PCR-Produkte**

Ein einfacher und kostengünstiger Weg zu quantitativen Aussagen ist der PCR-Produkte-ELISA. Bei dieser Technik testeten wir bis zu 23 PCR-Produkte in einer 96-Well-Platte (Bockarie et al. 2000, Kamal et al. 2001), die zuvor über Nacht mit 25 µl Streptavidin (Sigma, 0,5 mg/ ml), gelöst in 10 ml Beschichtungs Carbonate Buffer, beschichtet wurde. 100 µl dieser Lösung müssen zunächst pro Vertiefung über Nacht bei 4° C enthalten sein. Dann klopft man die Platte leer und wäscht mit 100 µl 2x PBS. Nun mischt man 30 µl PCR-Produkt mit 370 µl Hybridisierungspuffer und pipettiert je 100 µl hiervon in vier nebeneinander liegende Vertiefungen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur, werden pro Vertiefung 100 µl 0,3 M NaOH hinzu gegeben und die Platte wird erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS und anschließend mit Hybridisierungspuffer gibt man 100 µl „fluoreszinierende Sonde“ hinzu. Diese Sonde war hergestellt worden, indem 20 µl HhaI- oder O-150-Sonde in ein 2 ml Reaktions-Gefäß pipettiert und 1980 µl Hybridisierungspuffer hinzu gegeben worden waren. Ebenso wurden in einem zweiten Gefäß zu 20 µl der dazugehörigen internen Kontroll-Sonde 1980 µl Hybridisierungspuffer hinzu gegeben. Wichtig ist, dass diese Lösung fünf Minuten bei 95° C hybridisiert wurde und, dass die Sondenkonzentration pro Vertiefung 50 pg beträgt. Nach erneuter Inkubationszeit von 30 Minuten bei 55° C, wurde zweimal mit 1x PBS und einmal mit 1x PBS/ BSA (5 Minuten, 55° C) gewaschen. Nun wurden 100 µl Anti-fluorescein-Antikörper-Lösung zugefügt (Boehringer Mannheim, Verdünnung von 1:3000 in PBS/ BSA). Nach 30minütiger Inkubation bei 37° C wurde dreimal mit 100 µl PBS/ Tween und zweimal mit 100 µl Assay-Puffer gewaschen.

Als Abschluß wurden, nachdem 2 Tabletten AP-Substrat (Sigma 104) in 10 ml AP-Puffer gelöst worden waren, 100 µl dieser Lösung in jede Vertiefung gegeben und es wurde bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Unter Standardbedingungen konnte die Platte nach 30-60 Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem ELISA-Reader gemessen werden. Die von mir verwendeten Platten (Labsystems Cliniplate) bieten den Vorteil eines sehr geringen „Hintergrundeffekts“, das heißt sie färben sich zwar langsamer als andere Platten ein, dafür ist

die Trennschärfe zwischen Target-DNA-haltigen und Target-DNA-leeren Proben erheblich besser. Ein Ablesen der Platte erfolgte somit meist erst nach 1,5-2 h. Es besteht die Möglichkeit der Aufbewahrung der Platte bei 4° C im Kühlschrank über Nacht. Dies ermöglicht ein geringeres Fortschreiten der Farb-Reaktion als bei 37° C und ein erneutes Messen am nächsten Morgen. Ein großer Vorteil dieser Platten ist somit die flexible Zeitplanung des Versuchs. Bei Platten anderer Hersteller führt ein derartiges Vorgehen zu sehr starker Gelbfärbung aller Wells und somit zu einer schlechten Trennschärfe.

Nach dem Messen ergab sich für jede der 96 Vertiefungen ein Messwert. In vier Vertiefungen war keine Probe hinzugefügt worden, die Werte für diese sogenannten „Blanks“ wurden gemittelt. Ebenso wurde für jede Probe der Mittelwert für die beiden Felder dieser Probe, denen die *O. volvulus*-Sonde zugefügt worden war, ermittelt, genauso wie für die beiden Felder mit der internen Kontroll-Sonde. Somit erhielt ich für jede Probe einen *O. volvulus*-Wert und einen internen Kontroll-Werte. Nun subtrahierte ich hiervon jeweils den Blank-Mittelwert. Somit erhielt man für jede Probe einen endgültigen „*O. volvulus*-ELISA-Wert“ und einen endgültigen „internen Kontroll-ELISA-Wert“. Als positiv bewertet wurden die Proben, die einen *O. volvulus*-Wert hatten, der größer als der Wert der Negativkontrolle plus drei Standardabweichungen war. Für diese Proben wurde nun der *O.volvulus/* interne Kontrolle-Wert ermittelt: durch Division des *O.volvulus*-Wertes durch den internen Kontroll-Wert sollten semiquantitative Einstufungen der Proben vorgenommen werden. Ähnliches war schon erfolgreich für *Wuchereria* gemacht worden (Fischer et al. 1999).

#### **2.6.3.4. Southern Blotting**

Zunächst wurde das Agarosegel mit den Banden der Amplifikate zweimal in 100 ml Denaturierungspuffer denaturiert. Dann wurde die DNA mit Hilfe eines Vakuumbloiters (Biometra) bei 150 mbar und einem 3MM Whatman-Filterpapier auf eine Nylonmembran übertragen. Zur DNA-Fixation wurde die Membran 2 h bei 80° C zwischen trockenem Whatman-Papier gebacken.

Die anschließende Hybridisierung erfolgte nach dem Boeringer-Mannheim-Protokoll.

Zunächst wurde der Blot 1 h bei 42° C in 26 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Dann wurden 200 pmol DIG-markierte Sonde in 4 ml Hybridisierungslösung gelöst und der Blot wurde mit dieser Lösung 10 min bei 95° C denaturiert. Nach kurzer Kühlung auf Eis erfolgte

über Nacht die Hybridisierung bei 50° C im Hybridisierungssofen. Abschließend wurde je zweimal mit 50 ml Hybridisierungslösung 1 und 2 je fünf Minuten bei 50° C gewaschen.

#### **2.6.4. Klonierungen und Sequenzierungen**

Klonierungen und Sequenzierungen wurden mit dem Topo-Ta-Cloning-Kit (Invitrogen), anschließender M13-PCR und folgender Sequenzierungsreaktion nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Klonierungsprozedur wurde gemäß dem Handbuch des Herstellers Invitrogen vorgenommen. Es erfolgte also eine Ligation des PCR-Produktes in den Vektor, Klonierung in *E. coli*, Ausstrich und Bebrütung auf LB-Platten und Auswahl der erfolgreich klonierten Kolonien. Anhand der in der Vektor-DNA kodierten Ampicillin-Resistenz und der X-Gal/ Blau-Weiß-Selektion ließen sich Kolonien mit Ligation von solchen ohne Ligation unterscheiden.

Die positiven Klone wurden dann in eine M13-PCR eingebracht. Hierbei wird mittels M13-F- und M13-R-Primern das eingebaute PCR-Produkt, zusammen mit einem kleinen Stück Restplasmid auf beiden Seiten, amplifiziert. Das erhaltene M13-PCR-Produkt wurde mittels PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und dann in eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt, in der ein Big-Dye-Farbstoff an die Nukleotide dank des sogenannten T7-Primers gebunden wurde. Alternativ lässt sich auch der M13-Primer hierfür verwenden. Dieser wurde benutzt, wenn die Sequenzierung mit T7-Primer nicht zum Erfolg führte.

Abschließend wurde das Ergebnis am institutseigenen Sequencer abgelesen. Die gemessenen Sequenzen wurden als Computerausdrucke und Computerdateien weiter verwendet.

Alternativ zu der M13-PCR der Klone lässt sich auch mittels Qiagen-Mini-Prep-Kit das Plasmid direkt aus *E. coli* sequenzieren, wenn diese zuvor nach dem Picken in 3 ml LB+Ampicilin-Medium kultiviert wurden. In der Regel wurde eine halbe Kolonie für das Mini-Prep-Verfahren und die andere Hälfte für das M13-Verfahren verwendet, um eine Validierung der Sequenzen zu erhalten.

Ähnlichkeitsvergleiche der gewonnenen Sequenzdaten wurden via Internet mittels der NCBI-Blast-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>) durchgeführt. Alignments und Umschreiben in den reverskomplementären Strang wurden mittels BCM-Search-Launcher ([www.searchlauncher.bcm.tmc.edu](http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu)) im Internet ausgeführt.

Die M13-PCR lief nach folgendem Schema ab:

95° C	3 min	
51° C	2 min	
72° C	30 sek	} 35 Zyklen
95° C	30 sek	
51° C	30 sek	
72° C	7 min	
4° C	bis Entnahme	

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte folgendermaßen:

96° C	10 sek	} 25 Zyklen
50° C	5 sek	
60° C	4 min	

### 2.6.5. Das Prinzip der internen Kontroll-DNA

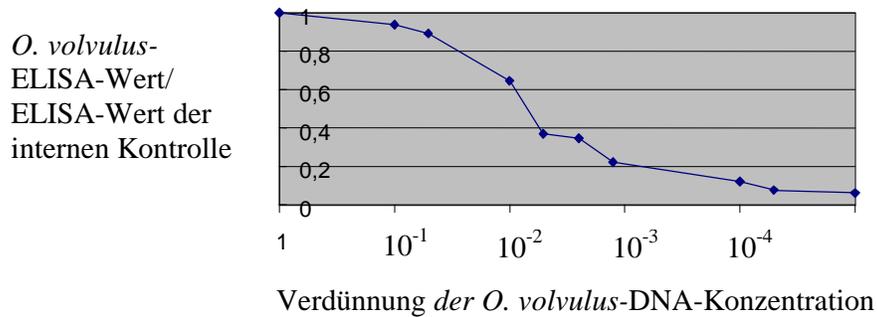
Das interne Kontroll-DNA-Fragment sollte in jedem PCR-Reaktionsgefäß während der PCR-Reaktion enthalten sein, um amplifiziert zu werden. Nach der PCR sollten alle Proben als positiv für Filarien-DNA gelten, die *O. volvulus*-PCR-Amplifikate und interne Kontroll-DNA-Amplifikate enthielten. Als negativ galten diejenigen, die nur interne Kontroll-DNA-Amplifikate enthielten. Diejenigen, die überhaupt kein amplifiziertes PCR-Produkt enthielten, wurden als missglückte PCR-Reaktionen gewertet. Solche Proben bedurften einer wiederholten Testung. Entweder sie enthielten zu viele Inhibitoren, das konnte durch Verdünnen oder Ethanol-fällung ausgeglichen werden, oder sie waren durch einen Pipettierfehler missglückt oder vielleicht lag ein Material- oder Gerätefehler vor. Die theoretisch denkbare Konstellation des Testungsausganges, dass die Probe *O. volvulus*-positiv wäre aber die interne Kontroll-DNA aufgrund der Konkurrenz mit der *O. volvulus*-DNA nicht vervielfältigt würde, wurde von mir nicht beobachtet. Solche Proben wären auch als positiv, sogar als sehr stark positiv zu bewerten gewesen.

Die quantitative Aussage über den *O. volvulus*-DNA-Gehalt der Probe und somit über die Parasitenlast wurde wie folgt getroffen (Fischer et al. 1999; Pischke et al. 2002). Durch den

PCR-ELISA und Subtraktion der Blank-Werte wurde ein photometrisch bestimmter endgültiger „*O. volvulus*-Wert“ ermittelt und dieser entsprechend durch den endgültigen „internen Kontroll-Wert“ geteilt. Ich errechnete also die *O. volvulus*-DNA-Konzentration nach der PCR bezogen auf die Konzentration der internen Kontroll-DNA nach der PCR. Quotientenwerte  $>1$  zeigten an, dass mehr *O. volvulus*-DNA enthalten war als interne Kontroll-DNA. Werte  $<1$  zeigten, dass weniger *O. volvulus*-DNA amplifiziert worden war. Diese Einstufung basierte auf der Annahme, dass in allen PCR-Reaktionsgefäßen dieselbe Menge interne Kontroll-DNA enthalten war. Dies wurde sichergestellt, indem erst der für alle Proben gemeinsame Mastermix inklusive internem Kontroll-Fragment angefertigt wurde und erst dann, nach Mischen und gleichmäßiger Verteilung der internen Kontroll-DNA, eine Verteilung auf die einzelnen Reaktionsgefäße erfolgte. Enthielte eine Probe mehr Inhibitoren, so würde auch die interne Kontrolle geringer amplifiziert und der Quotient würde sich angleichen. In der Durchführung ergab sich das folgende Problem. Erstellt man eine Verdünnungsreihe ein und derselben Probe, so nimmt theoretisch mit jeder Verdünnung ja auch die Konzentration der PCR-Hemmstoffe im gleichen Verhältnis ab, d. h. bei gleicher interner Kontroll-DNA-Konzentration wird die interne Kontrolle viel stärker amplifiziert als ihr vom ursprünglichen Modell zustünde.

Ein einfaches Zahlenbeispiel kann diese Verteilung verdeutlichen. Wenn eine imaginäre Probe per ELISA einen *O. volvulus*-Wert von 10 und einen I.K.-Wert von 5 hat, so erhält die Probe einen *O. volvulus*/interne Kontroll-Quotientwert, aus dem die Abschätzung der Konzentration an PräPCR-*O. volvulus*-DNA-Konzentration erfolgt, von  $10/5 = 2$ . Würde man 10  $\mu\text{l}$  der besagten Probe jedoch in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnen, so würde nur halb soviel *O. volvulus*-DNA der PCR zur Verfügung stehen und der neue *O. volvulus*-Wert wäre, gleich effiziente Amplifikation vorausgesetzt,  $10 \times 0,5 = 5$ . Es stünden doppelt so viele Primer für die Amplifikation der internen Kontrolle zur Verfügung und der neue ELISA-Wert der internen Kontrolle wäre 10. Der neue *O. volvulus*/interne Kontrolle-Konzentrations-Quotient wäre also  $5/10 = 0,5$ . In unserem Beispiel wirkt sich eine Halbierung der *O. volvulus*-DNA und der Inhibitoren derart aus, dass der Konzentrationsquotient auf ein Zehntel fällt. Es kann also kein linearer, sondern es muss eher ein exponentieller Zusammenhang erwartet werden.

Im Rahmen von Vorversuchen überprüfte ich anhand einer *O. volvulus*-DNA-Verdünnungsreihe diese Überlegungen. Das diente der Validierung dieser Methode, weshalb die folgende Darstellung nicht im Ergebnisteil der Dissertation sondern hier erfolgt.



**Abb. 3:** Abhängigkeit des ELISA-*O. volvulus*/ interne Kontrolle-Quotienten von der *O. volvulus*-DNA-Konzentration vor der PCR

Auf der X-Koordinate zeigt Abbildung 3 Verdünnungsstufen bis zum  $10^{-4}$ -fachen der Positiv-Kontrolle, auf der Y-Achse sind die errechneten *O. volvulus*/ interne Kontrolle-Werte aufgetragen. Hierbei wurde um die Darstellung anschaulich zu halten, der *O. volvulus*/ interne Kontrolle-Quotient meiner unverdünnten Positivkontrolle als 1 definiert (der reale Messwert für diese unverdünnte Positivkontrolle war 12,53). Bei  $Y=0,8$  und  $X=0,05$  (circa) entspricht also ein Zwanzigstel der eingesetzten DNA 80 % des Resultatwertes für den Konzentrationsquotienten der unverdünnten Probe. Ein Zehntausendstel der Positivprobe erreicht hingegen 10 % des unverdünnten *O. volvulus*/ I.K.-Wertes.

In der Praxis enthält ein Skin Snip-Extrakt vielleicht nur halb soviel DNA wie ein anderer, doch es ist in den meisten Fällen, von einer Inhibitorenkonzentration in ähnlicher Größenordnung auszugehen. Aus meinen Ausführungen und dem praktischen Experiment der Verdünnungsreihe (Abbildung 3) wird deutlich, dass eine Vorhersage darüber, ob zuverlässige quantitative Aussagen im Lauf der folgenden Experimentreihe gemacht werden können oder nicht, aus theoretischen Überlegungen nicht herzuleiten war. Es bedurfte also des Versuchsergebnisses, um den Erfolg quantitativer Aussagen zu beurteilen.

Nach Austestung in mehreren Verdünnungsreihen gelang es mir, die Konzentration der internen Kontroll-DNA zu bestimmen, die für meine Zwecke optimal war. Verdünnt man die interne Kontroll-DNA zu wenig, so kann sie die *O. volvulus*-Amplifikation unter die Nachweisgrenze drücken. Verdünnt man zu stark, so erhält man sehr hohe *O. volvulus*/ interne Kontrolle-Quotienten, mit denen schlecht Einteilungen möglich sind, außerdem besteht die Gefahr, dass die *O. volvulus*-DNA der internen Kontrolle keine Primer übrig lässt und so eine Amplifikation unterbleibt.

Für die Test Strips spielt die Konzentration der *O. volvulus*-Dig-Sonde eine ähnliche Rolle. Zu starke Verdünnung lässt positive Proben negativ aussehen, zu schwache fördert die Gefahr von falsch positiven Resultaten durch schwache Kontamination.

Vorversuche ergaben als Resultat für einen möglichst guten Versuchsansatz eine *O. volvulus*-Dig-Sonden-Konzentration von 2 ng/  $\mu$ l.

## **2.7. Statistik**

Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse zu quantitativen Aussagen des *O. volvulus*-PCR-ELISAs wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Dieser auch als U-Test bezeichnete Test ist ein sogenannter Rangtest, der unabhängig von einer Normalverteilung ermittelt, ob zwei scheinbar unabhängige Variablen, in unserem Fall der Quotient aus *O. volvulus*-ELISA-Wert und ELISA-Wert der internen Kontrolle und die mikroskopisch gezählte Parasitenlast, doch von einander abhängig sind (siehe 3.1.3.).

Die mit der PCR erzielten Ergebnisse der Hautbiopsien von den Onchozerkosepatienten wurden mittels  $\chi^2$ -Test in der Vierfelderdarstellung überprüft, um festzustellen, ob der ELISA oder der Test Strip das sensitivere Verfahren zum Nachweis von *O. volvulus*-PCR-Produkten ist (vgl. 3.1.3).

Für die Auswertung der Resultate bezüglich der Mücken-Pools aus Mainang wurde für die Berechnung der Infektionsrate der Mücken das Poolscreen Programm, Version 2.02 verwendet (Katholi et al. 1995). Dieses Programm hat sich in vergleichbaren Studien bewährt (Goodman et al. 2003).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Verbessertes Nachweis von *O. volvulus* im Menschen**

##### **3.1.1. Entwicklung einer internen Kontroll-DNA**

Um den PCR-Assay zu standardisieren und falsch negative PCR-Resultate zu vermeiden, wurde eine interne Kontroll-DNA entwickelt und während der PCR koamplifiziert. Mittels dieses Fragmentes war es möglich, zu erkennen, ob zu viele PCR-Inhibitoren den Ablauf der PCR-Testung der einzelnen Proben störten oder nicht. Falsch negative Testergebnisse liessen sich so als solche erkennen.

