

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und
Krankenhaushygiene

Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Andreas Podbielski

Titel der Arbeit: Nachweis von *Tropheryma whipplei* – Vergleich von
einem kommerziellen mit zwei in-house PCR-Verfahren als
Testverfahren ohne Goldstandard

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Gaumert geb. Hanke, Miriam Estella
aus Herdecke

Rostock, 2019

Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski, Universität Rostock,
Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Micha Löbermann, Universität Rostock,
Institut für Tropenmedizin

PD Dr. med. Sven Poppert, Basel,
Schweizerisches Tropen- und Public Health Institut

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2023

Inhalt	
Zusammenfassung	4
1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Abbildungsverzeichnis	7
3. Tabellenverzeichnis	8
4. Einleitung	9
4.1. <i>Tropheryma whipplei</i> (<i>T. whipplei</i>)	9
4.2. Morbus whipple (M. Whipple)	10
4.4. Epidemiologie und Prävalenz von <i>T. whipplei</i>	11
4.5. Diagnostik von M. Whipple	12
4.6. Zielsetzung	14
5. Material und Methoden	15
5.1 Materialien	15
5.1.1. Chemikalien	15
5.1.2. Weitere Materialien	15
5.1.3. Laborgeräte	15
5.1.4. Software	16
5.2. Grundlagen	16
5.3. Patientenkollektive	16
5.4. Ethische Freigabe	17
5.5. real-time PCR Prinzip	17
5.6. DNA Aufreinigung	20
5.7. Positivkontrollen	22
5.8. PCR Ansätze	24
5.8.1. PCR 1: <i>rpoB</i> Gen	24
5.8.2. PCR 2: <i>Dig 15</i> Gen	25
5.8.3. PCR 3: Tib MolBiol	27
5.9. Statistische Methoden	29
5.9.1. Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnung	29
5.9.2 Auswertung der Ct-Werte	32

6. Ergebnisse	33
6.1. Technische Sensitivitätsgrenzen.....	33
6.2. Sensitivität und Spezifität der PCR Plattformen	34
6.3. Übereinstimmung und Diskrepanzen der Testsysteme	35
6.4. Ct-Wert Bereiche.....	36
6.5. Besiedlungsprävalenz für <i>T. whipplei</i>	37
7. Diskussion.....	39
7.1. Auswertung der Nachweisgrenze (technische Sensitivitätsgrenze)	39
7.2. Auswertung der Ct-Werte.....	40
7.3. Auswertung von Sensitivität und Spezifität.....	41
7.4. Zielsequenzen, Möglichkeit und Grenzen der Analytik	43
7.5. Praktische Anwendung der PCR-Systeme	44
7.6. Limitationen der Studie	45
7.7. Prävalenzanalyse	46
7.8. Ausblick.....	48
7.9. Fazit	48
8. Literaturverzeichnis	49
9. Danksagung	55
10. Thesenblatt.....	56

Zusammenfassung

Einleitung: *Tropheryma whipplei*, der Erreger des Morbus Whipple, wurde bisher insbesondere in Stuhlproben asymptomatischer Träger nachgewiesen. Die Besiedlungsprävalenzen des Darmes der Betroffenen waren in Europa signifikant geringer als in tropischen Gebieten. Dabei fußen diese Ergebnisse auf Stuhluntersuchungen mit verschiedenen PCR-Verfahren, wobei deren diagnostische Zuverlässigkeit nicht geprüft wurde. Diesem Manko sollte mit der vorliegenden Studie begegnet werden. Hier wurden die Leistungsparameter von zwei in-house PCR-Verfahren mit einem kommerziellen System verglichen.

Methode: Als Untersuchungskollektive wurden zwei Personengruppen mit erfahrungsgemäß unterschiedlich hohen Prävalenzen für einen *T. whipplei* Trägerstatus gewählt. Das erste Kollektiv bestand aus 300 Proben von Kindern der einheimischen Bevölkerung Westafrikas, das zweite Kollektiv beinhaltete 300 deutsche Soldaten und Polizisten, welche aus tropischen Einsatzgebieten wiederkehrten. Das Untersuchungsmaterial waren Stuhlproben, woraus für vor dieser Studie durchgeführte diagnostische Untersuchungen Nukleinsäuren extrahiert worden waren. Bisher waren diese Patientenproben nicht auf das Vorhandensein von *T. whipplei* getestet. Jede Probe wurde mit den drei PCR-Systemen getestet und die im Nachweisfall jeweils ermittelten Ct (Cycling-Threshold) -Werte wurden miteinander verglichen. Dabei konnte weder eines der Testsysteme noch die Messung mit einer anderen Methode als Goldstandard betrachtet werden.

Ergebnisse: Basierend auf mathematischen Berechnungen wurde eine gute Übereinstimmung (κ 0,67 (95% Konfidenzintervall 0,60;0,73)) der mit den PCR-Systemen ermittelten Ergebnisse gezeigt. Diskordante Ergebnisse wurden am ehesten für hohe Ct-Werte, das heißt geringe Mengen an Ziel-DNA, gefunden. Auf der Basis der Messergebnisse wurde eine *T. whipplei*-Besiedlungsprävalenz der westafrikanischen Testpersonen von 28,3% und der deutschen Soldaten und Polizisten von 5,0% erhoben.

Fazit: Trotz der beobachteten Unterschiede bei den diagnostischen Leistungsdaten können PCR-basierte Screeningverfahren für *T. whipplei* in Punktprävalenz- und Surveillancestudien verwendet werden. Sofern die Sensitivität und Spezifität für das Testverfahren bekannt sind, können die Testergebnisse durch genauigkeitsbereinigende mathematische Methoden korrigiert werden. Für die Untersuchung einzelner Testpersonen lassen sich solche Verfahren nicht anwenden, so dass hier mindestens Messungen mit zwei verschiedenen Verfahren genutzt werden sollten.

1. Abkürzungsverzeichnis

BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bp	Basenpaare
Cfu	coloning forming units
Ct	Cycle-Threshold
g	Gravitation
HEL	Menschliche Fibroblasten Zelllinie
i.v.	intravenös
KI	Konfidenzintervall
Min	Minute
M. Whipple	Morbus Whipple
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase chain reaction
PCR 1	PCR von Moter et al., 2013
PCR 2.1	Fenollar et al., 2008a: mit Tw27 und Tw182 als Primerbezeichnungen
PCR 2.2	Fenollar et al., 2008a: mit Tw13 und Tw163 als Primerbezeichnungen
PCR 3	Kommerzielle PCR von Tib MolBiol
PhHV	Phocines Herpes Virus
p.o.	per os
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
Sek	Sekunde
T _m	Schmelztemperatur
<i>T. whipplei</i>	<i>Tropheryma whipplei</i>

2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: EXEMPLARISCHES TEMPERATURPROFIL EINER PCR-REAKTION MIT DENATURIERUNG, ANNEALING UND ELONGATION	18
ABBILDUNG 2: PCR 2.1 POSITIVKONTROLLPLASMID-VERDÜNNUNGSREIHE, $10^6 - 10^0$ KOPIEN, EXPONENTIELLER ANSTIEG BIS 10^2 KOPIEN PRO REAKTIONSANSATZ	27
ABBILDUNG 3: VIERFELDERTAFEL	30
ABBILDUNG 4: BERECHNUNG SENSITIVITÄT (Se) UND SPEZIFITÄT (Sp) NACH HUI UND WALTER, 1980.	30
ABBILDUNG 5: BERECHNUNG VON SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT NACH GART UND BUCK, 1966.	31
ABBILDUNG 6: BERECHNUNG DES FLEISS' KAPPA WERTES	31

3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE DNA AUFREINIGUNG	20
TABELLE 2: PLASMID- UND PRIMERSEQUENZEN DER IN-HOUSE PCR 1 UND PCR 2	23
TABELLE 3: PIPETTIERSCHEMA PCR 1 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN	25
TABELLE 4: PIPETTIERSCHEMA PCR 2.1 / 2.2 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN	26
TABELLE 5: PIPETTIERSCHEMA PCR 3 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN	28
TABELLE 6: SENSITIVITÄTSGRENZEN VON PCR 1 UND PCR 2.	34
TABELLE 7: SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER UNTERSUCHTEN PCR-PLATTFORMEN	34
TABELLE 8: ÜBEREINSTIMMUNGEN POSITIVER ERGEBNISSE IN DER PCR. DARSTELLUNG DER KATEGORIEN. .	35
TABELLE 9: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „SCHWACH POSITIVEN“ PROBEN	36
TABELLE 10: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „POSITIVEN“ PROBEN	36
TABELLE 11: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „STARK POSITIVEN“ PROBEN	37

4. Einleitung

4.1. *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*)

Bei *T. whipplei* handelt es sich um ein anaerobes, taxonomisch formal Gram-positives Stäbchenbakterium, welches 1907 von Georg Hoyt Whipple rein auf der Basis mikroskopischer Präparate entdeckt wurde (Whipple, 1907). Das Bakterium erreicht in etwa eine Größe von $0,2 \times 2,0 \mu\text{m}$ (Dobbins et al., 1967). Seine Bezeichnung setzt sich aus „*troph*“ (griechisch: die Nahrung) und „*eryma*“ (griechisch: die Barriere) zusammen, da es eine Malabsorptionsstörung hervorrufen kann.