##### **3.1.2. Nachweis der O-150-PCR-Produkte**

Einzelne Skin Snips von 127 Patienten wurden mittels drei verschiedener Assays getestet: ELISA, DNA-Detection-Test Strip und Gelelektrophorese. 19 Testproben stammten von Probanden aus einer Gegend, in der keine *O. volvulus*-Infektionen aber *Mansonella*-Infektionen vorkommen (Fischer et al. 1998). Diese 19 Proben, von denen bei sieben mikroskopisch eine Streptocerciasis nachgewiesen worden war, waren in jedem der drei Assays negativ. Die interne Kontroll-DNA war jedoch bei allen 19 Proben nachweisbar, sodass falsch negative Resultate, aufgrund von PCR-Inhibition, ausgeschlossen werden konnten.

Diese Versuche sollten unter anderem zeigen, ob der Test Strip oder der ELISA am besten zum PCR-basierten *O. volvulus*-Nachweis geeignet ist. Es wurden 108 Personen aus einem für *O. volvulus* hochendemischen Gebiet getestet. Von diesen waren 69 als mikroskopisch positiv diagnostiziert worden, 67 mittels Test Strip und 57 mittels ELISA.

Tabelle 5 und 6 zeigen, dass mit einer relativen Häufigkeit von 52 % Infizierte mittels ELISA nachgewiesen wurden und mittels Test Strip mit einer relativen Häufigkeit 62 % Infizierte während in der Mikroskopie 69 Proben positiv waren, was einer relativen Häufigkeit von 64 % entspricht.

**Tabelle 5: Vergleich von Mikroskopie und ELISA bei Proben aus einem *O. volvulus*-Endemiegebiet**

Mikroskopie	Anzahl der Patienten	Positive Testergebnisse ELISA(relative Häufigkeit)	ELISA-Mittelwert $X \pm SA$ (Standardabweichung)
0 Mf	39	10 (27 %)	2,0 $\pm$ 0,7
0,1-3 Mf	37	20 (57 %)	1,4 $\pm$ 0,2
3,1-100 Mf	22	17 (77 %)	3,2 $\pm$ 0,6
>100 Mf	10	10 (100 %)	4,4 $\pm$ 1,6
Gesamt (0-1000 Mf)	108	57 (52 %)	

**Tabelle 6: Vergleich von Mikroskopie und Test Strip bei Proben aus einem *O. volvulus*-Endemiegebiet**

Mikroskopie	Anzahl der Patienten	Positive Testergebnisse Test Strip (relative Häufigkeit)
0 Mf	39	12 (31%)
0,1-3 Mf	37	24 (65%)
3,1-100 Mf	22	21 (95%)
>100 Mf	10	10 (100%)
Gesamt (0-1000 Mf)	108	67 (62%)

Es können also sowohl der ELISA als auch der Test Strip für die Diagnostik der Onchozerkose eingesetzt werden. Des weiteren gelang es zu zeigen, dass diese beiden PCR-basierten Techniken in der Gruppe der mikroskopisch negativen Personen aus dem Endemiegebiet 10 bzw. 12 Infizierte nachweisen konnten, während die 19 nicht endemischen Proben alle negativ waren, inklusive der sieben Proben von Personen mit Streptocerciasis.

**Tabelle 7: Darstellung der Sensitivität mit der Mikroskopie als Goldstandard**

In der Mikroskopie positive Proben	Von diesen 69 im ELISA positiv:	Von diesen 69 im Test Strip positiv:
69	47	55

Tabelle 7 vergleicht ELISA und Test Strip mit der bisher als Goldstandard anerkannten Mikroskopie. In diesem Vergleich hätte der ELISA eine Sensitivität von 68 % und der Test Strip von 80 %, ginge man davon aus, dass nur die in der Mikroskopie positiven Proben positiv waren.

Es zeigte sich, vergleicht man Test Strip und ELISA miteinander, dass der Test Strip mehr positive Ergebnisse ergab, als der ELISA. Der Unterschied zwischen diesen beiden Verfahren ist im  $\chi^2$ -Test mit  $P < 0,05$  statistisch signifikant (Pischke et al. 2002).

Kombiniert man die Ergebnisse des ELISA und des Test Strip und wertet alle die Proben als positiv, die in einem oder beiden Verfahren positiv waren, so waren alle Patienten mit einer mikroskopisch nachgewiesenen Mikrofilariendichte von mehr als 3 Mf/ mg positiv.

Alle Patienten mit mehr als 100 Mf/ mg waren sowohl im ELISA, als auch im Test Strip positiv.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der PCR-Testung der Skin Snips liefert Tabelle 8.

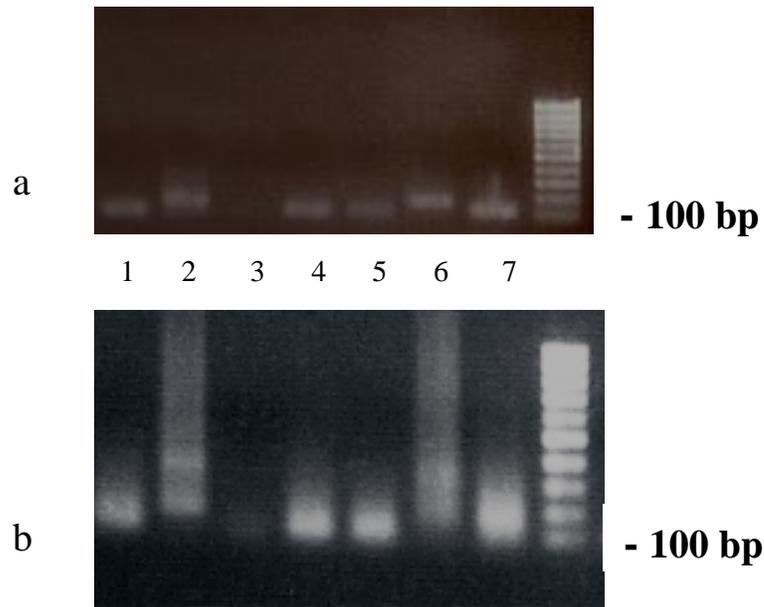
**Tabelle 8: PCR-Test mit den Skin Snips: ELISA verglichen mit Test Strips**

Mikrofilarien pro mg Haut	Anzahl der untersuchten Proben	Anzahl der durch die PCR-Methoden positiv getesteten Proben					
		ELISA		Test Strips		ELISA und Test Strips	
		Anzahl (%) <sup>1</sup>	$\bar{X} \pm SA$ <sup>2</sup>	Anzahl (%) <sup>1</sup>		Anzahl (%) <sup>1</sup>	
0	19 <sup>3</sup>	0 (-)	-	0 (-)		0 (-)	
0	39 <sup>4</sup>	10 (27)	2,0 ± 0,7	12 (31)		12 (31)	
0,1-3	37	20 (57)	1,4 ± 0,2	24 (56)		26 (70)	
3,1-100	22	17 (77)	3,2 ± 0,6	21 (95)		22 (100)	
>100	10	10 (100)	4,4 ± 1,6	10 (100)		10 (100)	

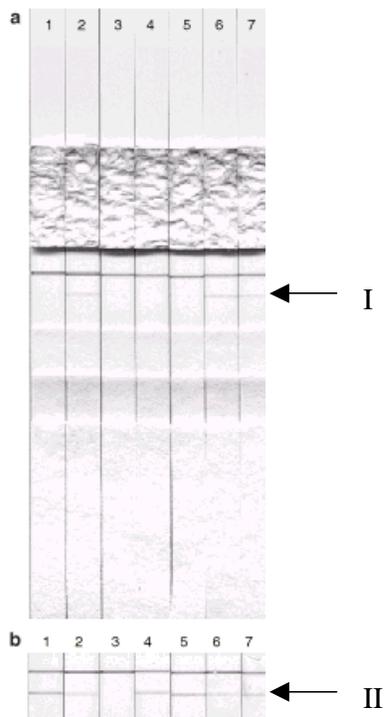
<sup>1</sup> Prozentwert bezogen auf die Anzahl der untersuchten Proben. <sup>2</sup>  $\bar{X}$  ist das arithmetische Mittel der *O. volvulus*-/ internen Kontroll-Quotienten der jeweiligen Gruppe, SA = Standardabweichung. <sup>3</sup> Biopsien von Personen aus einem *Mansonella*-Endemiegebiet, in welchem keine Onchozerkose bekannt ist. <sup>4</sup> Biopsien von mikroskopisch negativen Individuen aus einem Onchozerkose-Endemiegebiet.

Das dritte Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten, nämlich die Gelelektrophorese mit Etidiumbromidfärbung, ist schwierig zu interpretieren, da nur einige der positiven Proben auf dem Gel als positiv zu erkennen waren und die eindeutige Interpretation von Gelbanden manchmal nicht möglich ist.

Die folgenden Abbildungen 4 und 5 verdeutlichen den Nutzen der internen Kontroll-DNA zur Quantitätskontrolle der PCR. Diese interne Kontrolle wurde im PCR-Ansatz von Probe 3 nicht für einen Nachweis ausreichend amplifiziert, so ließ sich die Inhibition der PCR von Probe 3 detektieren. Eine schwache Bande lässt sich auf Abbildung 4b erahnen, dies kann jedoch auch auf herüber diffundierte DNA aus einer anderen Geltasche zurückzuführen sein.



**Abb. 4:** Gelelektrophorese zu PCR-Produkten angefertigt mit Hotstar- Polymerase (a) und DNAzymeII-Polymerase (b), 1 Negativkontrolle, 2 Positivkontrolle, 3 Probe mit zuviel Inhibitoren, 4 negative Probe aus nichtendemischem Gebiet, 5 negative Probe aus endemischem Gebiet, 6 Patient mit mikroskopisch 100 Mikrofilarien/ mg Haut, 7 Patient mit 0,2 Mikrofilarien/ mg Haut.



**Abb. 5:** DNA-Detection-Test Strip zu *O. volvulus*-PCR-Produkten

a: Nachweis des O-150-Repeat, Probenanordnung wie in Abb. 4, die Proben 2; 6 und 7 sind positiv.

b: Nachweis der internen Kontroll-DNA, Probe 3 enthält keine Kontroll-DNA (b3), folglich ist sie trotz negativem Ausfall der *O. volvulus*-Detektion (a3) nicht als negativ zu bewerten, sondern als missglückte Testung.

I: Nachweislinie für das O-150-Repeat mittels digoxigenerter O.v. S2-Sonde  
 II: Nachweislinie für die interne Kontroll-DNA mittels digoxigenerter O.v.I.K. Sonde (vgl. Tabelle 2)

Also enthielt Probe 3 nachweislich Inhibitoren, die eine Amplifikation eventuell vorhandener Target-DNA behindert haben könnten. Probe 3 und alle anderen Proben, die sich so verhielten, waren folglich nicht als negativ zu werten, sondern bedurften weiterer Aufbereitung durch Ethanol-fällung, Verdünnung oder mit einem kommerziellen Kit zur Extraktion (z.B. Qia Tissue mini Kit) und erneuter Testung. In der Praxis entdeckte ich so mehrere Proben, die zu viele Inhibitoren enthielten und daher nicht bewertbar waren. Diese wurden nach 1/10-Verdünnung in Wasser dann teilweise doch noch positiv. Die meisten blieben negativ, da sie von nicht infizierten Personen stammten.

Die quantitative Aussage, die sich Abbildung 4b entnehmen lässt, dass Probe 6 mehr Target-DNA als Probe 7 enthält, erscheint als Vorteil der DNAzymeII-Polymerase. Doch es lässt sich nicht klar erkennen, ob Probe 4 nicht vielleicht auch positiv sein könnte, was wiederum ein Nachteil ist. In Abbildung 4a, also bei HotStar-Verwendung, lässt sich hingegen nicht sicher sagen, dass Probe 7 positiv ist.

Die Test Strips (Abbildung 5) zeigen anhand der Nachweislinie I, die Proben 2, 6 und 7 als positiv an (Abbildung 5a). Doch auch hier erscheint Probe 3 negativ, da aufgrund der Inhibitoren keine DNA amplifiziert wurde. Verwendet man jedoch die I.K.-Dig-Sonde für die Test Strips (Abbildung 5b), so fällt Probe 3 sofort als falsch negativ auf, auch ohne Gelbetrachtung.

### **3.1.3. Nachweis in Hautbiopsien**

Eine Zielsetzung dieser Studie mit der internen Kontroll-DNA-Studie war es, einen Assay zu entwickeln, der nicht nur den Nachweis von *O. volvulus*-DNA für eine Diagnose oder Verlaufskontrolle ermöglicht, sondern auch die falsch negativen Testergebnisse durch zu hohe Inhibitorenkonzentration erkennbar macht. Diese Fragestellung wurde beantwortet.

Der entwickelte Assay ermöglichte dank der Erkennung der falsch negativen Proben deren Aufbereitung durch Ethanol-fällung oder Verdünnung. So wurden in der Praxis mehrere ursprünglich falsch negative Testergebnisse gefunden, die dann doch positiv wurden (s.o.).

Die zweite Zielsetzung der Studie mit der internen Kontroll-DNA war eine quantitative oder semiquantitative Einstufung der Filarienlast des Patienten mit dem PCR-Produkte-ELISA zu ermöglichen. Vergleicht man die ELISA-Quotienten von Patienten mit weniger als 3 Mf/ mg

Haut mit denen mit mehr als 3 Mf/ mg Haut, so sind die von den Patienten mit mikroskopisch nachgewiesener geringerer Mikrofilarienlast signifikant kleiner ( $P= 0,035$ ).

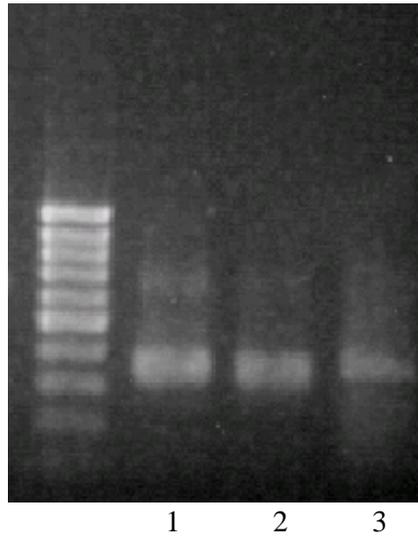
Des Weiteren konnte eine positive Korrelation ( $r_s = 0,4$ ,  $FG = 55$ ,  $P < 0,01$ ) zwischen Mikrofilariendichte und ELISA-Quotient errechnet werden (vgl. Tabelle 8, vgl. Pischke et al. 2002).

## **3.2. Nachweis von *B. timori***

### **3.2.1. Hha I-Repeat von *B. timori***

Nachdem es bereits gelungen war, mit den HhaI-Primern und der dazugehörigen Sonde DNA im Blut von Personen mit *B. timori* aus Mainang zu finden (Klüber et al. 2001), konnte von mir gezeigt werden, dass diese amplifizierte DNA wirklich das bereits bekannte HhaI-Repeat war und es sich nicht um eine Kreuzreaktion handelte.

Anhand der Gelelektrophorese, lassen sich die HhaI-Kopien von *B. timori*, *B. malayi* und *B. pahangi* nicht unterscheiden, was Abbildung 6 darstellt. Somit ließ sich nicht sicher sagen, ob die HhaI-Kopie der *B. timori*-Population der Insel Alor und die *B. malayi*-Kopie identisch sind, was für die *B. timori*-Population der Insel Flores bereits bewiesen war (Xie et al. 1994a). Signifikante Unterschiede zwischen *B. malayi* und *B. pahangi* hinsichtlich des HhaI waren bereits aufgezeigt worden (Xie et al. 1994a). Somit wäre es durchaus denkbar gewesen, dass auch der *B. timori*-Stamm auf Alor eine Variation des HhaI-Repeats aufweist.



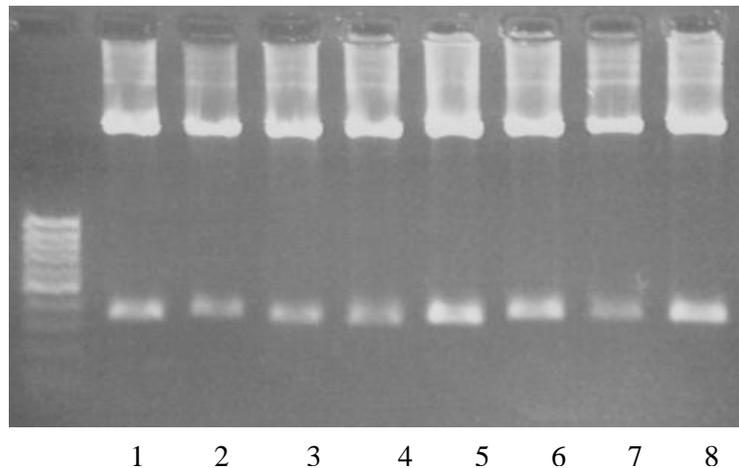
**Abb. 6: Gelelektrophorese von Versionen des HhaI verschiedener Spezies**

1 = *B. malayi*-Version des HhaI-Repeats, 2 = *B. timori*-Version, 3 = *B. pahangi*-Version.

Eine Unterscheidung der 3 Spezies mittels Gelelektrophorese ist nicht möglich.

In Abbildung 6 sieht die *B. pahangi*-Bande zwar etwas schwächer und schmäler aus, dies ist jedoch noch im Rahmen von Variationen, wie sie auch bei den Gelbanden einer Spezies beobachtet werden können.

Durch Sequenzierungen (Abbildung 8) gelang es, zu beweisen, dass das *B. timori*-HhaI-Repeat von Alor identisch mit dem von *B. malayi* ist, abgesehen von interindividuellen Unterschieden, die gefunden wurden. Durch Mikroskopieren und Abpipettieren einzelner Mikrofilarien gelang es, zu belegen, dass es auch innerhalb eines *B. timori*-Genoms intraindividuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Versionen des HhaI-Repeats gibt. Solche intraindividuellen Polymorphismen der HhaI-Sequenz waren für *B. malayi* bereits nachgewiesen worden (Williams et al. 1988).



**Abb. 7: Gelelektrophorese zu PCR- Produkten verschieden langer Versionen des HhaI-Repeats von *B. timori*-Mikrofilarien**

(DNA aus Minipreps gewonnen), die Sequenzierung ergab folgende bp-Längen:

1= 311bp, 2= 323bp, 3= 302, 4= 305, 5= 311, 6= 323, 7= 323 8= 311)

Abbildung 7 und 8 zeigen, dass es 3 HhaI-Subtypen gibt, die sowohl bei *B. timori* als auch bei *B. malayi* vorkommen: ein ungefähr 320 bp langer Typ (Bt 2, Bt 5, Bm 1, Bp); ein ungefähr 310 Bp langer Typ mit einer Deletion bei 87 bp (Bt 1 und Bt 4) und ein ungefähr 300 bp langer Typ mit einer 2. Deletion 8 bp nach der ersten (Bt 3 und Bm 2). Es konnte spontan kein *B. malayi*-Korrelat für die 310 Bp lange Kopie gefunden werden, dies ist jedoch nicht überraschend, da dieser Polymorphismus der seltenste ist und ich nicht explizit weiter nach so einer *B. malayi*-Version gesucht habe. Weitere Sequenzen und Alignments sind im Anhang dargestellt (Abb. A1).

```

Bt2      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bt5      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bt1      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bt4      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bm1      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bt3      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bm2      1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT
Bp       1  GCGCATAAAATTCATCAGCAAAAATTAATAAACTTTCAATTAATCATGATTTTAAATTC AAT

Bt2      61  TTAAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTAATTAAAAATTTTAA
Bt5      61  TTAAGAACTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTAATTAAAAATTTTAA
Bt1      61  TTAAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTAATTAAAAATTTTAA
Bt4      61  TTAAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTTAAAAAATTTTAA
Bm1      61  GTAAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTTAAAAAATTTTAA
Bt3      61  TTAAGAACTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTTAAAAAATTTTAA
Bm2      61  TTTAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTTAAAAAATTTTAA
Bp       61  TTAAGAATTTAAATTAATTTAAATTTCAAATTTAACTTTTGAATTTTAAAAAATTTTAA

Bt2      121  AATTTGTTCTAGTTTTCTTACATTAGACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTCTAAT
Bt5      121  AATTTGTTCTAGTTTTCTTACATTAGACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTCTAAT
Bt1      109  AATTTGTTCTAGTTTTCTTACATTAGACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTCTAAT
Bt4      109  AATTTGTTATAGCTTTCTTTCATTGACACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTTAAAT
Bm1      121  AATTTGTTATAGTTTTCTTTCATTGACACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTTAAAT
Bt3      100  AATTTGTTATAGTTTTCTTACATTGACACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTTAACT
Bm2      100  AATTTGTTATAGTTTTCTTACATTAGACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTCTAAT
Bp       121  AATTTGTTATAGTTTTCTTACATTGACACAAGGAAATGGTTCTAATTTATCAATTTTAAAT

Bt2      181  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bt5      181  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bt1      169  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bt4      169  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bm1      181  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bt3      160  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bm2      160  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA
Bp       181  TTTAATTAAGTGCCAAAAC TACTAAAAAAGCTTATTTTGAATTAATTGACTATGTTA

Bt2      240  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bt5      240  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bt1      228  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bt4      228  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bm1      240  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bt3      219  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bm2      219  CGTGAATTGTACCAGTGCTGGCGTATATTGCGTATGTTTATAGTTTAAATATTTAAA
Bp       241  TATGCATTGCAC TGGGGCGGGTATATATGGT-TGGTCATTTTATAGTTTAAATATTTAAA

Bt2      300  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 323 Bp
Bt5      300  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 323 Bp
Bt1      288  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 311 Bp
Bt4      288  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 311 Bp
Bm1      300  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 323 Bp
Bt3      278  ATACGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 301 Bp
Bm2      279  ATATGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 303 Bp
Bp       300  ATATGCTTTTGTAAATTAAGTTTT <- 323 Bp

```

**Abb. 8:** Alignment exemplarischer HhaI-Versionen

Bt 1-5 zeigen HhaI-Sequenzen, die aus *B. timori*-Proben von Alor gewonnen wurden, wobei Bt 1-3 aus einer Probe stammen und Bt 4-5 aus einer anderen. Bm 1-2 zeigen Sequenzen, die

aus *B. malayi*-Proben aus Sulawesi gewonnen wurden und Bp zeigt vergleichend die aus *B. pahangi* gewonnene Version, die bereits bekannt war (Xie et al. 1994a).

### 3.2.2. Molekulare Marker für *B. timori*

Um eine molekularbiologische Unterscheidung zwischen *B. timori* und *B. malayi* zu ermöglichen, wurden DNA-Sequenzen gesucht, die verschiedene Genom-Variationen enthielten.

Eine Sequenz, die diese Voraussetzung erfüllt, fand ich in der jeweiligen *B. malayi*/*B. timori*-Kopie der Cytochromoxidase-2 (*cox-2*) (Genebank-Nummer AF499133). Die *cox-2* entstammt aus dem mitochondrialen Genom der Parasiten. Dieses Enzym wird bei *B. timori* durch eine leicht modifizierte Version des entsprechenden *B. malayi*-DNA-Abschnittes kodiert. Anhand des Alignments der *B. timori*- und *B. malayi*-Versionen und mit Hilfe der WebCutter Version 2 Software (<http://firstmarket.com/cutter/cut2.html>) gelang es, eine DNA-Position ausfindig zu machen, die sich bei *B. malayi* aber nicht bei *B. timori* als Schnittstelle für das Restriktionsenzym HpaI eignet. Mittels einer Restriktion mit HpaI ließen sich also *B. timori*-*cox-2*-PCR-Produkte von *B. malayi*-*cox-2*-PCR-Produkten unterscheiden. Somit ließen sich auch die beiden Parasiten molekularbiologisch unterscheiden.



**Abb. 9:** Gelelektrophorese von *Brugia-cox-2*-PCR-Produkten vor und nach HpaI-Verdau

1= 100 bp-Marker, 2= Negativkontrolle, 3-5= unverdaute PCR-Produkte, 6-8= 2 h mit 5 U HpaI verdaute PCR-Produkte; 3= *B. malayi* aus Zentralsulawesi, 4= *B. malayi* aus Südsulawesi, 5= *B. timori* aus Mainang, 6= wie Bande 3 aber verdaut, 7= wie Bande 4 aber verdaut, 8= wie Bande 5 aber verdaut

Abbildung 9 verdeutlicht, dass mittels HpaI-Verdau, wie in den Banden 6-8 dargestellt, eine deutliche Unterscheidung von *B. malayi* (Bande 6 und 7) und *B. timori* (Bande 8) anhand ihrer *cox-2*-Sequenz möglich ist. Im unverdauten Zustand (Banden 3-5) lassen sich die *B. malayi*- bzw. *B. timori*-Versionen anhand der Gelelektrophorese nicht unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch andere DNA-Sequenz-Abschnitte von *B. malayi* und *B. timori* sequenziert und verglichen (5s rDNA spacer, ITS-2, *Wolbachia* 16s rDNA, *Wolbachia* FTSZ, vgl. Tabelle 1), um festzustellen, ob sie sich zur Unterscheidung der beiden Parasiten eignen. Hierbei zeigte sich, dass die ribosomale 5S-Sequenz der beiden identisch ist (Genebank-Nummern AF499130 und AF499131). Die ribosomale ITS-2-Sequenz (Genebank-Nummern AF499132) zeigte hingegen bei beiden geringfügige Unterschiede, die jedoch so gering sind, dass sie sich nicht für eine zuverlässige Unterscheidung der beiden Spezies eignen.

Was die beiden untersuchten DNA-Abschnitte der den Filarien innewohnenden Wolbachien-Bakterien angeht, nämlich die 16SrDNA und FTSZ, so zeigte sich, dass auch *B. timori* genau wie *B. malayi* Wolbachien enthält, was bisher noch nicht untersucht worden war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Wolbachien von *B. malayi* und *B. timori* genetisch unterscheiden (Genebank-Nummer AF499135 und AF499135, Fischer et al. 2002).

### **3.2.3. Nachweis von *B. timori* im Tagblut**

Um zu überprüfen, ob die drei Konservierungs- und Extraktionsmethoden für Guanidin, EDTA und Urea prinzipiell geeignet sind, versetzte ich als Vorversuch mein eigenes garantiert filarienfreies Blut (kein Tropenaufenthalt, keine Bluttransfusion) mit geringen Mengen an Filarien. Ich fügte pro 200 µl Blut mehreren Probenansätzen je 30 Mikrofilarien oder 3 Mikrofilarien oder jeweils die extrahierte DNA aus 120 Mikrofilarien hinzu. Es wurden verschiedene Variationen des Extraktionsprotokolls getestet.

Tabelle 9 zeigt die Resultate der Extraktionsmethoden. Die Etablierung der Probestellung erfolgte in Rahmen von Vorversuchen mit Eigenblut, um das begrenzt verfügbare Probenmaterial aus der Feldforschung erst im etablierten Nachweissystem einzusetzen.

**Tabelle 9: Vorversuche zur Etablierung der drei Extraktions- und Konservierungsmethoden**

Konservierungs- Methode	Hinzugefügte Mikrofilarien pro 200 µl Blut	Anzahl der getesteten Proben	Anzahl der Positiven
Urea	30 Mf	6	6
Guanidin	30 Mf	4	4
EDTA	30 Mf	6	6
Urea	3 Mf	6	3
Guanidin	3 Mf	4	3
EDTA	3 Mf	6	2
Urea	freie DNA aus 120 Mf	6	4
Guanidin	freie DNA aus 120 Mf	4	4
EDTA	freie DNA aus 120 Mf	6	3

Nachdem sich so gezeigt hatte, dass alle drei Extraktions- und Konservierungsmethoden angewendet werden können, sollte die Untersuchung an Patientenproben aus Mainang zeigen, wie gut diese drei Verfahren verglichen mit dem Goldstandard Nachtblutfiltration und der vor Ort durchgeführten Tagblutfiltration abschneiden. Tabelle 10 zeigt, dass jede der drei Methoden deutlich weniger sensitiv ist, als die Nachtblutfiltration und auch die Tagblutfiltration erscheint den Konservierungs- und Extraktionsmethoden nicht unterlegen zu sein.

**Tabelle 10: Verschiedene Extraktionsmethoden verglichen mit der Mikroskopie**

Mikrofilarien- Last (Mf) im Nachtblut	Probenanzahl	Positiv in der Urea- Methode	Positiv in der Guanidin- Methode	Positiv in der EDTA- Methode	Positiv in der Tagblut- Filtration
0 Mf	4	0	0	0	0
1-10 Mf	4	1	1	2	0
11-100 Mf	15	3	3	4	4
101-1000 Mf	11	2	1	1	3
> 1000 Mf	6	4	1	2	4
1->1000 Mf	36	10	6	9	11

Es wurden jedoch von jeder Person 1 ml Tagblut filtriert, aber nur 200 µl Blut für die jeweilige Konservierungs- und Extraktionsmethode verwendet. Zieht man nun die Ergebnisse der drei Extraktionsmethoden zusammen, d. h. wertet man all diejenigen als positiv, die in einer oder mehr der drei PCR-Testungen positiv waren, so erhält man ein ganz anderes Ergebnis, welches Tabelle 11 darstellt.

**Tabelle 11: Übersicht über die positiven Resultate mit allen 3 Konservierungs- und Extraktionsmethoden**

Methode	Mikrofilariendichte/ ml Nachtblut	Anzahl der untersuchten Proben	Tagblut: Anzahl der positiv getesteten:	
			PCR	Filtration
Alle drei Methoden zusammen	1->1000	36	18 (50 %)	11 (31 %)

Jetzt zeigt die PCR-basierende Tagblut-Diagnostik 50 % der in der Nachtblutfiltration positiven Personen als positiv an und die Tagblut-Filtrationsmethode verglichen hiermit 31 % der in der Nachtblutfiltration positiven Personen.

Der Versuch, die Sensitivität des PCR-Assays zu steigern, indem die extrahierten Proben in einer „nested PCR“ amplifiziert wurden, scheiterte. Bei diesem speziellem PCR-Verfahren, welches für *B. malayi* bereits etabliert worden war (Cox-Singh et al. 2000), kann man die Menge des Amplifikats und damit die Sensitivität der Untersuchung steigern, indem man erst eine PCR macht, dann in einer zweiten PCR mit speziellen Primern das Amplifikat erneut amplifiziert. Diese Methode ist nicht praktikabel wegen der großen Kontaminationsgefahr, die zu nicht verlässlichen Ergebnissen führt.

### **3.2.4. Nachweis von *B. timori* im Sputum**

Nachdem für *W. bancrofti* bereits ein PCR-Assay zur Diagnose mittels Sputumprobe existierte (Abbasi et al. 1996, 1999), versuchte ich, eine solche Nachweismethode für *B. timori* zu entwickeln.

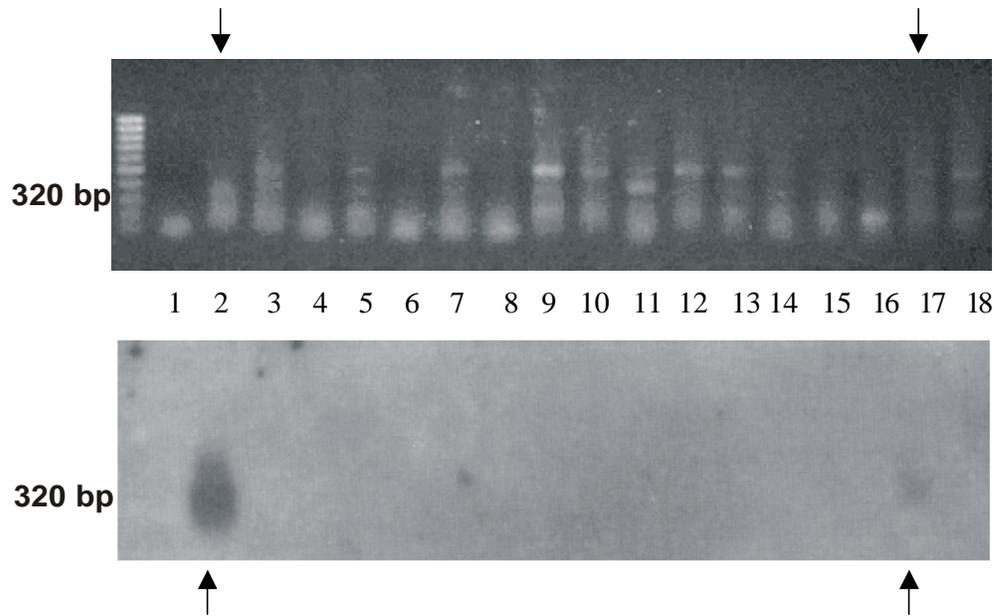
Es zeigte sich, dass die Extraktionsmethode von Abbasi und Mitarbeitern für diese Zwecke nicht verwendbar war. Von mehr als 50 Patienten mit *B. timori*-Mikrofilarien im Blut, ließ sich mit dieser Methode bei keinem Patienten *B. timori*-DNA im Sputum nachweisen.

Ein Nachweis von *Brugia*-HhaI-DNA ist jedoch prinzipiell möglich. Durch Verwendung des Qia Tissue Mini Kit konnte ich erstmals bei vier Patienten *Brugia*-DNA im Sputum nachweisen. Diese Patienten hatten alle extrem hohe Mikrofilariendichten im Blut (über 1000 Mf/ ml). Tabelle 12 zeigt anschaulich, dass nur bei Patienten mit ausgeprägter Mikrofilariämie ein Nachweis von *B. timori*-DNA möglich ist.

**Tabelle 12: Nachweis von *B. timori*-DNA im Sputum**

Mikrofilariendichte im Nachtblut, Mf/ ml	Nachweis von <i>Brugia</i> -DNA im Sputum	
	Positiv	Negativ
0	0	32
1-100	0	21
100-1000	0	21
>1000	4	18

Ein Phänomen, das im Rahmen der Sputum-Diagnostik auftrat, waren Kreuzreaktionen der HhaI-Primer mit DNA-Sequenzen, die nicht zum Genom von *Brugia* gehören. Es kam im Verlauf meiner Versuche bei Verwendung der DNAzymeII-Polymerase zur fehlerhaften, unspezifischen Anlagerung der Primer und anschließender Amplifikation von DNA-Sequenzen, die sich als verschieden lange Banden in der Gelelektrophorese zeigten. Dieses Phänomen trat nicht bei Verwendung von extrahierten Blutproben auf. Das spricht dafür, dass ein im Sputum und folglich, wenn auch in geringerer Konzentration, ebenfalls im Sputumextraktionsprodukt enthaltener Stoff die PCR-Reaktionsbedingungen zugunsten von unspezifischen Kreuzreaktionen verschiebt. Ob es sich bei dieser Störquelle um ein spezielles Enzym handelt, eine besondere Ionenkonzentration oder etwas anderes, ist nebensächlich, da sich solche unerwünschten, unspezifischen Amplifikationen durch Verwendung von Hotstar-Polymerase vermeiden ließen. Deswegen wurde für die restlichen Sputum-Experimente nur noch die Hotstar-Polymerase verwendet.



**Abb. 10:** Falsch positive Kreuzreaktionen mit dem Southern Blot nachgewiesen. Oben: Gelelektrophorese; unten Southern Blot. 1= Negativkontrolle, 2= Positivkontrolle, 3-18= Sputumproben.

Der gezeigte Southern Blot (Abbildung 10 unten) zeigt die Kreuzreaktionen als falsch positive Amplifikate an. Man sieht anhand des Southern Blot: nur die Positivkontrolle und Probe 17 (schwach) enthalten wirklich das HhaI-Repeat und somit *B. timori*. Die Banden 3, 5, 7, 9-13 und 18 beruhen auf unspezifischen Primeranlagerungen während der Amplifikation.

Eine Gelbetrachtung alleine (Abbildung 10 oben) wäre hier irreführend. Sie würde die falsch Positiven nicht als solche erkennen lassen. Andere Möglichkeiten, solche unerwünschten Amplifikate zu identifizieren, sind der ELISA und die Test Strips. Um herauszufinden, welche DNA-Sequenzen diese Kreuzreaktionen verursachen, wurden einige dieser PCR-Produkte sequenziert. So ließen sich anhand der gefundenen Sequenzen insgesamt fünf mögliche kreuzreagierende DNA-Sequenzen aus der Genebank identifizieren, die Tabelle 13 darstellt.

**Tabelle 13: Mit den HhaI-Primern kreuzreagierende Sequenzen**

---

- 1) Mensch, Chromosom 8q23 ( vgl. NCBI-Signatur gi15216352/dbj/AP003787.2, Identities 623/643)
  - 2) Mensch, HLA-B (gi/11125670/emb/AJ300181.1)
  - 3) Mensch, Chromosom 7 (gi/9052126/gb/AC009541.16)
  - 4) Menschliche DNA, nicht näher bestimmt (gi/16303417/gbAC091903.2)
  - 5) *Mycobacterium ulcerans* AluI, Ähnlichkeit vorhanden, jedoch keine Übereinstimmung, also u. U. eine Variante (gi/1293538/gb/U38540.1)
- 

Damit kommt hauptsächlich menschliche DNA als Kreuzreaktant in Frage, aber auch mykobakterielle DNA. Die beiden interessantesten potentiellen Kreuzreaktionsteilnehmer sind sicherlich die humane und die mykobakterielle Version des Alu-Repeats, welche in verschiedenen Versionen bei den Sequenzierungen gefunden wurden.