Lange Zeit entzog sich *T. whipplei* einer taxonomischen, physiologischen und pathogenetischen Charakterisierung, da es mit konventionellen Methoden nicht kultivierbar war. Erst im Jahr 1991 konnte mit molekularbiologischen Methoden, sprich einer partiellen Sequenzierung seiner 16 S rDNA, gezeigt werden, dass das Bakterium zum Stamm der Actinobakterien gehört (Wilson KH et al., 1991)

Die Kultivierung gelang erst im Jahr 2000 in HEL (human fibroblast cell line) Zellen (Raoult et al., 2000). Das Bakterium konnte aus einer menschlichen Herzklappe isoliert (Raoult et al., 2000) und in 18 Tagen zur Verdoppelung seiner Zellzahl gebracht werden (La Scola et al., 2001). 2003 gelang es das Genom zu sequenzieren. Dabei wurde ein in seinem Gengehalt sekundär reduziertes zirkuläres Genom mit 927.303 bp (Basenpaaren) mit 54 RNA Genen und 4 RNA Polymerasen festgestellt (Bentley SD et al., 2003 Lancet 361: 637-44, Raoult et al., 2003). Dem wahrscheinlich durch Anpassung an eine parasitäre Lebensweise kleinen Genom fehlen einige typische Reaktionswegsenzyme. Zum Beispiel ist kein Thioredoxinweg vorhanden, dieser wird mit dem Pentosephosphatweg kompensiert (Raoult et al., 2003).

Bekannt sind bisher mehr als 70 Genotypen von *T. whipplei* (Rollin et al., 2017), die in vier „highly variable genomic sequences“-Cluster (dt. hoch variable genomische Sequenzen (HGVS)) eingeteilt werden (Li et al., 2008). Die Daten stammen aus verschiedenen Untersuchungen aus den USA (Rollin et al., 2017), Europa (Raoult et al., 2010), Asien (Keita et al., 2015) und Afrika (Keita et al., 2012). Die größte Ähnlichkeit besteht mit den Actinobakterien, jedoch liegt der G+C Gehalt des Genoms mit 47% wesentlich unter den durchschnittlichen 60% der Actinobakterien. Auch ist *T. whipplei* das einzige Bakterium unter den Actinobakterien, dass ein so stark in der Größe reduziertes Genom aufweist (Raoult et al., 2003, Relman et al., 1992).

Bei der Kultivierung konnte eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Form unterschieden werden (La Scola et al., 2001). Die intrazelluläre Form zeichnet sich durch schmale, feingliedrige Bacilli in Vakuolen aus, während die extrazelluläre Form bevorzugt in Aggregaten vorliegt (La Scola et al., 2001). Ebenfalls wurde für die intrazelluläre Form in der ersten

Kultivierung sowohl gram-positives als auch gram-negatives Färbeverhalten nachgewiesen (Raoult et al., 2000).

Der natürliche Lebensraum von *T. whipplei* ist bisher noch nicht sicher identifiziert. Eine Infektion von Mäusen mit *T. whipplei* ist bis dahin missglückt (Al Moussawi et al., 2011), ebenso konnte bei einer Untersuchung von 677 Arthropoden im Senegal kein positiver Befund verzeichnet werden (Diatta et al., 2013). Gleiches gilt auch für Affen, bei denen ebenso wenig ein Nachweis gelang (Fenollar et al., 2008b). Ein Nachweis gelang regelhaft nur aus menschlichen Proben, insbesondere Speichel, Stuhl sowie Siedlungsabwasser (Schöniger-Hekele M et al., 2007). Daraus leitet sich der Verdacht ab, der Mensch könnte die ökologische Nische beziehungsweise das Habitat von *T. whipplei* sein.

4.2. Morbus whipple (M. Whipple)

Nur selten verursacht *T. whipplei* die Infektionskrankheit Morbus Whipple, da neben der Anwesenheit des Bakteriums als notwendige Bedingung der Befall von besonders prädisponierten Menschen die hinreichende Bedingung ist.

Typischerweise ist M. Whipple eine Systemerkrankung, welche sowohl akut als auch chronisch in Erscheinung treten kann. Eine lokalisierte chronische Infektion im Bereich eines Organs kommt ebenfalls als Manifestationsform vor.

Die akute Infektionskrankheit zeichnet sich durch Diarrhö, Steatorrhö und Gewichtsverlust aus (Durand et al., 1997; Lagier et al., 2010; Fenollar et al. 2007, von Herbay et al., 1996, Herold, 2017). Weitere Symptome in der chronischen Phase können Polyarthrit, Arthralgie, Anämie, Fieber und ein Befall des zentralen Nervensystems sein (Durand et al., 1997; Lagier et al., 2010, Fenollar et al., 2011, Herold 2017). Lokalisierte Erkrankungen sind in absteigender Häufigkeit Adenopathie, Uveitis, pulmonaler Befall und Endokarditis (Lagier et al., 2010).