Dass zwischen humanem Alu- und filariellem HhaI-Repeat eine hohe Homologie bezüglich der Primer besteht, war bereits bekannt (Xie et al. 1994a). Dass diese Ähnlichkeit auch für die mykobakterielle Version gilt, ist zwar eine neue Erkenntnis in diesem Zusammenhang. Das hätte man sich jedoch auch theoretisch überlegen können. Gänzlich neu und in der Literatur bisher nicht beschrieben ist, dass es in diesem Ausmaß zu Kreuzreaktionen zwischen diesen HhaI-ähnlichen Sequenzen und den HhaI-Primern kommen kann.

Es schließt sich die Frage an, ob es einen phylogenetischen Zusammenhang zwischen Alu- und HhaI-Repeat gibt. Dies ist für den medizinischen Bereich sicherlich weniger relevant, soll aber aus evolutionsbiologischer Sicht doch kurz angesprochen werden.

Um einen solchen Zusammenhang aufzuzeigen, wurde die bekannte, komplett durchsequenzierte mykobakterielle Alu-Sequenz aus der NCBI-Datenbank via Alignment mit dem HhaI-Repeat verglichen (Abbildung 11). Entsprechendes war bereits für die humane Version gemacht worden (Xie et al. 1994a).

```

Myc1 901 GAGCACCCCGCCCTACT---GCC-A
B.t. 1 GCGCAAAACTTAATTACAAAAGCGTA

Myc1 957 TCATGACCTGGATGCGTCAACACTGCGGAATCGAGA-ACAGCCTGCACCTGG-ATACGCGA
B.t. 27 TTTTAATATTTAAAC-TATAAAATGACGACGCAATATACGCCAGCACTGGTACAATTCA

Myc1 1015 CGTCACCT--TCGACGAAGACCGTCACAGGCTACATACTGGAAACGGCGCACAGGTCCTA
B.t. 86 CGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCTTTTTTTTGTACTTTTGGCACT--TAAAT

Myc1 1073 GCAACGCGAC--GCAACACTGCGATCAATCTGCAGCCCTCAACGGCGCCGACAACATCC
B.t. 144 AAAATTAGAATTGATAAAATTAGAACCAATTTCTTTGTCT-AATGTAA-GAAAACACAA

Myc1 1131 CGAAGCCTGCCGGATCACCGCTT-TGACCGCCAACCGCCCTAGACCTCCTCAACCCAC
B.t. 201 CAAAT--TTT--AAA-ATTTTATAAATTCAAACCTTAATTTGAATT--TAAATTTA-

Myc1 1190 AATTCCCAGCTCCGACGTTGT-TGATTAGCAGGCTTGAGCTGGGTTGATGATCTTTG
B.t. 253 -ATTT--AAATCTTAAATTGAATTAATAATCATGATTAATTGAAAGTTTTATTAATTTG

Myc1 1249 GTGCCGCCCTATTGGGG
B.t. 310 CTGATGAATTATGCGC

```

**Abb. 11: Vergleich des *Mycobacterium ulcerans* (Myc1) Alu-Repeats (Genebank-Nummer: gi|219083|gb|AF003002.1| AF003002 *M. ulcerans* IS2404-like element putative transposase, complete cds) mit dem *B. timori* (B. t.) HhaI-Repeat**

Man sieht, dass abgesehen von den Ähnlichkeiten der Primerbindungsstellen am Anfang und Ende der Sequenz weitere Homologien bestehen.

Um zu prüfen, ob sich auch DNA anderer Parasiten außer der von *B. timori* in den Sputumproben finden ließ, machte ich exemplarisch mit 19 willkürlich ausgewählten Proben, aus der Gruppe der Proben, bei denen Kreuzreaktionen beobachtet worden waren, eine PCR mit *Ascaris lumbricoides*-Primern. Ich fand eine positive Probe. Dies verdeutlicht, dass man die am Beispiel HhaI gewonnenen Erkenntnisse für Sputum-PCR-Testungen auch auf *Ascaris*-PCR-Assays übertragen kann.

Ich wählte deshalb Proben aus dieser Gruppe, da die Kreuzreaktivität dieser Proben belegte, dass in ihnen DNA enthalten war. Das ist nicht unbedingt selbstverständlich, da es sicherlich auch Probanden gab, die nicht richtig abhusten konnten und so nur weitestgehend DNA-freie Speichelproben anstelle von Sputum abgegeben haben. *A. lumbricoides* ist der Erreger einer humanen Helminthose mit weltweit mehr als 1 Milliarde Infizierten (Khuro et al. 1985; Bode et al. 2000). Da *Ascaris*-Larven sich vorübergehend in der Lunge aufhalten und die Infektion in Asien weitverbreitet ist, lag dieses Experiment nahe.

### 3.2.5. Nachweis von *B. timori* in Überträgermücken

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse für die Testung der Moskito-Pools. Mittels des anerkannten Pool-Screen-Programms (Katholi et al. 1995) lässt sich für meine *A. barbirostris*-Pools eine wahrscheinliche Infektionsrate der Moskitos von 8,8 % angeben und eine Mindestinfektionsrate von 6,1 %. Andere *Anopheles*-Spezies, wie *A. maculatus*, *A. subpictus* und *A. sundaicus*, waren nur vereinzelt gefangen worden, sodass sie im Rahmen dieser Untersuchung nicht berücksichtigt wurden. Des weiteren wurden 624 *Culex*-Moskitos von Dr. Fischer auf 33 Pools verteilt und von mir, nicht wissend welche Pools *Culex* oder *Anopheles* enthielten, als negative Kontrollen bei den Extraktionen und der anschließenden PCR-Testung mitgeführt. Diese blinde Untersuchung der Proben war notwendig, um die Glaubwürdigkeit der Studie zu gewährleisten. Da die Moskitos immer komplett extrahiert wurden, blieb also kein Restmaterial für eventuelle Nachtestungen im Falle falsch positiver Ergebnisse übrig. Das erklärt die Ansprüche, die wir an diese Studie stellten. Alle so getesteten *Culex*-Pools waren negativ, was den Erwartungen entspricht, gilt *Culex* doch als Vektor für *Wuchereria* und nicht für *Brugia*.

**Tabelle 14: PCR-Testung von Moskito-Pools aus Mainang auf Alor**

	Anzahl		Mittlere Anzahl der	PCR-Ergebnisse
	Mosquitos	Pools	Mücken pro Pool (Standardabweichung)	positiven Pools
<i>Anopheles barbirostris</i>	642	61	10,5 (2,1)	39 (64%)
<i>Culex</i>	624	33	18,9 (3,5)	0

Im Rahmen von Vorexperimenten an in dem für *Brugia* endemischen Dorf Mainang gefangenen *Culex* war zu beobachten, dass einige dieser früheren *Culex*-Pools positiv für das HhAI waren. Ob es sich hierbei darum handelte, dass die infizierten Moskitos sich bei ihrem Fänger, der sich selbst als Köder anbot, durch eine Blutmahlzeit vorübergehend infizierten oder ob sie wirklich als Überträger fungieren konnten und infektiöse Larven in ihren Köpfen

hatten, zeigte ein klärendes Experiment: 120 *Culex* dieses Fanges wurden unter dem Mikroskop die Köpfe abgetrennt. Dann wurden je 20 *Culex*-Körper gepoolt, fünf Pools waren positiv und einer negativ. Bei den Köpfen waren alle sechs Pools, a 20 Mosquito-Köpfe, negativ (Tabelle 15).

**Tabelle 15: HhaI-PCR-Untersuchung von Köpfen und Körpern von *Culex***

	Positiv	Negativ
<b><u>Köpfe (Pools a 20 Stück)</u></b>	0	6
<b><u>Körper (Pools a 20 Stück)</u></b>	5	1

Tabelle 15 zeigt, dass sich in keinem von 120 *Culex*-Köpfen aber in mindestens fünf der dazugehörigen Körper *B. timori*-DNA nachweisen ließ.

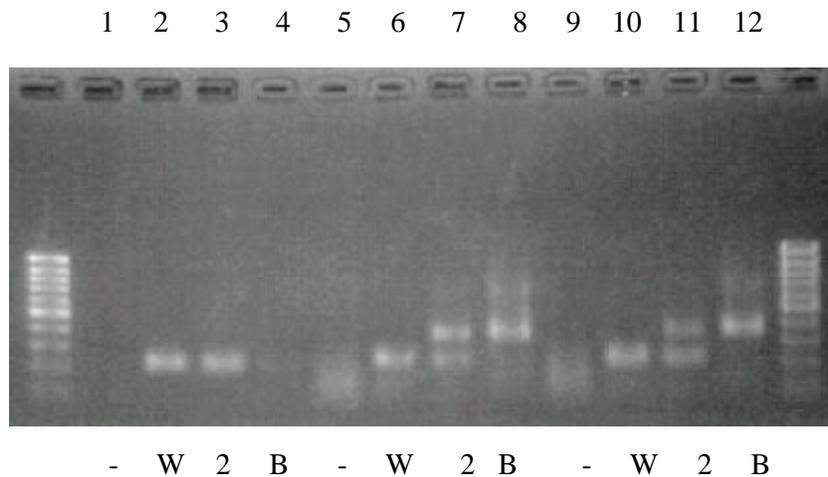
Somit war bewiesen, dass die positiven Resultate lediglich auf Mikrofilarien enthaltende Blutreste im Magen-Darm-Trakt der *Culex* zurückzuführen waren und nicht auf eine übertragungsfähige Infektion der Mücken mit L3 im Kopf. Dass von den sechs Pools mit jeweils 20 *Culex*-Körpern ohne Kopf fünf positiv waren, spricht dafür, dass wahrscheinlich der Fänger eine Parasitämie hatte, als die Moskitos an ihm saugten.

Die *Anopheles*-Moskito-Pools wurden auch mittels PCR auf eine *P. falciparum*- oder *Wuchereria*-Infektion getestet (vgl. 3.2.6. und 3.2.7.). Keine Probe war für *W. bancrofti* positiv, aber zwei *Anopheles*-Pools enthielten *P. falciparum*-DNA. Dies ist nicht überraschend, da die Moskitos ebenso wie die menschlichen Proben aus dem Dorf Mainang stammten, welches, wie bereits erwähnt, fernab der *Wuchereria*-endemischen Küstenregion lag, in welchem es aber gehäuft Fälle von *Malaria tropica* gab (Supali et al. 2002).

### **3.2.6. Simultaner Nachweis von *B. timori* und *W. bancrofti***

Um eine einfache und schnelle Testung von Patienten- bzw. Mückenproben auf *Brugia*- und *Wuchereria*-Infektion zu ermöglichen, entwickelte ich einen Multiplex-PCR-Assay. Eine Multiplex-PCR ist eine spezielle PCR, bei der mittels mehrerer Primerpaare (in diesem Fall

zwei) mehrere verschiedene Target-Sequenzen simultan amplifiziert werden. Durch Austestung anhand artifizierlicher Proben, weil leider kein natürlicherweise mit beiden Erregern infiziertes Material zur Verfügung stand, ließ sich die empfehlenswerte Multiplex-PCR-Mix-Konzentration ermitteln. Hierbei ist zu bedenken, dass das *Wuchereria*-Repeat etwa 400 mal pro Zelle vorkommt, während das *Brugia*-Repeat etwa in 60.000 Kopien vorliegt. Außerdem haben beide DNA-Targets verschiedene Längen, räumliche Strukturen und damit auch verschiedene Affinitäten zu ihren jeweiligen Primern. Folglich war zu erwarten, dass es für einen effizienten Nachweis von *Brugia* und *Wuchereria* mittels einer einzigen PCR der Austestung verschiedener Primerverhältnisse und PCR-Reaktionsbedingungen bedurfte.



**Abb. 12: Gelelektrophorese von *Wuchereria-Brugia*-Multiplex-PCR-Produkten**

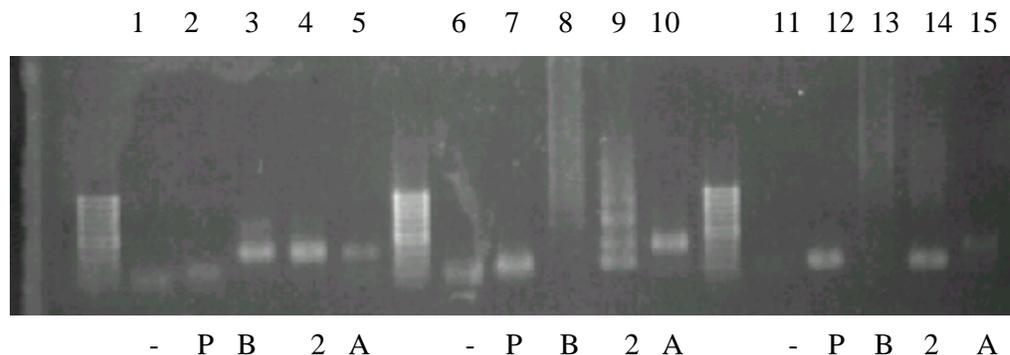
Die Produkte der Banden 1-4 entstanden mittels einer reinen *W. bancrofti*-PCR, die der Banden 5-8 mittels einer *W. bancrofti*- zu *B. timori*-Primer-Konzentration von 1:1 und die der Banden 9-12 mittels einer Konzentration von 2:1 des Multiplex-Gemisches. - = Negativ-Kontrolle, W = nur *Wuchereria*-DNA, 2 = beides, *W. bancrofti*- und *B. timori*-DNA, B = nur *B. timori*-DNA.

Somit ergab sich als ideale Primer-Konstellation, wie Abbildung 12 zeigt, ein Verhältnis von *W. bancrofti*-Primern zu *B. timori*-Primern von 1:1 bis 2:1. Es konnte gezeigt werden, dass es keine Kreuzreaktionen zwischen *W. bancrofti*-Primern und *B. timori*-DNA gibt und vice versa. Die Primer-Dimer-Bildung, die bei den Negativproben der Multiplexansätze auffällt, ist anhand der unscharfen Bande als Artefakt deutlich erkennbar und nicht als falsch positiv einzustufen.

### 3.2.7. Simultaner Nachweis von *B. timori* und *P. falciparum*

Um eine entsprechende Multiplex-PCR für *B. timori* und *P. falciparum*, den Erreger der Malaria tropica, zu entwickeln und auszutesten, verfuhr ich ähnlich wie bei der *W. bancrofti*/*B. timori*-Multiplex-PCR. Diesmal stand mir jedoch für das Pilotprojekt authentisches Probenmaterial in Form von Patienten- und Moskitoproben zur Verfügung. Ich konnte *P. falciparum*-Infektionen bei zwei *Anopheles*-Pools und bei acht, von insgesamt 40 Urea-Blut-Proben nachweisen. Diese Stichprobe würde für Mainang eine Infektionsrate mit Malaria von 20 % ergeben. Das stimmte mit dem vor Ort mikroskopisch ermittelten Wert einer Malariaendemizität von 17 % (Supali et al. 2002 unveröffentlichte Daten) überein, wobei zu bedenken ist, dass es nur eine sehr kleine Stichprobe war. Leider lagen für die individuellen Patienten keine mikroskopischen Daten zum Malariabefall vor, sodass ein Vergleich damit nicht stattfinden konnte. Somit zeigte sich im Folgenden lediglich die Anwendbarkeit der *P. falciparum*/*B. timori*-Multiplex-PCR, aber es ergaben sich keine konkreten Daten zur Sensitivität.

Das Problem beim Entwickeln dieser Multiplex-PCR bestand darin, dass die richtige Primer-Konstellation schwer zu finden war.



**Abb. 13:** Gelelektrophorese von *P. falciparum*- *B. timori*-Multiplex-PCR-Produkten

-=Negativkontrolle, P= *P. falciparum*-DNA, B= *B. timori*-DNA, 2=*B. timori*- und *P. falciparum*-DNA, A= Probe aus *Anopheles*-Mücke, die sowohl für *B. timori* als auch für *P. falciparum* positiv war. Banden 1-5: Primerkonzentration *P. falciparum*-Primer/ *B. timori*-Primer= 2/1, Banden 6-10=4/1, Banden 11-15= 8/1

Man sieht in Abbildung 13, dass bei einem Primer-Verhältnis von *P. falciparum*-Primer/ *B. timori*-Primer von 2/1 (Banden 1-5) die *Anopheles*-Probe positiv für das 208 bp-lange *P. falciparum*-Fragment und das circa 320 bp-lange *B. timori*-Fragment ist, die „Probe 2“ ,welche die artifiziell hinzugefügten beiden DNA-Fragmente enthält, jedoch nur klar erkennbar für *B. timori* positiv ist. Diese Konzentration ist somit nur bedingt geeignet für *P. falciparum*-DNA, wenn ebenfalls *B. timori*-DNA enthalten ist. Nimmt man hingegen eine Konzentration von 4/1 (Banden 6-10), so ist der schwach positive *P. falciparum*-Befund der *Anopheles*-Probe erkennbar und bei der DNA beider Parasiten enthaltenden „2-Probe“ ist nun das 208 bp-Stück sichtbar. Bei dieser Konzentration kommt es jedoch auch zur Amplifikation unerwünschter, unspezifischer Produkte, was man an der unscharfen Bande der *B. timori*-Probe und den verwischten Banden der „2-Probe“ sieht. Die Primer-Konzentration 8/1 hat als Nachteil unspezifische Verwischung der Bande bei nur *B. timori* enthaltenen Proben, sichtbar bei der *B. timori*-Probe „B“. Bei der „A-Probe“, die, wie erwähnt, beide Parasiten enthält, sind auch beide Banden schwach erkennbar. Bei der artifiziellen „2-Probe“ verschwindet das positive *B. timori*-Ergebnis ebenfalls in einer unscharfen Bandendarstellung.

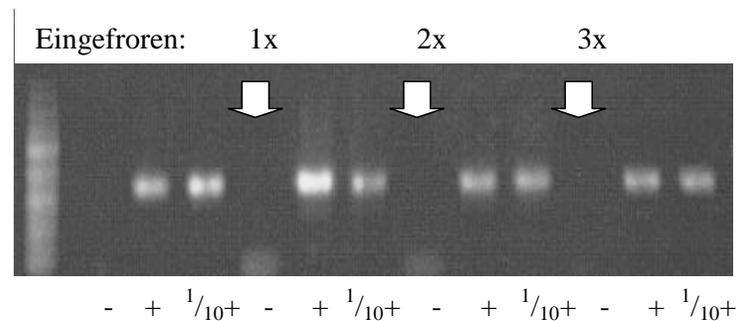
Als Fazit ist somit entweder eine Konzentration von 2/1 empfehlenswert, wobei eine eingeschränkte Sensitivität für *P. falciparum* in doppelt infiziertem Material akzeptiert werden muss oder man nimmt eine Konzentration von 4/1, muss sich dann aber mit dem ungewohnten Bild unscharfer, verwischter Banden auseinandersetzen. Solche verwischten Bandenergebnisse als *B. timori*-positiv zu erkennen, bedarf etwas Übung.