Da bis zu 50% der Patienten initial hinsichtlich eines Verdachtes auf rheumatoide Arthritis behandelt werden, wird die Diagnose des M. Whipple häufig erst sehr spät gestellt (Lagier et al., 2010). Zudem kann der Einsatz immunsuppressiver Medikamente im Rahmen der initialen Verdachtsdiagnose einen fulminanten Verlauf der Krankheit begünstigen (Saito et al., 2018).

1952 bestätigte Paulley durch die erste wirksame Therapie mit Antibiotika, sprich ex juvantibus, dass es sich bei der Krankheit M. Whipple um einen bakteriellen Erreger handeln muss (Paulley, 1952). Es existieren unterschiedliche Empfehlungen und Publikationen zur Behandlung von M. whipple mit Antibiotika. Die deutschen Leitlinien der S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple (Hagel et al, 2015) sehen eine tägliche Behandlung mit Ceftriaxon 2 g i.v. (intravenös) über 14 Tage gefolgt von Cotrimoxazol 2 x 960 mg p.o. (per os) über 1 Jahr vor (Hagel et al., 2015, Herold, 2017). Bei einer Unverträglichkeit

gegen Ceftriaxon wird dieses durch Meropenem 3x1 g i.v. ersetzt und Cotrimoxazol durch Doxycyclin 2 x 100 mg p.o. (Hagel et al., 2015).

Alternative Therapiemöglichkeiten wurden in weiteren Veröffentlichungen untersucht und thematisiert. Hierzu gehören Behandlungen mit 14-tägiger intravenöser Gabe von Ceftriaxon, Ceftriaxon und Gentamicin, Amoxicillin und Gentamicin oder Piperacillin/Tazobactam, welche durch eine anschließende orale Behandlung mit Doxycyclin und Hydroxychloroquin fortgesetzt wurden (Lagier et al., 2014). Eine Behandlung mit Sulfamethoxazol in Kombination mit Trimethoprim schien in einer Studie keine Wirkung zu zeigen (Fenollar et al., 2009b).

4.4. Epidemiologie und Prävalenz von *T. whipplei*

In westlichen Industrieländern gehört M. Whipple zu den seltenen Erkrankungen. Die Prävalenz der Erkrankung lag in einer Analyse im Nordwesten Italiens bei 3 von 1.000.000 (Biagi et al., 2015). Die Inzidenz liegt bei kleiner 1:10.000.000 weltweit (von Herbay et al., 1997). In Afrika ist bisher lediglich ein Fall beschrieben worden (Berbich et al., 1967). Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Besiedlungsdichte von *T. whipplei* und der klinischen Ausprägung postuliert. In einer Studie von Fenollar et al. (2008a) konnte eine Besiedlung mit $5,7 * 10^5 \frac{cfu (colony\ forming\ units)}{g (gramm)}$ im Stuhl der erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Fenollar et al., 2008a).

Hinsichtlich asymptomatischer Träger lag die Prävalenz allerdings sehr viel höher, beispielsweise in Europa bei 1-4% (Fenollar et al., 2008 a/b, 2012). Sie kann jedoch auch 12-25% bei Abflusskanalarbeitern, HIV-positiven und Obdachlosen erreichen (Schöniger-Hekele et al., 2007; Fenollar et al., 2008b; García-Álvarez et al., 2016, Keita et al., 2013). 33% der Familienangehörigen von M. Whipple-Patienten in Frankreich wiesen ein positives PCR Ergebnis auf (Fenollar et al., 2012). Die weniger industriell entwickelten Länder erreichen eine höhere Prävalenz. So sind im ländlichen Ghana 27,5% der Kinder im Alter zwischen dem 2 Monat bis zum 15. Lebensjahr nachweislich positiv getestet worden (Vinnemeier et al., 2016). In Gabun erreicht die Kolonisierungsrate sogar bis zu 40% bei Kindern (Ramharter et al., 2014) und im dörflichen Senegal bis zu 44% im Alter zwischen 2 bis 10 Jahren (Fenollar et al., 2009a). Insgesamt hatten 31% der gesunden Bevölkerung des Senegal im Alter zwischen 0 bis 99 Jahren einen positiven PCR-Nachweis von *T. whipplei*, 75% davon bei Kindern unter 4 Jahren (Keita et al., 2011). In einer Studie im süd-ost-asiatischen Laos erreichte die Prävalenz der Kinder im Alter von 4-7 Jahren sogar 63%, bei Kindern unter 4 Jahren lag sie jedoch nur bei 33% (Keita et al., 2015).

Auch bei den asymptomatischen Trägern besteht eine Korrelation zwischen Besiedlungsdichte und der fehlenden Symptomatik, so wurde eine deutlich geringere

Besiedlung mit $7,4 * 10^2 \frac{cfu}{g}$ belegt (Fenollar et al., 2008a). Die hohen Zahlen an asymptomatischen Trägern in den Entwicklungsländern lassen auf eine Beziehung zwischen der Anzahl der Träger und dem hygienischen Standard schließen (Ramharter et al., 2014). Die Haushalte mit niedrigen *T. whipplei* Prävalenzen im ländlichen Senegal unterschieden sich von den Haushalten mit hohen *T. whipplei* Prävalenzen einzig in der Anwesenheit einer Toilette mit deutlicher räumlicher Trennung von der Trinkwassergewinnung beziehungsweise -lagerung (Diatta et al., 2013). Gleichzeitig waren die Wasseruntersuchungen im Senegal alle negativ, weshalb eine Übertragung über diesen Weg unwahrscheinlich ist (Keita et al., 2011, Diatta et al., 2013). Des Weiteren wurden in der Schweiz Kläranlagen auf Besiedlung mit *T. whipplei* untersucht. Dabei konnten in 17 von 46 (37%) Kläranlagen in der Schweiz *T. whipplei* nachgewiesen werden, die 17 positiven Befunde befanden sich alle in landwirtschaftlicher Umgebung (Schöniger-Hekeler et al., 2007). So wird angenommen, dass sich *Tropheryma whipplei* über die fäkal-orale und die oral-orale Übertragung verbreitet (Keita et al., 2011, Diatta et al., 2013, Schneider & Moos, 2015).

Eine Übertragung auf in den Tropen Reisende wurde beschrieben (Gautret et al., 2014). In dieser Untersuchung waren 27% der Reisenden mit Diarrhö heimgekehrt. 3,4 % der Untersuchten mit Diarrhö waren vorher in ihren Stuhlproben negativ auf *T. whipplei* getestet worden und hatten nach der Reise ein positiv PCR Ergebnis (Gautret et al., 2014). Des Weiteren fiel bei den Tropenreisenden in den Senegal eine prophylaktische Wirkung von Doxycyclin auf, welches als Malaria Prophylaxe zuvor verabreicht worden war (Gautret et al., 2014).

4.5. Diagnostik von M. Whipple

Durch den potentiell letalen Verlauf von M. Whipple und die Differentialdiagnose zu einer Reihe von Autoimmunerkrankungen ist eine schnelle und zuverlässige Diagnostik notwendig. In Deutschland sehen die Leitlinien eine Diagnostik unter Einbeziehung der Endoskopie, Histopathologie und ggf. Mikrobiologie vor (Hagel et al., 2015).

Endoskopisch fällt dabei eine gelb verfärbte Mukosa im Duodenum und Jejunum mit Erythemen und ulzerierenden Abschnitten auf (Saito et al., 2018). In anderen Untersuchungen konnten nur gelb-weißliche Belege mit abgeflachten Zotten dargestellt werden (Lagier et al., 2010). Mittels Biopsie aus diesen Abschnitten und Anfärbung mit der PAS (Periodic Acid Schiff) -Färbung ist eine dringende Verdachtsdiagnose möglich (LaScola et al., 2001). In der PAS-Färbung leuchten infizierte Makrophagen rot auf (LaScola et al., 2001). Ebenfalls soll histologisch eine Einteilung in verschiedene Typen von Makrophagen nach von Herbay erfolgen, wobei Typ 1 Makrophagen für die Erkrankung charakteristisch sind (von Herbay et al., 2001). Des Weiteren soll eine Anfärbung in der Ziehl-Neelsen Färbung erfolgen, um einen

Ausschluss von atypischen mykobakteriellen Infektionen vornehmen zu können (Hagel et al., 2015).

Jedoch ist die Methode für ein Screening oder eine Überwachung des Verlaufes sehr invasiv und beeinflusst so die Lebensqualität der Patienten. Zusätzlich kann ein PAS Nachweis immer noch positiv ausfallen, obwohl die Krankheit bereits ausgeheilt ist (Fenollar et al., 2007), denn es kommt hier häufig bei einer erfolgreichen Therapie nur zur Verschiebung des Typs 1 nach von Herbay hin zu Typ 2-4 Makrophagen (Hербay et al., 1996). Deswegen ist es naheliegend, die Ergebnisse durch eine geeignete mikrobiologische Diagnostik zu komplettieren.