### **3.2.8. Gefrorener PCR-Mix („Frozen Mix“)**

Die HotStar-Polymerase benötigt im Gegensatz zu anderen Polymerasen eine längere Aktivierungszeit zum Beginn der PCR bei 95° C. PCRs werden üblicherweise immer frisch angesetzt, dann wird der Ansatz nur möglichst kurz der Raumtemperatur ausgesetzt und es wird schnell die Cycler-Reaktion gestartet. Ansonsten ist zu befürchten, dass im Rahmen der PCR ein Wirkungsverlust der Polymerase eintritt, der die Sensitivität des PCR-Assays senken würde. Dies wirft die Frage auf, ob die HotStar-Polymerase, weil sie besagten Aktivierungsschritt benötigt, vielleicht nicht sofort und frisch angesetzt werden muss, sondern ob man sich aliquotierte Mastermixe einfrieren kann, die man dann bei Bedarf auftaut und verwendet. Der Nutzen dieser Methode liegt auf der Hand. Zum einen ergibt sich eine Zeit-

und Arbeitersparnis, zum anderen könnte man einen solchen „Frozen Mix“ im Rahmen von Kooperationen an Kollegen verschicken, bzw. weltweit vertreiben und so für eine Vereinheitlichung der Ergebnisse verschiedener Labore sorgen.

Das geschilderte Prinzip funktioniert. Es war möglich, einen *Brugia*-HhaI-PCR-Mix, inklusive Polymerase, einzufrieren und mehrfach aufzutauen und wieder einzufrieren, ohne dass ein Wirkungsverlust der Polymerase PCR auffiel. Das Einfrieren wurde für die HotStar-Polymerase auch für O-150-Ansätze, SspI-Ansätze, Cox2-Ansätze, *P. falciparum*-Ansätze und die Multiplex-Ansätze ausprobiert. Ein Wirkungsverlust war bei bis zu dreimaligem Einfrieren und wieder Auftauen nicht erkennbar, wie Abbildung 14 zeigt.



**Abb. 14: Gelelektrophorese von „Frozen Mix“-PCR-Produkten**

Diese Gelelektrophorese zeigt HhaI-PCR-Produkte zu 3 verschiedenen Proben: der Negativkontrolle (-), der Positivkontrolle (+) und einer 1/10-Verdünnung der Positivkontrolle. Die ersten drei Banden gehören zu einer PCR, in welcher der Mastermix frisch verwandt wurde. Dann wurde der komplette Mix eingefroren, wieder aufgetaut und erneut für die selben drei Proben verwandt. Das wurde dreimal gemacht. Es zeigte sich, abgesehen von kleineren Intensitätsschwankungen, kein deutlicher Wirkungsverlust des Mixes.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diagnose der Onchozerkose

#### 4.1.1. Wahl des richtigen Assays: Test Strips

Der schnelle und zuverlässige Nachweis der *O. volvulus*-PCR-Produkte mittels DNA-Test Strip ist ein weiterer Schritt zur Vereinfachung der PCR-Diagnostik der Onchozerkose. Die Untersuchung von Hautbiopsien von mit *O. volvulus* infizierten Patienten mit einer niedrigen Mikrofilariendichte zeigte, dass der Test Strip eine geringfügig höhere Sensitivität hatte als der zeitaufwendige ELISA. Im Gegensatz zu diesem Resultat hatten Untersuchungen an experimentell hergestellten Verdünnungsreihen von *O. volvulus*-DNA-Proben eine geringfügig höhere Sensitivität des ELISA ergeben (5 ng, bzw. 1 ng, Mitteilung von Dr. Fischer und Frau Dr. Klüber). Diese Diskrepanz erklärt sich daraus, dass bei artifiziellen Proben der Cut-Off-Wert des ELISA niedriger festzulegen ist als bei realen Patientenproben, da Störfaktoren hierbei zu vernachlässigen sind. Somit lässt sich dieses Ergebnis nicht ohne weiteres auf reale Patientenproben übertragen.

Der routinemäßige Nachweis von PCR-Produkten ist weltweit die Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidium-Bromid-Färbung und UV-Betrachtung. Die Nachteile dieser Methode sind, dass eine UV-Anlage benötigt wird, toxische Chemikalien notwendig sind und die Methode an Sensitivität und Spezifität dem ELISA und somit auch dem Test Strip weit unterlegen ist.

Eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität ließe sich u. U. noch durch den Southern Blot erreichen. Doch da diese Methode sehr zeit- und arbeitsintensiv ist, scheidet sie für die Routinediagnostik aus. Das simple Test Strip-Verfahren wäre für den Einsatz in der Praxis speziell unter eingeschränkten Laborbedingungen in vielen Entwicklungsländern die beste Nachweismethode, wären da nicht die hohen Kosten pro Test Strip von ungefähr 1 US \$. Zukünftige Preisentwicklungen werden zeigen, ob sich der Test Strip als Diagnostikmittel für die Routinediagnostik durchsetzt, wenn er preislich für die betroffenen Entwicklungsländer erschwinglicher geworden ist.

Ein von einer amerikanischen Gruppe um G. Weil (Zhang et al. 2000) entwickelter PCR-Assay, der „Genecomp“, sah ebenfalls zunächst sehr vielversprechend aus. Es wäre sicherlich interessant gewesen, diese Methode mit unserer zu vergleichen. Das war leider nicht möglich, da die benötigten Kämme nicht mehr hergestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ein klar positives oder klar negatives Testergebnis einer Gelelektrophorese nicht immer zu entnehmen ist und diese Technik, obwohl sie von mehreren Autoren (Vincent et al. 2000) propagiert wird, daher nicht empfehlenswert ist.

#### **4.1.2. Erfolgskontrolle des PCR-Assay durch interne Kontrolle**

Die Entwicklung der internen Kontroll-DNA ermöglicht, falsch negative Proben mit zu hoher Inhibitorenkonzentration zu erkennen. Der praktische Nutzen, der hieraus entsteht, wurde im Rahmen dieser Dissertation deutlich, da einige Proben mit zuviel Inhibitoren als falsch negative Testergebnisse erkannt wurden, was zu deren Aufarbeitung und Nachtestung geführt hat. Somit kann die entwickelte interne Kontrolle benutzt werden, um die Effizienz der O-150-Amplifikation im Rahmen der PCR-basierten *O. volvulus*-Diagnostik zu evaluieren. Die interne Kontrolle kann dabei helfen, PCR-Assays zu standardisieren und praktikabler zu machen (Burkardt 2000). Die Standardisierung solcher Assays ist ein inzwischen von Filariose-Experten ausdrücklich gefordertes Ziel, dem hiermit nachgekommen wurde (LF Research Forum 2004).

#### **4.1.3. Quantifizierung des PCR-Assay**

Die zweite Zielsetzung an die interne Kontrolle war, durch eine Quantifizierung der PCR-Produkte mittels ELISA, Rückschlüsse auf die Parasitenlast des infizierten Patienten zu ziehen. Solche semiquantitativen Aussagen zu machen, ist schwer möglich. Die Versuche haben gezeigt, dass die gemessenen und errechneten ELISA-Daten zwar signifikant mit den Ergebnissen der Mikroskopie korrelieren (vgl. 3.1.3.). Es gab aber etliche Proben, die aufgrund der Einordnung nach ELISA-Daten in einer anderen Reihenfolge standen, als nach der Einordnung aufgrund der Ergebnisse der Mikroskopie, so hätte eine quantitative Einstufung anhand der ELISA-Daten die mit 0,1-3 Mf/ mg Haut Infizierten als geringer infiziert angegeben, als die in der Mikroskopie negativen Patienten aus dem endemischen Gebiet.

Das liegt daran, dass viele Patienten in dem auf der einen Körperseite entnommenen Skin Snip mehr Filarien hatten als in dem der anderen Seite. Auch innerhalb eines Onchozerkoms kann es zu einer großen Variation der Mikrofilariendichte kommen. Daher sollte man quantitative Aussagen nur für epidemiologische Studien verwenden und nicht für den einzelnen Patienten. Die quantitative Einstufung mittels PCR-ELISA und interner Kontrolle

eignet sich also zur Beurteilung der Parasitenlast in Patientenkollektiven, wie z. B. in ganzen Dörfern. Für die Beurteilung des Schweregrades der Onchozerkose beim individuellen Patienten ist dieses Verfahren aber aufgrund der Variabilität der Mikrofilariendichte nur eingeschränkt geeignet, denn es ermöglicht nicht Einstufungen im Bereich niedriger Filarienlasten vorzunehmen. Wichtig ist es, dass die Methode es erlaubt, Patienten mit niedriger und solche mit hoher Mikrofilarienlast zu unterscheiden.

In vielen Onchozerkose-Endemiegebieten Afrikas ist auch *W. bancrofti* endemisch. Um die interne Kontroll-DNA im Rahmen zukünftiger Projekte auch zur Evaluation von *W. bancrofti*-Assays nutzen zu können, wurde sie so konstruiert, dass sie mit der bereits bestehenden Ssp I-Sonde für *W. bancrofti* nachgewiesen werden kann (Fischer et al. 1999, Bockarie et al. 2000, Vasuki et al. 2003).

#### **4.1.4. Weiterführende Ansätze**

Zukünftige weiterführende Forschung, welche die durchgeführte *O. volvulus*-Arbeit fortsetzt, sollte die folgenden Fragestellungen untersuchen.

Im Rahmen epidemiologischer Studien sollte die Möglichkeit zur quantitativen Einordnung der Proben genutzt werden, um Vergleiche zwischen verschiedenen Dörfern und Arealen durchzuführen. Mittels PCR-ELISA ist ohne Mikroskopie und ohne in der Mikroskopie geschultes Personal eine vergleichende Quantifizierung der Parasitenlast von Patientenkollektiven möglich. Die hierfür benötigte Ausrüstung, nämlich Thermocycler und ELISA-Reader, ist zwar teurer und aufwendiger als ein Mikroskop, doch dadurch, dass dieses Verfahren, wie diese Arbeit zeigt, so gut standardisierbar ist, lässt sich in einem Labor mit dieser Ausrüstung die Testung großer Patientenzahlen effizient durchführen. Auch ein Poolen von Proben zur schnellen Vereinfachung des Assays ist in diesem Zusammenhang denkbar.

Bietet es einen Vorteil, wenn man die interne Kontroll-DNA vor der Extraktion der Probe zusetzt? Dies ist interessant, da sich so herausfinden lässt, wie groß der Schwund an nachweisbarer DNA bzw. wie hoch die Konzentration an störenden Inhibitoren bei verschiedenen Extraktionstechniken ist. An authentischen Proben getestet, lassen sich

relevantere Daten erheben als mit Hilfe einer Verdünnungsreihe einer Filarien-DNA-haltigen Probe, es ist nämlich u. U. davon auszugehen, dass z. B. auf Grund verschiedener Enzymzusammensetzungen des untersuchten Gewebes bei verschiedenen Patienten nach der Extraktion unterschiedlich viel DNA im Extrakt enthalten ist.

Was wäre, wenn man Patienten aus verschiedenen Kontinenten, z. B. Südamerika und Afrika, im Rahmen einer Studie miteinander per ELISA vergleicht? Es ist möglich, dass Patienten verschiedener Rassen aufgrund der unterschiedlichen Hautfarbe und somit des unterschiedlichen Pigment-Gehaltes der Haut verschieden viele Inhibitoren enthalten.

Als der praktische Teil dieser Arbeit durchgeführt wurde, 2000-2002, begann eine neue Methodik auf dem Sektor der PCR-Diagnostik sich durchzusetzen, die heute bei vielen diagnostischen PCR-Assays zum Standard gehört, die Real-Time PCR. Diese spezielle PCR-Methode ist, verglichen mit der in dieser Arbeit dargestellten PCR-Methodik, sehr viel schneller und ermöglicht direkt während des PCR-Laufes eine Quantifikation des PCR-Produktes und mittels Sonden eine Kontrolle, ob das erwünschte Target amplifiziert wurde, sodass Nachweismethoden des Amplifikats wie Test Strips, ELISA, Gelelektrophorese oder Southern Blot unnötig werden. Außerdem ist die Kontaminationsgefahr bei der Real-Time PCR deutlich reduziert. Leider stand mir die Real-Time PCR im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung, doch es wäre sinnvoll, dieses Verfahren in künftigen Studien für die Filariose-Diagnostik zu etablieren. Zwar sind sowohl der Cycler, als auch die Reagenzien für die Real-Time PCR teurer als für die herkömmliche PCR, doch oftmals lässt sich durch Real-Time PCR eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität erreichen, so dass unbedingt in künftigen Studien überprüft werden sollte, ob sich hierdurch die Diagnostik der Filariose verbessern ließ.

Derartige Real-Time PCR-Assays wurden auf dem Gebiet der Parasitologie bereits für etliche Erreger entwickelt, z.B. für *W. bancrofti* (Hoerauf et al. 2003c), *P. falciparum* (Malhotra et al. 2005) oder die Amöben (Qvarnstrom et al. 2005).

Nachdem gezeigt worden war (vgl. 3.2.8. und 4.2.7), dass es möglich ist, PCR-Mastermixe mit Hotstar-Polymerase, auch solche für O-150, einzufrieren und nach dem Auftauen zu verwenden, sollte diese praktische Frage weiter untersucht werden. Man sollte ausprobieren, ob dieses Verfahren auch mit der in dieser Arbeit für die *O. volvulus*-Experimente verwendete DNAzymeII-Polymerase funktioniert und man sollte testen, ob und wie gut der O-150-Assay mit Hotstar-Polymerase funktioniert. Falls die Möglichkeit besteht, den Assay auch mit

Hotstar-Polymerase ohne Einbußen in der Testqualität durchzuführen, dann könnte man das Mastermix-Einfrier-Verfahren nutzen, ebenso falls dieses mit der DNAzymeII-Polymerase funktioniert. Dies würde eine erhebliche logistische Erleichterung darstellen (vg. 4.2.7. und 4.2.8.).

## **4.2. Diagnose der *B. timori*-Filariose**

### **4.2.1. Nachweis des HhaI-Repeat bei *B. timori***

Für die *Brugia*-Diagnostik ergibt sich, dass man die für *B. malayi* entwickelte HhaI-Sonde ebenso für *B. timori* verwenden kann, da beide dasselbe Repeat haben. Dies war bisher noch nicht bewiesen worden. Es war lediglich gezeigt worden, dass sich *B. timori* mit der HhaI-Sonde detektieren ließ (Klüber et al. 2001), doch der Beweis, dass sich die Würmer hinsichtlich des Repeats nicht unterscheiden, stand bisher noch aus.

Es wurde von mir gezeigt, dass es innerhalb des *B. timori*-Repeats Variationen gibt, dass sich diese Längenpolymorphismen jedoch nicht auf die Detektion auswirken, da sie nicht das sondenspezifische HhaI-Teilstück betreffen. Hierbei besteht jedoch die Möglichkeit, dass beim Pipettieren einzelner Mikrofilarien unabsichtlich freie DNA einer anderen Mikrofilarie mit pipettiert wurde. Um also absolut sicher zu gehen, dass sich mehrere intraindividuelle HhaI-Versionen innerhalb eines *B. timori*-Genoms befinden, was für *B. malayi* bereits gezeigt worden war (Xie et al. 1994), hätte man am besten einen adulten Wurm genommen. Leider stand zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein adulter *B. timori*-Wurm zur Verfügung. Daher bleibt dieser eindeutige Beweis vorerst aus.

Ob sich durch genaueres Katalogisieren der verschieden langen Fragmente Rückschlüsse auf bestimmte *Brugia*-Subpopulationen und somit auf relevante Verbreitungswege und Infektionsketten schließen lassen, ist derzeit noch nicht absehbar. Zukünftige Studien, die regionale Verteilungsmuster verschieden langer Polymorphismen untersuchen, könnten zeigen, ob sich mittels Kartografierung solcher Verteilungen von Subpopulationen Erkenntnisse für die Epidemiologie gewinnen lassen.

#### 4.2.2. Nutzen der molekularen Marker

Bei der Identifikation solcher Subpopulationen könnten die anderen identifizierten genetischen Marker, 5s rDNA spacer, ITS-2, *cox-2*, *Wolbachia* 16s rDNA, *Wolbachia* FTSZ, von Nutzen sein, da sich u. U. auch hier Polymorphismen finden lassen.

Das Aufdecken und anschließende Unterbinden von Verbreitungswegen der Parasiten und somit von Infektionsketten ist eine der Hauptaufgaben der Epidemiologie und der Bekämpfung. Das verdeutlicht die Relevanz der Ergebnisse.

Mittels *cox-2*-PCR und HpaI-Verdau ist eine molekularbiologische Unterscheidung von *B. timori* und *B. malayi* möglich, was bei der Erforschung von Übertragungswegen und Verbreitung der Parasiten im Rahmen epidemiologischer Studien praktisch ist, erspart es doch eine aufwendige mikroskopische Identifizierung der beiden Parasiten. Ebenso könnte man natürlich zur molekularbiologischen Unterscheidung der beiden *Brugia*-Spezies die Unterschiede im Genom ihrer endosymbiontischen *Wolbachien*-Bakterien nutzen. Da jedoch noch nicht bekannt ist, ob die gefundenen 16SrDNA- (AF499135) und FTSZ-(AF499135) Variationen nicht auch in anderen Bakterien vorkommen und es somit aufgrund unerwünschter bakterieller Probenkontamination zu Kreuzreaktionen kommen könnte, ist die Unterscheidung der beiden Spezies anhand ihrer eigenen mitochondrialen DNA gegenüber der Unterscheidung auf Grund der DNA ihrer Endobakterien zu bevorzugen.

Der erstmalige Nachweis von *Wolbachia*-Endobakterien auch bei *B. timori* ist für zukünftige Therapieprogramme relevant. Falls es zur Entwicklung von Resistenzen kommt, stellt die antibiotische Behandlung der *Wolbachien* eine Reserve im Rahmen der Bekämpfungsstrategien der Filariosen dar (vgl. 1.3.1.).

#### 4.2.3. Nutzen der Sputumdiagnostik

Die invasive Probensammlung von Nachtblutproben ist nicht nur mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Sie stößt bei der endemischen Bevölkerung auch auf großen Widerstand, der die Durchführung von Surveys erheblich erschwert. Daher wäre es gut, eine nicht invasive Nachweismethode für *B. timori* zu haben, wie z. B. einen Nachweis durch Sputumproben.

Der hierfür entwickelte Sputum-Assay zeigte jedoch eine so geringe Sensitivität verglichen mit der Nachtblutfiltration, dass der Sputum-Assay für die individuelle Diagnostik nicht

brauchbar ist. Trotzdem denke ich, dass der erstmalige Nachweis von *Brugia*-DNA im Sputum einen Fortschritt für die Diagnostik darstellt. Sollte diese Methode in den nächsten Jahren weiterentwickelt werden, z. B. durch die Entnahme von inhalativ provoziertem Sputum oder Verwendung der „nested PCR“, so lässt sich u. U. die Sensitivität erheblich steigern.