Den Grundstein für eine molekulare Diagnostik legten 1992 Relman et al. Die Forschungsgruppe konnte durch Elektronenmikroskopie die 16S-rRNA nachweisen (Relman et al., 1992). Darauf aufbauend wurden konventionelle und real-time PCR („polymerase chain reaction“ = „Polymerasekettenreaktion“) Verfahren für die Diagnostik von *T. whipplei* entwickelt. Dabei liegen die Zielsequenzen unter anderem auf verschiedenen ribosomalen Genabschnitten, darunter die 16S-rRNA (ribosomale RNA) (Maibach und Altwegg, 2003), die 16S-23S rRNA Zwischensequenz (Hinrikson et al., 1999) und in weiteren Genen wie *hsp65* (Sloan et al., 2005), *rpoB* (Moter et al., 2013) und *Dig 15* (Fenollar et al., 2008a).

Die PCR-Tests funktionieren mit verschiedenen Probenarten, beispielsweise Liquor, Blut, Stuhl, Speichel oder Gewebeproben. Unterschiedliche Proben können auch zu unterschiedlichen Ergebnissen bei einem Patienten führen und somit in epidemiologischen Studien die Daten der Gesamtprävalenz beeinflussen. So lassen sich in Abhängigkeit von Stadien der reinen Kolonisierung oder Infektion deutliche Differenzen zwischen Blut- und Stuhlproben (Fenollar et al., 2010) und zwischen Speichel- und Stuhlproben (Fenollar et al., 2008b) aufzeigen. Des Weiteren fiel auf, dass vereinzelt asymptomatische Träger positive Stuhlergebnisse und negative Speichelproben aufwiesen. Waren jedoch die Speichelproben positiv auf *T. whipplei*, so war auch immer die Stuhlprobe positiv (Fenollar et al., 2008a/b). In einer Analyse von febrilen Patienten im Senegal war lediglich 1 von 440 Blutproben positiv (Sokhna et al., 2013), was auf einer tatsächlich geringen Präsenz der Bakterien in diesem Kompartiment oder auf einer in diesem Material geringen Sensitivität des eingesetzten Tests beruhen könnte. Weitere Differenzen fallen bei unterschiedlicher Durchführung und Interpretation der Ergebnisse der PCR auf (Garcia Alvarez et al., 2016).

4.6. Zielsetzung

Im Zuge der Globalisierung ist sowohl mit der Erregerakquise im Rahmen tropischer Reisen als auch mit dem Import der Erreger durch Migration zu rechnen.

Früher waren nur vereinzelt Europäer in den Ländern Afrikas und Südamerika auf Reisen. Durch politische Veränderungen und durch die Sicherheitsentwicklung in den einzelnen Ländern wurden zum Beispiel die Einsatzkräfte von Bundeswehr und internationalen Armeen quantitativ verstärkt. Ebenso haben sich die Länder touristisch weiterentwickelt, weshalb viel mehr Touristen auch diese Länder der Welt bereisen. Durch enge Kontakte zwischen den Reisenden und der Bevölkerung kann es zum Austausch von Krankheiten kommen. In parallele kommt es mit über die Zeit wellenhaften Häufungen zu einer Migration von Einwohnern aus diesen Ländern nach Europa.

Unter dem Einfluss dieser Situation erscheint es sinnvoll die Diagnostik von tropischen Krankheiten in den europäischen Ländern technisch verbessern und einer breiteren Zahl von Anwendern zugänglich zu machen. Dabei eignet sich die PCR als Screeningoption für *T. whipplei*, sowohl in Europa als auch im ressourcenlimitierten tropischen Umfeld. Allerdings sind die verschiedenen PCR-Ansätze der *T. whipplei* Diagnostik bezüglich ihrer Sensitivität, Spezifität, Reliabilität und Robustheit unterschiedlich leistungsstark, was zu diagnostischen Unsicherheiten führen kann und damit die Belastbarkeit von Aussagen der Screeninguntersuchung in Frage stellt.

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Vergleichbarkeit von Ergebnissen häufig angewendeter Verfahren des *T. whipplei*-Nachweises zu prüfen, um dann die Wertigkeit der Prävalenz- und Beobachtungstudien verschiedener Forschungsgruppen zu vergleichen.