Außerdem besteht mit der Sputum-Diagnostik die Möglichkeit, im Rahmen eines ersten Surveys in einem Gebiet in dem bisher noch kein *Brugia*-Vorkommen bekannt ist, nicht invasiv Probenmaterial zu gewinnen. Diese Sputumproben könnte man dann poolen und per PCR-Assay testen, um festzustellen, ob es in dieser Gegend überhaupt *Brugia*-Infizierte gibt. Oft gibt es in abgelegenen Gegenden die Probleme, dass medizinisches Personal notwendig ist und dass die Bevölkerung invasiven Maßnahmen ablehnend gegenüber steht. Diese Probleme lassen sich durch einen Sputum-Assay vermeiden. Die geringe Sensitivität müsste man dann als Nachteil akzeptieren.

Dass auch der Nachweis einer Ascariasis mittels Sputum-PCR geglückt ist, demonstriert die Anwendungsbreite der Ergebnisse. Man könnte z. B. bei Emigranten aus den Tropen als Screening-Untersuchung Sputum per PCR auf verschiedenste Erreger untersuchen, wie z. B. Tbc, was schon lange möglich ist, *Wuchereria*, was auch schon länger bekannt ist (Abbasi et al. 1999) oder eben *Brugia*, wie es jetzt gezeigt wurde. Sicherlich lassen sich auch Multiplex-PCR-Assays entwickeln, welche die schnelle, einmalige Testung einer Sputumprobe auf mehrere dieser Erreger ermöglichen. Ein erster Schritt in diese Richtung ist der in dieser Arbeit skizzierte *Wuchereria/Brugia*-Multiplex-Assay.

Eine weitere Erfahrung der durchgeführten Sputum-Experimente ist, dass es bei Verwendung der DNAzymeII-Polymerase zu Kreuzreaktionen, unter anderem mit menschlicher und mykobakterieller DNA kommen kann, welche bei Verwendung der Hotstar-Polymerase unterbleiben.

Diese Erkenntnis ist für weiterführende Forschungsprojekte, die Sputum und das HhaI-Repeat verwenden, wichtig, da die unerwünschten Kreuzreaktionen, wie erwähnt, zwar auftreten, sich aber einfach vermeiden lassen.

#### **4.2.4. Nutzen der Multiplex-PCR**

Die Entwicklungen der *P. falciparum/ Brugia*-Multiplex-PCR-Assays und des erwähnten *Wuchereria/ Brugia*-Multiplex-Assays ermöglichen die schnelle Untersuchung der Einwohner ganzer Dörfer auf gleich zwei Erreger. Außerdem zeigten meine Experimente, dass die Multiplex-PCR im Rahmen der Vektorkontrolle einsetzbar ist, da sowohl die Filarien, als auch die Plasmodien über die *Anopheles*-Mücke übertragen werden.

Da es Anzeichen dafür gibt, dass eine Co-Infektion mit Plasmodien und Helminthen den Verlauf der Malaria klinisch verschlechtert (Druilhe et al. 2005), hat ein simultaner Nachweis von *Plasmodium* und *B. timori* in Gebieten, in denen beide Erreger endemisch sind, besondere klinische Relevanz. Andere Multiplex-PCR-Assays für weitere Helminthen und Plasmodien könnten zukünftig entwickelt werden, um diese Problematik weiter zu behandeln.

Man muß jedoch bedenken, dass meine Multiplex-PCR-Experimente nur den Charakter einer Pilotstudie haben. Es ist davon auszugehen, dass Untersuchungen an Patientenkollektiven zeigen werden, dass bei den gezeigten Multiplex-PCR-Assays verglichen mit herkömmlichen PCR-Assays die Sensitivität sinkt, da für die Amplifikation eines in geringer Menge vorhandenen Targets weniger Reagenzien zur Verfügung stehen, da diese von dem konkurrierendem Primerpaar verbraucht werden. Somit erscheint mir die Multiplex-PCR als nicht geeignet, wenn es um die Individualdiagnose und somit möglichst hohe Sensitivität geht. Zum schnellen und kostengünstigen Screenen der Bevölkerung im Rahmen epidemiologischer Studien und somit für Aussagen über größere Kollektive ist diese Verfahren jedoch gut geeignet.

#### **4.2.5. Diagnostik von *B. timori* im Tagblut**

Der von mir gezeigte Nachweis von *B. timori*-DNA im Tagblut eignet sich aufgrund seiner gegenüber dem Nachtblut-Assay eingeschränkten Sensitivität nicht zur Diagnostik für individuelle Patienten. Doch als vereinfachendes Screening-Instrument im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen und bei der Überwachung von Bekämpfungsmaßnahmen ist diese Nachweismethode gut geeignet. Bei der Supervision von Massenbehandlungen im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen sind zunächst Aussagen über den einzelnen Patienten weniger interessant als Aussagen über den Rückgang der Infektion bei der gesamten endemischen Bevölkerung. Hierfür ist die Methode einer Tagblut-PCR ein schnelles, standardisiertes Verfahren.

Interessant ist, dass die PCR-Methode der Tagblut-Filtration in der Gruppe der gering Infizierten (1-10 Mikrofilarien/  $\mu\text{l}$  Nachtblut) überlegen ist (vgl. 3.2.3.). Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass man manchmal zirkulierende freie DNA in Auflösung befindlicher Mikrofilarien per PCR nachweisen kann (Fischer et al. 2000). Eine andere Erklärung wäre, dass zufällig bei diesen Proben im Filtrat keine Parasiten enthalten waren, während welche in den Extraktionsproben vorhanden waren. Letzteres ist bei hoher Parasitämie eher unwahrscheinlich, da 1000  $\mu\text{l}$  filtriert wurden aber nur insgesamt 600  $\mu\text{l}$  extrahiert wurden. Bei niedriger Mikrofilarienlast ist es aber gut möglich.

Die vorliegenden Ergebnisse haben demonstriert, dass sich die Sensitivität solcher PCR-Assays u. U. steigern lässt, wenn man anstelle von 200  $\mu\text{l}$  Patientenblut 600  $\mu\text{l}$  oder mehr extrahiert. Das ist empfehlenswert.

Aufgrund der komplizierten Technik der Guanidin-Konservierung von Blut mit höchst toxischen Chemikalien rate ich von diesem Verfahren ab, zumal die Methode verglichen mit der EDTA- und der Urea-Methode keine deutlich sichtbare Sensitivitätssteigerung erbrachte. Dies lässt sich trotz der geringen Anzahl an Proben sagen.

Im Übrigen scheint es bei Betrachtung meiner Eigenblutversuche so, dass sich freie DNA nach dem vorliegenden Protokoll viel schlechter extrahieren lässt, als in Mikrofilarien enthaltene DNA. Das ist nicht überraschend, da dieses Protokoll für ganze Mikrofilarien entwickelt wurde und die ungeschützte freie DNA sicherlich vermehrt beim gründlichen Mischen zerstört wurde.

Die scheinbar schlechte Sensitivität dieser Eigenblut-Versuche erklärt sich bei genauer Betrachtung daraus, dass hauptsächlich die geringe Nachweisbarkeit der freien DNA die Ergebnisse negativ beeinflusst. Um die Bedingungen im tropischen Mainang bei diesen Eigenblutversuchen möglichst realistisch zu imitieren, wurden die Proben mehrfach auf 60° C erwärmt. Vielleicht wirkte sich das auf freie DNA unverhältnismäßig stark aus.

#### 4.2.6. Diagnose von Filarien in Stechmücken

Die an den Moskitos gewonnenen Daten verdeutlichen mehreres: zum einen ließen sich epidemiologisch relevante Daten über die Moskitos auf der Insel Alor gewinnen, zum anderen wurde die Anwendbarkeit der PCR-Methodik für die Untersuchung der Vektoren anschaulich verdeutlicht. Mit den gezeigten Multiplex-Assays kann man Mosquito-Pools doppelt so schnell auf zwei Erreger testen, als wenn man zwei getrennte Assays durchführt. Das stellt eine enorme Vereinfachung für die Logistik, das Personal und letztlich auch die Kosten von Surveys dar.

Außerdem hat diese Arbeit *A. barbirostris*, der bereits als Vektor für *B. timori* auf Flores bekannt war (Atmosoedjono et al. 1977), auch als Vektor auf Alor identifiziert und gezeigt, dass wahrscheinlich *Culex* nicht als Überträger fungiert, da kein positiver *Culex*-Pool gefunden werden konnte, sieht man von den Pools ab, bei denen die *Culex*-Mücken *Brugia*-DNA im Magen hatten. Diese *Culex*-Pools hatten keine *Brugia*-DNA in den Köpfen und kamen somit nicht als Überträger in Frage.

Da andere *Anopheles*-Spezies nur vereinzelt gefangen wurden, scheiden diese ebenfalls als relevante Überträger aus.

#### 4.2.7. Gefrorener PCR-Mix

Den Mastermix für PCR-Reaktionen unmittelbar vorher anzusetzen, stellt nicht nur einen großen logistischen und personellen Aufwand dar, es beinhaltet auch jedes Mal das Risiko eines Fehlers bei der Herstellung, z. B. einer Kontamination. Somit stellt der in dieser Arbeit geschilderte Vorgang, einen PCR-Mastermix anzusetzen, einzufrieren und bei Bedarf aufzutauen eine deutliche Vereinfachung der Methodik dar. Außerdem ist es so möglich, einen Mastermix in größerer Menge herzustellen und im Rahmen von Kooperationen an andere Labore weiterzugeben. Dies ist ein Schritt in Richtung Standardisierung von PCR-Assays.

#### 4.2.8. Weiterführende Ansätze

Folgende weiterführende Ansätze ergeben sich aus meinen Ergebnissen.

Zukünftige Studien, die sich mit Infektionsketten beschäftigen, könnten die in dieser Arbeit dargestellten molekularen Marker zur Aufdeckung von Verbreitungswegen nutzen. Sicherlich lassen sich auch noch weitere Polymorphismen innerhalb verschiedener Populationen einer *Brugia*-Spezies finden.

Im Rahmen epidemiologischer Studien bietet sich durch den Tagblut-PCR-Assay eine Alternative zur aufwendigen Sammlung von Nachtblut an. Die eingeschränkte Sensitivität lässt sich akzeptieren, solange man nur die annähernde Prävalenz in ganzen Gegenden erfassen will, da man die reale Prävalenz, welche höher ist, abschätzen kann. Sollte im Rahmen von Bekämpfungsmaßnahmen die Prävalenz deutlich gesenkt werden, so braucht man jedoch sensitivere Verfahren, wie die bisher angewendete Nachtblut-Mikroskopie oder die Nachtblut-PCR.

Die Ergebnisse mit dem Sputum sollten dazu führen, dass man ausprobiert, inwieweit sich vergleichbare Assays für andere Parasiten, wie z.B. *Ascaris* oder *Dirofilaria* etablieren lassen. Außerdem kann man den geschilderten Sputum-Assay nutzen, um im Rahmen eines ersten orientierenden Surveys nicht invasiv erste Daten zu sammeln (s. o.).

Die geschilderten Multiplex-PCR-Assays stellen deutliche Vereinfachungsmöglichkeiten dar. Beide Verfahren sollten an größeren Patientenkollektiven getestet werden und mit Mikroskopie und herkömmlicher PCR-Methodik verglichen werden, um zu überprüfen, in wie weit eine Einschränkung der Sensitivität auftritt.

Auch sollten zur weiteren Vereinfachung Real-Time-Multiplex-PCR-Assays entwickelt und evaluiert werden. Solch ein Assay wurde z.B. für *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* und *Cryptosporidium parvum* entwickelt (Verveij et al. 2004), dieser zeigt laut den Entwicklern keine deutliche Einschränkung von Sensitivität und Spezifität.

Meine Empfehlungen zur Entwicklung von Real-Time-PCR-Assays für *O. volvulus* (vgl 4.1.4.) erscheinen mir auch auf die lymphatische Filariose übertragbar: auch für *B. timori*, *B. malayi* und *W. bancrofti* sollten angesichts der rasanten Entwicklung auf diesem Sektor Real-

Time PCR-Assays entwickelt werden. Diese sind aktuell aufgrund der immensen Kosten auf absehbare Zeit in den Endemiegebieten nicht realisierbar, doch die Preissituation könnte sich zukünftig ändern.

Die Erkenntnis, PCR-Mastermixe einzufrieren zu können, stellt eine erhebliche Vereinfachung dar. Das sollte für diverse PCR-Assays und auch für verschiedene Polymerasen überprüft werden.

Zukünftige Therapiestudien mit Antibiotika, z.B. Doxycyclin, sollten auch in *B. timori*-Endemiegebieten durchgeführt werden, da erstmalig nachgewiesen wurde, dass auch *B. timori* Wolbachien beherbergt.

## **5. Zusammenfassung**

Die Arbeit sollte neue Möglichkeiten zur Diagnose von Filarieninfektionen beim Menschen und beim Überträger mit der Polymerase-Kettenreaktion zeigen. Von den Filarien wurden *Brugia timori* und *Onchocerca volvulus* ausgewählt, um für diese Erreger die PCR-Diagnostik zu verbessern.

Für *O. volvulus* sollten Methoden zur Detektion falsch negativer Resultate und zur Quantifizierung von O-150-PCR-Produkten entwickelt werden und es sollte untersucht werden, ob ELISA oder Test Strip das bessere Verfahren zum Nachweis von *O. volvulus*-PCR-Produkten ist.

Es wurde eine interne Kontrolle für die PCR-basierte Diagnostik der Onchozerkose entwickelt. Die Brauchbarkeit wurde anhand von Patientenproben evaluiert. Eine deutliche Verbesserung der *O. volvulus*-PCR-Diagnostik wurde mit dem Test Strip-Verfahren erreicht, das bei der Austestung an 127 Patienten dem ELISA überlegen war.

Für die nur wenig untersuchte *B. timori* sollte gezeigt werden, ob der für *B. malayi* entwickelte PCR-Assay auf *B. timori* übertragbar ist, ob eine molekularbiologische Unterscheidung von *B. malayi* und *B. timori* möglich ist und ob *B. timori* Wolbachien-Bakterien beherbergt. Um die Diagnostik von *B. timori* zu vereinfachen, sollten PCR-Assays für Tagblut und Sputum entwickelt werden. Zur einfachen Testung von *B. timori* und simultanen Infektionen mit anderen Erregern sollten Multiplex-PCR-Assays entwickelt werden. Des Weiteren sollte der Überträger von *B. timori* auf Alor identifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der HhaI-Assay auch für *B. timori* nutzen lässt. Dabei wurden Polymorphismen innerhalb des HhaI-Repeats beobachtet. Es wurden molekulare Marker zur Unterscheidung von *B. timori* und *B. malayi* identifiziert. Es gelang erstmals, auch bei *B. timori* Wolbachia-Endobakterien nachzuweisen, sodass auch diese Filariose mit Doxycyclin behandelt werden kann. Zur DNA-Konservierung und Extraktion von Tagblut ergaben drei Methoden, basierend auf EDTA, Guanidinthiocyanat oder Urea, brauchbare Resultate. Es gelang der Nachweis von *B. timori* im Sputum bei Patienten mit hoher Mikrofilariämie. Die Bedeutung dieses Nachweisverfahrens wurde diskutiert. Multiplex-Assays zum Nachweis simultaner Infektionen mit *Plasmodium* bzw. *Wuchereria* wurden entwickelt. *Anopheles barbirostris* wurde als Vektor der *Brugia*-Infektion auf der indonesischen Insel Alor identifiziert.

Am Beispiel des HhaI-PCR-Mastermixes gelang es aufzuzeigen, dass man PCRs nicht immer frisch ansetzen muss. Die Bedeutung dieser Erkenntnis wurde aufgezeigt.

## **6. Literaturverzeichnis**

**Abbasi I, Hamburger J, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy R, Gad A, Williams SA (1996)**, Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in patients' sputum by the polymerase chain reaction. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90:531-532.

**Abbasi I, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, Ramzy RM, Williams SA, Hamburger J (1999)**, Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction employing patients' sputum. Parasitological Research, 85:844-849.

**Ashford RW (2001)**, Current usage of nomenclature for parasitic diseases, with special reference to those involving arthropods. Medical and Veterinary Entomology, 15:121-125.

**Atmosoedjono S, Partono F, Dennis DT, Purnomo (1977)**, *Anopheles barbirostris* (Diptera: Culicidae) as a vector of the Timor filaria on Flores Island: preliminary observations. Journal of Medical Entomology, 13:611-613.

**Bebehani K (1998)**, Candidate parasitic diseases. Bulletin of the World Health Organization, 76:64-67.

**Blanks J, Richards F, Beltran F, Collins R, Alvarez E, Flores G, Zea, Bauler B, Cedillos R, Heisler M, Branding-Bennett D, Baldwin W, Bayona M, Klein R, Jacox M (1998)**, The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: a history of partnership. Revista Panamericana de Salud Publica, 3:367-374.

**Boatin BA, Toe L, Allev ES, Nagelkerke NJ, Borsboom G, Habbema JD (2002)**, Detection of *Onchocerca volvulus* infection in low prevalence areas: a comparison of three diagnostic methods. Parasitology, 125:545-552.

**Bockarie MJ, Fischer P, Williams SA, Zimmerman PA, Griffin L, Alpers MA, Kazura JW (2000)**, Application of a polymerase chain reaction-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in pools of wild-caught *Anopheles punctulatus* in a filariasis control area in Papua New Guinea. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62:363-367.

**Boussinesq M, Pion SD, Demanga-Ngangue, Kamgno J (2002)**, Relationship between onchocerciasis and epilepsy: a matched case-control study in the Mbam Valley, Republic of Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96:537-541.

**Bradley JE & Unnasch TR (1996)**, Molecular approaches to the diagnosis of onchocerciasis. *Advances in Parasitology*, 37:57-106.

**Burkardt HJ (2000)**, Standardization and quality control of PCR analysis. *Clinical and Chemical Laboratory Medicine*, 38:87-91.

**Chandrashekar R (1997)**, Recent advances in diagnosis of filarial infections. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35:18-26.

**Chiodini PL, Moody AH, Monser DW, Britton R (2001)**, Atlas of medical helminthology and protozoology. Churchill Livingstone, London, 4. Auflage.

**Cooper PJ, Mancero T, Espinel M, Sandoval C, Lovato R, Guderian RH Nutman TB (2001)**, Early human infection with *Onchocerca volvulus* is associated with an enhanced parasite-specific cellular immune response. *The Journal of Infectious Diseases*, 183:1662-1668.

**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. *International Journal of Parasitology*, 30:1177-1179.

**Davis Br (1989)**, Filariases. *Dermatological Clinic*, 7:313-321.

**Dreyer G, Addis D, Dreyer P, Noroes J (2002)**, Basic lymphoedema management. Hollis Publishing Company, Hollis, NH, USA, 1. Auflage.

**Druilhe P, Tall A, Sokhna C (2005)**, Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? *Trends in Parasitology*, 21:359-362.

**Felleisen R & Klinkert MQ (1992)**, Molecular biological techniques in the diagnosis of tropical parasitic diseases. *Naturwissenschaften*, 79:499-508.

**Fischer P & Büttner DW (2002)**, The epidemiology of onchocerciasis and the long term impact of existing control strategies on this infection. *The Filaria*, Volume 5, Kluwer Class Parasites, Boston, MA, USA, 1. Auflage.

**Fischer P, Kipp W, Bamuhiga J, Binta Kahwa J, Kiefer A, Büttner DW (1993)**, Parasitological and clinical characterization of *Simulium neavei*-transmitted onchocerciasis in Western Uganda. *Tropical Medicine and Parasitology*, 44:311-321.

**Fischer P, Rubaale T, Meredith SEO, Büttner DW (1996)**, Sensitivity of a PCR-based assay to detect *Onchocerca volvulus* DNA in skin biopsies. *Parasitology Research*, 82: 395-401.

**Fischer P, Bamuhiiga J, Büttner DW (1997)**, Occurrence and diagnosis of *Mansonella streptocerca* in Uganda. *Acta Tropica*, 63:43-55.

**Fischer P, Büttner DW, Bamuhiiga J, Williams SA (1998)**, Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58:816-820.

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

**Fischer P, Supali T, Wibowo H, Bonow I, Williams SA (2000)**, Detection of DNA of nocturnally periodic *Brugia malayi* in night and day blood samples by a polymerase chain reaction-ELISA-based method using an internal control DNA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62:291-296.

**Fischer P, Wibowo H, Pischke S, Rückert P, Liebau E, Ismid IS, Supali T (2002)**, PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 96:809-821.

**Gasser RB, Legoff L, Petit G, Bain O (1996)**, Rapid delineation of closely-related filarial parasites using genetic markers in spacer rDNA. *Acta Tropica*, 62:143-150.

**Gelhaus A, Urban B, Pirmez C (1995)**, DNA extraction from urea-preserved blood or blood clots for use in PCR. *Trends in Genetics*, 11:41.

**Goddard J (2000)**, Infectious disease and arthropods. Humana Press, New Jersey, USA, 1. Auflage.

**Gomez-Merino E, Chiner E, Signes-Costa J, Arriero JM, Zaragoza MV, Onrubia JA, Mayol MJ (2002)**, Pulmonary dirofilariasis mimicking lung cancer. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 57:33-34.

**Gomez-Priego A, Cruz-Gutierrez LE, Paniagua-Solis JF, Ruenes-Meza MT (1993)**, DIG-ELISA test in onchocerciasis. Serum antibodies and probability of infection. *Archives of Medical Research*, 24:353-359.

**Goodman DS, Orelus JN, Roberts JM, Lammie PJ, Streit TG (2003)**, PCR and Mosquito dissection as tools to monitor filarial infection levels following mass treatment. *Filaria Journal*, 2:11.

**Guzman GE, Awadzi K, Opoku N, Narayanan RB, Akuffo HO (2002)**, Comparison between the skin snip test and simple dot blot assay as potential rapid assessment tools for onchocerciasis in the postcontrol era in Ghana. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:1014-1020.

**Hall LR & Pearlman E (2002)**, Pathogenesis of onchocercal keratitis. *Clinical Microbiological Review*, 12:445-453.

**Harnett W, Bradley JE, Garate T (1998)**, Molecular and immunodiagnosis of human filarial nematode infections. *Parasitology*, 117:59-71.

**Hoerauf A, Adjei O, Büttner DW (2002)**, Antibiotics for the treatment of onchocerciasis and other filarial infections. *Current Opinions of Investigational Drugs*; 3:533-537.

**Hoerauf A, Büttner DW, Adjei O, Pearlman E (2003a)**, Onchocerciasis. *British Medical Journal*, 326:207-210.

**Hoerauf A, Mand S, Volkmann L, Büttner M, Marfo-Debrekeyi Y, Taylor M, Ohene A, Büttner DW (2003b)**, Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes and Infection* 5:261-273.

**Hoerauf A, Mand S, Fischer K, Kruppa T, Marfo-Debrekeyi Y, Yaw Debrah A, Pfarr KM, Adjei O, Büttner DW (2003c)**, Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Microbiology and Immunology* 192:211-216.

**Hyde JE (1973)**, *Protocols in molecular parasitology*, Hammond Press, New Jersey, USA, 1. Auflage.

**Kaiser C, Kipp W, Asaba G, Mugisa C, Kabagambe G, Rating D, Leichsenring M (1996)**, The prevalence of epilepsy follows the distribution of onchocerciasis in a west Ugandan focus. *Bulletin of the World Health Organisation*, 74:361-367.

**Kamal IH, Fischer P, Adly M, El Sayed AS, Morsy ZS, Ramzy RMR (2001)**, Evaluation of a PCR-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in *Culex pipiens* from an Egyptian village with a low prevalence of filariasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95:833-841.

**Karam M & Ottesen E (2000)**, The control of lymphatic filariasis. *Medecine Tropicale*, 60:291-296.

**Katholi KR, Toe L, Merriweather A, Unnasch TR (1995)**, Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by screening pools of black flies. *The Journal of Infectious Diseases*, 172:1414-1417.

**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. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95:169-170.

**Koya SM, Kumar S, Regu K, Sharma RC (1998)**, Early development of acute filariasis in a migrant from non-endemic to hyperendemic area: a case report. Journal of Communicable Diseases, 30:117-120.

**Lalitha P, Eswaran D, Gnanasekar M, Rao KV, Narayanan RB, Scott A, Nutman T, Kaliraj P (2002)**, Development of antigen detection ELISA for the diagnosis of brugian and bancroftian filariasis using antibodies to recombinant filarial antigens *Bm*-SXP-1 and *Wb*-SXP-1. Microbiology and Immunology, 46:327-332.

**Lammie PJ, Weil G, Noordin R, Kaliraj P, Steel C, Goodman D, Lakshmikanthan VB, Ottesen E (2004)**, Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis – a multicenter trial. Filaria Journal, 3 :9.

**Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Almera R, Fuentes M, Carrasquel A, Barker RH (1994)**, Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 50:169-180.

**Lawrence RA (2001)**, Immunity to filarial nematodes. Veterinary Parasitology, 100:33-44.

**Lee KJ, Park GM, Yong TS, Im K, Jung SH, Jeong NY, Lee WY, Yong SJ, Shin KC (2000)**, The first Korean case of human pulmonary dirofilariasis. Yonsei Medical Journal, 41:285-288.

**LF Research Forum (2004)**, Towards a Strategic Plan for Research to Support the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 71: Suppl. 1-46.

**Liu Y, Sun D, Xue H (1998)**, Detection of *Brugia malayi* larva in mosquito vector by PCR and PCR-ELISA. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 16:274-278.

**Lizotte MR, Supali T, Partono F, Williams SA (1994)**, A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51:314–321.

**Maizels RM, Partono F, Oemijati S, Denham DA, Ogilvie BM (1983)**, Cross-reactive surface antigens on three stages of *Brugia malayi*, *B. pahangi* and *B. timori*. *Parasitology*, 87:249-263.

**Mak JW (1987)**, Epidemiology of lymphatic filariasis. *Ciba Foundation Symposium 1987*, 127:5-14.

**Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL (2005)**, Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:3630-3635.

**Mand S, Marfo Debrekyei Y, Dittrich M, Fischer K, Adjei O, Hoerauf A (2002)**, Animated documentation of the filarial dance sign (FDS) in bancroftian filariasis. *Filaria Journal*, 2:3.

**Meredith SE, Lando G, Gbakima AA, Zimmerman PA, Unnasch TR (1991)**, *Onchocerca volvulus*: application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Experimental Parasitology*, 73:335-344.

**Molyneux DH & Zagaria N (2002)**, Lymphatic filariasis elimination: progress in global programme development. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*.96:15-40.

**Molyneux DH (2003)**, Lymphatic filariasis (elephantiasis) elimination: a public health success and development opportunity. *Filaria Journal*, 2:13.

**Mpagi JL, Büttner DW, Tischendorf FW, Erttmann KD, Brattig NW (2000)**, Use of the recombinant *Onchocerca volvulus* protein Ov20/ OvS1 for the immunodiagnostic differentiation between onchocerciasis and mansonelliasis and for the characterization of hyperreactive onchocerciasis (sowda). *Tropical Medicine and International Health*, 5:891-897.

**Noordin R, Wahyuni S, Mangali A, Lim Boon Huat, Yazdanbakhsh M, Sartono E (2004)**, Comparison of IgG4 assays using whole parasite extract and BmRI recombinant antigen in determining antibody prevalence in brugian filariasis. *Filaria Journal*, 3:8.

**Nutman TB, Parredes W, Kubofcik J, Guderian RH (1996)**, Polymerase chain reaction-based assessment after macrofilaricidal therapy in *Onchocerca volvulus* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 173:773-776.

**Oqueka T, Supali T, Ismid IS, Purnomo, Rueckert P, Bradley M, Fischer P (2005)**, Impact of two rounds of mass drug administration using diethylcarbamazine combined with albendazole on the prevalence of *Brugia timori* and of intestinal helminths on Alor Island, Indonesia. *Filaria Journal* 4:5.

**Oskam L, Schoone GJ, Kroon CC, Lujan R, Davies JB (1996)**, Polymerase chain reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of blackflies. *Tropical Medicine and International Health*, 1:522-527.

**Ottesen EA (2002)**, Major progress toward eliminating lymphatic filariasis. *New England Journal of Medicine*, 347:1885-1886.

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

**Pampiglione S, Del Maschio O, Pagan V, Rivasi F (1994)**, Pulmonary dirofilariasis in man: a new Italian case. Review of the European literature. *Parasite*, 1:379-385.

**Pischke S, Büttner DW, Liebau E, 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. *Tropical Medicine and International Health*, 7: 526-531.

**Plaisier AP, van Oortmarssen GJ, Habbema JD, Remme J, Alley ES (1990)**, ONCHOSIM: a model and computer simulation program for the transmission and control of onchocerciasis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 31: 43-56.

**Plaisier AP, van Oortmarssen GJ, Remme J, Habbema JD (1991)**, The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in West African savanna. *Acta Tropica*, 48: 271-284.

**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. *Journal of Parasitology*, 63:1001-1006.

**Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ (2005)**, Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:5491-5497.

**Raccurt CP (1999)**, Dirofilariasis, an emerging and underestimated zoonoses in France. *Medecine Tropicale*, 59:389-400.

**Rahmah N, Supali T, Shenoy RK, Lim BH, Kumaraswami V, Anuar AK, Hakim SL, Hayati MI, Chan BT, Suharni M, Ramachandran CP (2001)**, Specificity and sensitivity of a rapid dipstick test (*Brugia* Rapid) in the detection of *Brugia malayi* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95:601- 604.

**Rajan TV (2004)**, Relationship of anti-microbial activity of tetracyclines to their ability to block the L3 to L4 molt of the human filarial parasite *Brugia malayi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71:24-28.

**Remme JH (2004)**, Research for control: the onchocerciasis experience. *Tropical Medicine and International Health*, 9:243-254.

**Richards FO Jr., Boatin B, Sauerbrey M, Seketeli A (2001)**, Control of onchocerciasis today: status and challenges. *Trends in Parasitology*, 17:558-563.

**Saint Andre A, Blackwell NM, Hall LR, Hoerauf A, Brattig NW, Volkmann L, Taylor MJ, Ford L, Hise AG, Lass JH, Diaconu E, Pearlman E (2002)**, The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science*, 8; 295:1892-1895.

**Schnell S & Mendoza C (1997)**, Theoretical description of the polymerase chain reaction. *Journal of Theoretical Biology*, 188:313–318.

**Schottstedt V, Tuma W, Bunger G, Lakenberg P (1997)**, Routine PCR screening for HBV, HCV and HIV-I genome in a large blood donation services--experiences and initial results. *Beiträge zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, 34:21-25.

**Schulz-Key H (1988)**, The collagenase technique: how to isolate and examine adult *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug effects. *Tropical Medicine and Parasitology*, 39:423-440.

**Shenoy RK, Suma TK, John A, Arun SR, Kumaraswami V, Fleckenstein LL, Na-Bangchang K (2002)**, The pharmacokinetics, safety and tolerability of the co-administration of diethylcarbamazine and albendazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96:603-614.

**Singh B (1997)**, Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal of Parasitology*, 27:1135-1145.

**Soeyoko SS (1993)**, The use of monoclonal antibodies in the detection of circulating antigens in Malayan filariasis. *The Southeast asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 24:23-25.

**Stingl P & Büttner DW (2000)**, Onchozerkose. In: Lang W & Löscher T: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 181-189.

**Sukpanichnant S, Leenuttapong V, Dejsomritrutai W, Thakerngpol K,**

**Wanachiwanawin W, Kachintorn U, Nitiyanant W (1998)**, Pulmonary dirofilariasis in a patient with multisystem Langerhans cell histiocytosis--the first reported case in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 81:722-727.

**Supali T, Wibowo H, Ruckert P, Fischer K, Ismid IS, Purnomo, Djuardi Y, Fischer P (2002)**, High prevalence of *Brugia timori* infection in the highland of Alor Island, Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66:560-565.

**Tawill SA, Kipp W, Lucius R, Gallin M, Erttmann KD, Büttner DW (1995)**, Immunodiagnostic studies on *Onchocerca volvulus* and *Mansonella perstans* infections using a recombinant 33 kDa *O. volvulus* protein (Ov 33). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89:51-54.

**Taylor MJ (2002)**, *Wolbachia* endosymbiotic bacteria of filarial nematodes. A new insight into disease pathogenesis and control. *Archives of Medical Research*, 33: 422-424.

**Taylor MJ & Hoerauf A (1999)**, *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology Today*, 15:437-442.

**TDR (1992)**, Methods for community diagnosis of onchocerciasis to guide ivermectin based control in Africa. TDR/ TDE/ Oncho/ 92.2.

**Toe L, Boatn BA, Adjami A, Back C, Merriweather A, Unnasch TR (1998)**, Detection of *Onchocerca volvulus* infection by O-150 polymerase chain reaction analysis of skin scratches. *The Journal of Infectious Diseases*, 178:282-285.

**Toe L, Adjami AG, Boatn BA, Back C, Alley ES, Dembele N, Brika PG, Pearlman E, Unnasch TR (2000)**, Topical application of diethylcarbamazine to detect onchocerciasis recrudescence in west Africa. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 94:519-525.

**Urabe N, Kageyama Y, Chiba A, Eguchi M (2001)**, Two surgical cases of pulmonary dirofilariasis. *Kyobu Geka*, 54:1145-1147.

**Vasuki V, Hoti SL, Sadanandane C, Jambulingam P (2003)**, A simple and rapid DNA extraction method for the detection of *Wuchereria bancrofti* infection in the vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* by Ssp I PCR assay. *Acta Tropica*, 86:109-114.

**Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM (2004)**, Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR, *Journal of Clinical Microbiology* 42:1220-1223.

**Vincent JA, Lustigman S, Zhang S, Weil GJ (2000)**, A comparison of newer tests for the diagnosis of onchocerciasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94:253-258.

**Von Harnack GA & Koletzko B (1996)**, *Kinderheilkunde*, Springer-Verlag, Berlin, 10. Auflage.

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

**Weil GJ, Steel C, Liftis F, Li BW, Mearns G, Lobos E, Nutman TB (2000)**, A rapid-format antibody card test for diagnosis of onchocerciasis. *The Journal of Infectious Diseases* 182:1796-1799.

**White GB (1989)**, Lymphatic filariasis. In: World Health Organization, WHO/ VBC/ 89.967:23-34.

**Williams SA, DeSimone SM, McReynolds LA (1988)**, Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 28:163-169.

**Williams SA, Nicolas L, Lizotte-Waniewski M, Plichart C, Luquiaud P, Nguyen LN, Moulia-Pelat JP (1996)**, A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 90:384-387.

**Williams SA, Laney SJ, Bierwert LA, Saunders LJ, Boakye DA, Fischer P, Goodman D, Helmy H, Hoti SL, Vasuki V, Lammie PJ, Plichart C, Ramzy RM, Ottesen EA (2002),** Development and standardization of a rapid, PCR-based method for the detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes, for xenomonitoring the human prevalence of bancroftian filariasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96:241-246.

**World Health Organization (1987),** WHO Expert Committee on Onchocerciasis. World Health Organization Technical Report Series, 752:1-167.

**World Health Organization (1989),** Guidelines on sterilization and disinfection methods effective against human immunodeficiency virus (HIV). World Health Organization AIDS Series 2, 2<sup>nd</sup> ed.:1-11.

**World Health Organization (1992),** Lymphatic filariasis: the disease and its control. World Health Organization Technical Report Series, 821:1-71.

**World Health Organization (1995),** Onchocerciasis and its control. World Health Organisation Technical Report Series, 852:1-103.

**World Health Organization (1997),** Bench aids for the diagnosis of filarial infections. World Health Organization, Geneva.

**World Health Organization (2001),** Certification of elimination of human onchocerciasis: criteria and procedures. WHO/ CDS/ CPE/CEE/ 2001.18a.

**World Health Organization (2002),** Annual report on lymphatic filariasis 2001. WHO/ CDS/ CPE/ CEE/ 2002:28:1-76.

**Wockel W, Eckert J, Loscher T, Haussinger K, Morresi A (1993),** Autochthonous European dirofilariasis of the lung. *Pneumologie*, 47:227-231.

**Xie H, Bain O, Williams SA (1994a),** Molecular phylogenetic studies on *Brugia filariae* using HhaI repeat sequences. *Parasite*, 1:255-260.

**Xie H, Bain O, Williams SA (1994b)**, Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite*, 1, 141-151.

**Yameogo L, Toe L, Hougard JM, Boatin BA, Unnasch TR (1999)**, Pool screen polymerase chain reaction for estimating the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium damnosum* sensu lato: results of a field trial in an area subject to successful vector control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60:124-128.

**Zhang S, Li BW, Weil G (2000)**, Paper chromatographic hybridization: rapid method for detection of *Onchocerca volvulus* DNA by PCR. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63:85-89.

**Zimmerman PA, Toe L, Unnasch TR (1993)**, Design of *Onchocerca* DNA probes based upon analysis of a repeated sequence family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58:259-268.

**Zimmerman PA, Guderian RH, Aruajo E, Elson L, Phadke P, Kubofcik J, Nutman TB (1994)**, Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. *The Journal of Infectious Diseases* 169: 686-689.

## **7. Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit kräftig mit Taten, Anregungen, aufmunternden Worten und Hinweisen unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn PD Dr. Fischer, der mir das Thema anvertraute, mich die nötigen experimentellen Techniken lehrte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Für das Korrekturlesen und hilfreiche Ratschläge danke ich Herrn Professor Büttner.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Fleischer, da ich am Bernhard-Nocht-Institut meine Untersuchungen durchführen und die hervorragende technische Ausrüstung nutzen durfte und ich danke Herrn Professor Dr. Tannich dafür, dass er meine Vertretung vor dem Fachbereich übernahm.

Frau Bonow, der MTA der Laborgruppe Fischer, danke ich dafür, dass sie mich die Grundlagen der Laborarbeit und diverse experimentelle Techniken lehrte und mich stets durch motivierende Ratschläge unterstützte.