Dazu wurden in dieser Studie zwei gut etablierte und häufig verwendete in-house real-time PCR Verfahren (Moter et al., 2013, Fenollar et al., 2008a) mit einem kommerziellen System von Tib MolBiol verglichen, ohne dass dafür ein Goldstandard zur Verfügung stand. Die Verfahren wurden in ihrer Sensitivität und Spezifität zur Detektion asymptomatischer Träger geprüft und bewertet.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1. Chemikalien

- QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Mix (Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland)
- HotStarTaq Master Mix (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- LightMix Modular *T. whipplei* (Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland)
- Roche Master (Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland)
- PhHV Kontrolle (Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland)

5.1.2. Weitere Materialien

- Einmalhandschuhe (Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml / 2 ml (Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen, sterilisiert (Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland)
- Abwurfbehälter für Pipettenspitzen (Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland)
- PCR Tubes 0,2 ml (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- Strip Tubes and Caps 0,1 ml (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- LightCycler Capillaries 20 µl (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

5.1.3. Laborgeräte

- LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland)
- Corbett Rotor Gene 6000 Real-time PCR Maschine (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- Corbett Rotor Gene Q (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland)
- Pipetten 2,5, 10, 20, 200, 1000 µl (Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Vortex Genie 2 (Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland)
- Thermomixer (Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge 5424 (Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge mit Vortexer (Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland)

5.1.4. Software

- Microsoft Office (Word und Excel 2016), Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, USA
- Microsoft Paint, Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, USA

5.2. Grundlagen

Für den Nachweis von *T. whipplei* mittels der real-time PCR wurde aus Stuhlproben extrahierte DNA verwendet. Die DNA wurde für die PCR mit dem Mastermix versetzt. Der Mastermix beinhaltet unter anderem die Taq-Polymerase, Magnesium, die Primer und die Sonden. Zur Kontrolle der PCR hinsichtlich Kontaminationsfreiheit und Leistungsfähigkeit wurden Negativkontrollen und Positivkontrollen mitgeführt. Auf eine interne Kontrolle im Sinne einer Inhibitionskontrolle mit Nichtziel-DNA wurde für die in-house PCRs verzichtet.

Eine Ausnahme hiervon bildete das kommerzielle System. Bei der Tib MolBiol PCR wurde eine Inhibitionskontrolle auf der Basis eines Nukleinsäuretargets des Phocine-Herpesvirus (PhHV) durchgeführt.

Für die in-house PCRs wurden als Positivkontrollen Positivkontrollplasmide (pEX-A128 vector backbone, Eurofins Scientific SE, Luxembourg) synthetisiert. Die Negativkontrollen wurden bei jedem Durchlauf mitgeführt und beinhalteten Wasser mit PCR-Reinheitsgrad.

Um einen Testlauf als auswertbar anzuerkennen, mussten die Positivkontrollen in der PCR immer zu einem messbaren Signal (Fluoreszenz) führen. Im Gegensatz durfte bei den Negativkontrollen niemals ein Signal messbar sein.

5.3. Patientenkollektive

Die Studie wurde als Test-vergleichende Untersuchung gestaltet, in der kein Messverfahren als Goldstandard diente (Hahn et al., 2017, Gart & Buck, 1966; Hui & Walter, 1980). Hierfür standen insgesamt 600 Nukleinsäureextrakte von, bezüglich der Spender, anonymisierten Stuhlproben zur Verfügung, die zwischen 2007 und 2017 für diagnostische Untersuchungen archiviert und bei -80°C eingefroren gelagert wurden.

300 Stuhlproben gehörten zu einem Kollektiv mit erwartungsgemäß niedriger Prävalenz für eine Besiedelung mit *T. whipplei*. Sie wurden von der Abteilung XXI für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg, Außenstelle BNITM, archiviert und von Soldaten und Polizisten abgegeben, die nach Rückkehr von Einsätzen aus tropischen Gebieten routinemäßig eine Stuhlprobe zur Untersuchung eingeschickt hatten

(Frickmann et al., 2013,2016, Hahn et al., 2017). Bei den Proben erfolgte keine weitere Unterteilung in Patienten mit Diarrhö oder symptomlose Patienten.

300 weitere Stuhlproben gehörten zu einem bereits voruntersuchten Kollektiv mit bekannt hoher *T. whipplei* Besiedlungsprävalenz von 27,5% in den frischen Stuhlproben (Vinnemeier et al., 2016, Krumkamp et al.,2015). In den nun genutzten Residualmaterialien, bei denen es sich um andere Proben aus dem gleichen Kollektiv handelte, war die spezifische Prävalenz nicht bekannt. Die Proben wurden in einer ländlichen Region Ghanas bei an Diarrhö erkrankten Kindern sowie bei nicht erkrankten Kindern im Alter zwischen 2 Monaten und 15 Jahren gesammelt und durch das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) in Hamburg zur Verfügung gestellt.

5.4. Ethische Freigabe

Die ethische Freigabe für die anonymisierte Verwendung von Residualmaterialien zu Testevaluationszwecken wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (Registrierungsnummer WF-043/16) erteilt.

5.5. real-time PCR Prinzip

Die Methoden, die in dieser Arbeit verglichen werden, gehörten alle zu den real-time PCR Verfahren. Grundsätzlich bieten real-time-PCR Verfahren die Möglichkeit, die Nukleinsäureamplifikation in Echtzeit darzustellen.