Frau Dr. Klüber und Frau Wagner, meinen „Mit-Doktorandinnen“ danke ich für die gute Zusammenarbeit, den regen Ideenaustausch und die freundschaftliche Unterstützung.

Ich danke all den anderen Mitarbeitern des BNI, wie denen von der AG Clos, der AG Erttmann und der AG Brattig, mit denen stets ein reger Ideenaustausch bestand. Für die Statistik betreffende Ratschläge danke ich Herrn PD Dr. May.

Insbesondere danke ich meinem alten Freund dem Diplom-Biologen Herrn Bebermeier für fördernde Ratschläge und das Korrekturlesen der Arbeit, wofür auch meinem Vater erheblicher Dank gebührt.

Im Übrigen gebührt all denen Dank, die mich motivierten und mir damit die Kraft gaben, meine Arbeit durchzuführen; wie meiner Familie, meiner Freundin und meinem Freundeskreis.

## **8. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Pischke  
Vorname: Sven  
Geburtsdatum/ -ort: 27.9.1976, Hamburg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schulbildung**

08/ 1983-06/ 1987 Grundschole Molkenbuhrstraße in Hamburg  
08/ 1987-06/ 1996 Albrecht-Thaer-Gymnasium in Hamburg  
06/ 1996 Abitur

### **Zivildienst**

09/ 1996-09/ 1997 Deutsches Rotes Kreuz, Hamburg Altona

### **Medizinstudium und ärztliche Tätigkeit**

10/ 1997-09/ 1999 Vorklinisches Studium, Universität Hamburg  
Pflegepraktika: AK Altona, Bernhard-Nocht-Institut  
09/ 1999 Physikum  
10/ 1999-09/ 2002 Klinisches Studium, Universität Hamburg  
Famulaturen: Chirurgie (Prof. DeHeer, Krankenhaus Elim), Tropenmedizin (Prof. Dietrich, Bernhard-Nocht-Institut), Tropenmedizin/ Allgemeinmedizin (Praxis Dr. Meyer), Sonographie (Frau Dr. Guthoff, UKE), Labormedizin im Rahmen der Promotion (PD Dr. Fischer, Bernhard-Nocht-Institut), Tropenmedizin (Dr. Kretschmar, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen)  
09/ 2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/ 2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/ 2002-09/ 2003 Praktisches Jahr: Chirurgie (PD Dr. Dörner, Diakoniekrankenhaus Alten Eichen, 10/ 2002-02/ 2003), Pädiatrie (Prof. Riedel, Kinderkrankenhaus Altona, 02/ 2003-06/ 2003), Innere Medizin (Prof. Hagenmüller, AK Altona, 06/ 2003-09/ 2003)  
11/ 2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
12/ 2003-02/ 2004 Schreiben der Doktorarbeit, Fortbildung  
03/ 2004-11/ 2004 Anstellung im Forschungszentrum Borstel, bis Dezember abgeordnet im Rahmen der Capnetz-Studie an die Uniklinik Lübeck  
12/ 2004-08/ 2005 Stationsarzt in Borstel  
09/ 2005-11/ 2005 Fertigstellung der Promotionsschrift, Fortbildung  
12/ 2005 Anstellung an der MHH, Abteilung für Gastroenterologie als Stationsarzt

## Veröffentlichungen

**Pischke S, Büttner DW, Liebau E, 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. Tropical Medicine and International Health, 7: 526-531

**Fischer P, Wibowo H, Pischke S, Rückert P, Liebau E, Ismid IS, Supali T (2002)**, PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology; 96:809-821.

## Kongressteilnahmen/ Abstract-Titel

**Fischer P, Klüber S, Pischke S, Bonow I und Supali T (2001)**, PCR-based diagnosis of lymphatic filariasis and onchocerciasis by PCR-ELISA and DNA Detection Test Strips. September 2001, Conference on Filariasis, Hamburg.

**Pischke S, Klüber S, Supali T, Rückert P, Bonow I und Fischer P (2002)**, Detection of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia by PCR. März 2002, International Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology, Lübeck

## 9. Anhang

**Abb. A1**

51-25_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
52-26_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
8-13Bt_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	AACGCAA
6-8Bt_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATGTTTAACTATAAAAATAC	AACGCAA
10-16_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
12-22Bt_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
4717_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAACAC	TACGCAA
53-27_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
4616_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAACAT	AACGCAA
50-23_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
4-5Bt_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
BM3_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
9-15_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
4818_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAACAC	AACGCAA
4922_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
BM1_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
5-6Bt_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTANNNTTTAACTATAAATAC	AACGCAA
BM4_	1	GCGCAAACTTAATTACAAAAGCGTATTTTANNNTTTAACTATAAATAC	AACGCAA
11-21Bt_	1	GCGCAANCTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
3-2Bt_	1	GCGCAANCTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	NACNCA
7-12Bt_	1	GCGCAANCTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	NACGCAA
1941_	1	GCGCAANCTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
17-36Bt_	1	GCGCAANCTTAATTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACGCAA
18-38_	1	GCGCATACCTTANTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAAACTATAAAAATGAC	GACTCAA
BM2_	1	GCGCANACTTANTTACAAAAGCGTATTTTAATATTTAACTATAAAAATGAC	NACNCA

51-25_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
52-26_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
8-13Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
6-8Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
10-16_	59	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
12-22Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
4717_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
53-27_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
4616_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
50-23_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
4-5Bt_	59	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
BM3_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
9-15_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
4818_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
4922_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
BM1_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
5-6Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
BM4_	58	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
11-21Bt_	58	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
3-2Bt_	58	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
7-12Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
1941_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
17-36Bt_	60	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
18-38_	59	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	
BM2_	59	TATACGACCAGCACTGGTACAATTCACGTAACATAGTCAATTAATTTCAAATAAGCT	

Fortsetzung nächste Seite

**Abb. A1**

51-25_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
52-26_	118	TTTTTA	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTAAAATTGATAAA	TTGAACCAATATTC
8-13Bt_	118	TTT---	AGCAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAAATTGATAAA	TTGAACCAATTTTC
6-8Bt_	118	TTTTTC	AGCAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAAATTGATTAA	TTGAACCAATTTTC
10-16_	117	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
12-22Bt_	118	TTTTTT	AGCAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
4717_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
53-27_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
4616_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTAAAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
50-23_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTAAAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
4-5Bt_	117	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
BM3_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
9-15_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTAAAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
4818_	117	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAACCTAGAGTTAAAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
4922_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAA-----ATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
BM1_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATAAAAATTGATAAT	TTAAAACCTATTTTC
5-6Bt_	118	TTT---	AGCAGTTTTGGCACTTAATTAAAATTGAAATTGATAAA	TTGAACCAATTTTC
BM4_	117	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCACTTAATTAAAATAAAAATTGATAAT	TTAAAACCTATTTTC
11-21Bt_	116	TTTTTT	AGTAGNTTTGGCCTTAATTAAAATNNGAATTGATAAA	TTANAACCAATTTTC
3-2Bt_	116	TTTTT-	AGTAGTTTGGCACTTAATTAAAATTANAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
7-12Bt_	119	TTTTT-	GGTAGNNTGGCTCTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TTAGAACCAATTTTC
1941_	118	TTTTTT	AGTAGTTTTGGCNCCTTATTAAAATTGAATTGATANNA	TTACAACCAATTTTC
17-36Bt_	118	TTTNTT	AGTAGTNNNCGNNCTTAAATANANNNTANANTTGATNAG	NTACNACNNNTNTN
18-38_	116	NTTNT-	ANCAGTNTGGCACTTAATTAAAATTGAATTGATAAA	TNAGANCCANTTTTC
BM2_	119	TTTTNT	ACGGTTTTGGCACTTNNNTTAAATTCNGATNGATANA	TTANANCCAATTAC

51-25_	176	CTTGTCTA	TGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATTCAAAA	CTTAA
52-26_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATCAAAA	CTTAA
8-13Bt_	173	CTTGTCTA	CTGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	TTTAA
6-8Bt_	176	CTTGTCTA	AGGTAAGAAAAC	ATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAA	TATTAA
10-16_	175	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATTCAAA	CTTAA
12-22Bt_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATTCAAA	CTTGA
4717_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATTCAAA	CTTAA
53-27_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
4616_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
50-23_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
4-5Bt_	175	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
BM3_	176	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
9-15_	176	CA	TGTCTAATGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
4818_	175	CTTGTCTA	AAATGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
4922_	170	CTTGTCTA	ATGTAAGAAAAC	TACAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
BM1_	177	CTTGTCTA	ATAAGAAAN	CTATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
5-6Bt_	173	CTTGN	CTAATGTAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	TTTAA
BM4_	176	CTTGTCTA	ATAAGAAAAC	TATAACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
11-21Bt_	174	CTTGC	CTAATGNCTTAAAAC	TNCAACAAATTTTAAAATTTTAA	TAAATTCNTAA	CTTAA
3-2Bt_	173	CTTGTNTA	ATGTNAGAAAAC	TATANCANATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
7-12Bt_	176	CTTG-	CTAATGTAA	AAAAACTANCACAAATTTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
1941_	177	CTTGN	CCAATGAAAN	AAAAACTATANCAANTNNNTANAA	TTTTTAAANAATTCAAA	-----
17-36Bt_	176	CTN	GCTNATGNAAGANN	ACTACAACANNTTTAAANN	TTTTTAAATGAN	TTCAAAA
18-38_	173	CTTGN	GTAANGTAAGAA	NNCTATNCAAAANNTTAAAATTTTAA	AAAAATTCAAA	-----
BM2_	177	CTTGTCTA	ATGTAAN	AAAAACTACCACANATTTNAAAATTTTAA	ACAANTC	NNAA

Fortsetzung nächste Seite

**Abb. A1**

51-25_	236	ATTTGAA	TTTAAATATAAATTTAACTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAC
52-26_	236	ATTTGAA	TTTAAATTTAATTTAACTTCTTAAATTGAATTCAAATCATGATTAATTGAAAG
8-13Bt_	233	ATTTGTA	TTTAAATTTAATTTAACTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
6-8Bt_	236	ATTTGTA	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATCGAAAG
10-16_	235	ATTTGAA	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCAAGATTAATTGAAAG
12-22Bt_	236	ATTTGAA	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
4717_	236	ATTTGAA	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
53-27_	231	-----	TTTAAATGTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
4616_	231	-----	TTTAAATGTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
50-23_	231	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAATCATGATTAATTGAAAG
4-5Bt_	221	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGAAATAATTGAAAG
BM3_	222	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGAAATAATTGAAAG
9-15_	222	-----	TTTAAATGTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
4818_	221	-----	TTTAAATTTAATTTAACTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
4922_	225	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATCAAATCATGATTAATTGAAAG
BM1_	232	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
5-6Bt_	233	ATTCGTA	TTTAAATTTAATTTAACTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
BM4_	231	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
11-21Bt_	234	ATTTGAN	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
3-2Bt_	219	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
7-12Bt_	221	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
1941_	232	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
17-36Bt_	236	ATNTGCA	TTTAAATTTAATTTAACTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
18-38_	219	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG
BM2_	232	-----	TTTAAATTTAATTTAAATTTCTTAAATTGAATTAAAATCATGATTAATTGAAAG

51-25_	296	TTTTAATAGTTTTGCTGATGAATTTAT	323
52-26_	296	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	323
8-13Bt_	293	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	320
6-8Bt_	296	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	323
10-16_	295	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	322
12-22Bt_	296	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	323
4717_	296	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	323
53-27_	284	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	311
4616_	284	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	311
50-23_	284	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	311
4-5Bt_	274	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	301
BM3_	275	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	302
9-15_	275	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	302
4818_	274	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	301
4922_	278	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	305
BM1_	285	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	312
5-6Bt_	293	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	320
BM4_	284	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	311
11-21Bt_	294	TTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	321
3-2Bt_	272	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	299
7-12Bt_	274	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	301
1941_	285	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	312
17-36Bt_	296	TTTATTAATTTGNNNTGANGAATTTAT	322
18-38_	272	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	299
BM2_	286	TTTTATTAATTTTGCTGATGAATTTAT	313

**Abb. A1:** Unterschiedlich lange Versionen des HhaI-Repeats, 4 von *B. malayi* (BM1-4), 21 von *B. timori*, bei denen ein Längenpolymorphismus zwischen 299 und 323 Basenpaaren schwankt. Bei diesen Versionen ist zwar keine „lange“, ungefähr 320 Basenpaare lange *B. malayi*-Version zu sehen. Doch um die Aussage zu treffen, diese Version des HhaI-Repeat sei somit bei *B. malayi* seltener als bei *B. timori* ist die Stichprobe zu gering.

```

B.M._ 1 GCGCATAAAATTC--ATCAGCAAA--ATTAAT--AA--A--ACTTCCA-----AT-
62-15_ 1 GCGCATAAAATTC--ATCAGCAATTTATTGAT--AT--ATAGCTACATGTCCCCTGATA
58-9_ 1 GCGCATAAAATTC--ATCAGCACA--TAGGT--AA--CTGGTCCCTGCTGTGAGCCA
60-13_ 1 GCGCATAAAATTC--NTCAGCATA--TTNCA--AT--C--ACTTGGAGGCA-TAAACTA
61-14_ 1 GCGCATAAAATTC--ATCAGCCGA-----GAC--AG--CATTTTCCTTGAACCAACT
20_ 1 -GGCTANATNGTGAATCGACACCTTATAGANGCAAGCTNGANCNGCNGNAGNATGATN

B.M._ 40 TAATCATGATT----TTAATT--CAATTTAA-GAATTTAAATTAAATTTAAATTT-----
62-15_ 53 TACCCATGAACG-ACTGAGGG--TCACTTCT-TTATTTCTCTACTGCTGTTTCT-----
58-9_ 50 NACTTTTGTNGT-ACGCCAG--ACTATAAN-GAAGACANATATCCTGACTGCCT-----
60-13_ 48 ATTTGAGTACT-TGTCAGTGTCTACTCTTATAGAAACAATTTTATGCTAGTTAT-----
61-14_ 48 TAAGCAGAAACTTACTGCCAGA-CATAGTGTGGGGTTGCAATTGACAGAATTTATAAAAA
20_ 60 GANNTCTGNAGAATTCGNCTTATGCGCNGAAGCATNCCGATNNCCGCTTTGACCGCC--

B.M._ 88 TGNATTTTTAAAAATTT-TAAA----ATTTGTTATAGNTTCTTATATTA-GACAAGGAA
62-15_ 104 AGGCTATCTTAGAACTG-TA-----ATCTGCAGGGAAATTCCCTATGCTCTGAAATGTC
58-9_ 101 GGGAGGACTGTACAGNGT-ANNNG---ANNCCCTTGAGAGATGGCTCTGTCTCTGACGAGACA
60-13_ 102 CATTCTTGTGTATAATTA-AAGAAC-ATGCCCCGAGAACCTTTAATTTTTTGCATAAACG
61-14_ 107 GGGCTTTCAGTCATATAG-TAGAAAAATACCTTCAACCCCATTTTATAAAGSATAAGACA
20_ 118 AACCGNCCCTANANCTGCTAAATCCAANTNCNCCNCNCANAAGCCNTCTAATCAACA

B.M._ 143 ATAGCTTTTAAATATCAATTTTAT-TTTAAATA----ACTGCCAAAACACTATAAAAA
62-15_ 158 TAAGATCTGCCCTTATTAAATGCTACATTTTCATC---AAACTTAAAAATTAGGCACAG
58-9_ 157 GGAAATGGCTACGCTGGGACATAACAAAGGAGCTG---ATTNCCAAAAGGACCNCATTG
60-13_ 160 TTTTATATGCAGTATTACATACATACAGTANCATCCGCAAATGCTAAGCCTACAGCTGAT
61-14_ 166 AATCCTGTCAATTGCCAGGTCTCATATTTGATCCTTTGAAAAGGTAGAGGCATTACATTA
20_ 178 ACNCCGGNMCNTTGCNNGGAGGCTCTGNCGCNTTNTAGCACCGGGCTATCTNGACAAC

B.M._ 198 AAGCTTATTTTGAAA-TTAATTGACTATGTTACGTGAATGTACCAGTCTGGTCTGATA
62-15_ 214 GTTCTTAGTITTTAAA-AAAACAAA-CAAACATTGCACCATT--AGGAACTTCTGTACTTTA
58-9_ 213 GGCAGTCCCAGGACAGNTGACAGACTCCATCNAAGCTTGAAGATCANAGACNAGGCTTGA
60-13_ 220 GAATTTATGCGC-----
61-14_ 226 AATCCTGATTTG----GTGAAGCATTTCCTCAGAGAAGATGATGCCATTTACCCATCAT
20_ 238 GANCGACTTATNTACTGNNGCNGGCTGNGAGTTTNCNGGGCCTACCTTTTGAGTATT

B.M._ 257 TTGCCTCGTCATTTTITAGTTTAAATATTTAAAATACCTTTGTAAATTAAGTTTTGCGC-
62-15_ 271 AATATGCCATTGTGTTTGAAAAATCATCTTCATTGTCTTGTCTAATAAATTGGTTCCAA
58-9_ 273 AAACAICTACTGAAATAAATCTTANTTGCCATGANGGAGGTCTTGAATTTNGNGGGTGCC
60-13_ -----
61-14_ 282 TAATATGGCATGTTTCTGAAATGTTTCTAGTGACAATGATGGATTTAAGTTTATCCAA
20_ 298 GCNTGTNCCGTCTNNTCCAGAGCTGTTTNNNCCTNCAAGACTTGTGGAGCCCCGNNGGG

```

**Abb. A2: Alignment der Sequenzen der kreuzreaktiven PCR-Produkte, die im Rahmen der Sputumdiagnostik auftraten.**

Die Ähnlichkeiten am Sequenzanfang führten zur kreuzreaktiven Amplifikation mittels DNAzymeII-Polymerase. Es folgen die wahrscheinlichen Ergebnisse der NCBI-Blast-Sequenz-Bestimmung.

**B.M.**= *B. malayi*-HhaI-Repeat (dasselbe wie für *B. timori*, s.o.),

**62-15**= menschliche DNA, Chromosom 8q23 (vgl. NCBI-Signatur gi15216352/dbj/AP003787.2, Identities 623/643 (96%)),

**58-9**= Ähnlichkeit mit menschlicher DNA, HLA-B (gi/11125670/emb/AJ300181.1),

**60-13**= Ähnlichkeit mit mehreren menschlichen Sequenzen u.a. dem Chromosom 7  
(gi/9052126/gb/AC009541.16),

**61-14**= Ähnlichkeit mit diverser menschlicher DNA (z. B.: i/16303417/gbAC091903.2),

**20**= *Mycobacterium ulcerans* AluI, keine exakte Übereinstimmung, also u. U. eine Variante  
(gi/1293538/gb/U38540.1).

## **10. Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Hamburg, den 14.11.2005