Das Prinzip der PCR beruht auf einem sich wiederholenden Prozess aus temperaturabhängigen chemischen Reaktionszyklen, in dem eine spezifische Ziel-DNA innerhalb eines Zyklus in drei Schritten verdoppelt wird. Die drei Schritte beginnen mit der Denaturierungsphase, während der die Wasserstoffbrückenbindungen einer doppelsträngigen DNA denaturieren und somit die DNA in Einzelstränge aufgespalten wird. Danach folgt die Annealingphase. In der Annealingphase wird der Primer an seine spezifische Bindungsstelle des komplementären Strangs angelagert. In der Elongationsphase wird mit Hilfe der Taq-Polymerase beginnend am 3' Ende des gebundenen Primers entlang der einzelsträngigen Matrix- DNA ein Doppelstrang generiert. In der PCR wird dieser Prozess mit jedem Zyklus wiederholt, so dass es im Idealfall zu im geometrischen Maße wachsenden Mengen der Ziel-DNA kommt (Abbildung 1).

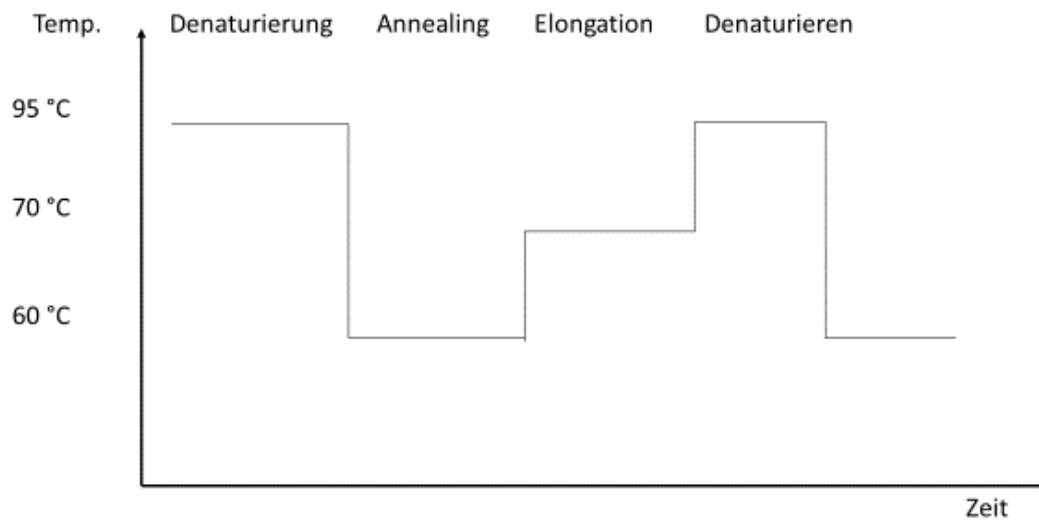


ABBILDUNG 1: EXEMPLARISCHES TEMPERATURPROFIL EINER PCR-REAKTION MIT DENATURIERUNG, ANNEALING UND ELONGATION

Zur Echtzeitüberwachung der wachsenden Ziel-DNA-Mengen dienen Sonden, welche, je nach Anforderung, unterschiedlich konfiguriert sein können.

Eine der häufigsten Varianten ist die **Hydrolisierungssonde** (auch **TaqMan** Sonde genannt). Hierbei besteht die Sonde aus einem Reporter mit einem Fluorophor und einem Quencher. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt die Nähe des Quenchers zum Fluorophor das Strahlen des Reporters. In der Annealingphase der PCR hybridisiert die Sonde an den komplementären DNA Strang. Bei der folgenden Elongation wird die TaqMan Sonde abgebaut und auf diese Art die Fluoreszenz des vom Quencher getrennte, Fluorophor, des Reporters kann nun gemessen werden (Holzapfel und Wickert, 2007).

Die **Molecular Beacon** Methode funktioniert nach dem gleichen Prinzip, jedoch hat hier die Sonde eine Hufeisenform, in der Quencher und Fluorophor direkt beieinander liegen und die Fluoreszenz des Reporters messbar wird, sobald durch die Hybridisierung an die Zielsequenz die Hufeisenform der Sonde aufgelöst wird.

Für die Methode der **dualen Hybridisierungssonden** müssen zwei mit unterschiedlichen Komponenten eines Fluorophors markierte Sonden nah aneinander an den DNA Strang hybridisieren. Dabei kommt die Donor- in eine stabile räumliche Nähe zur Akzeptor-Komponente und das aktive Fluorophor entsteht. Konkret gibt bei Einstrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge die Donor-Komponente Energie an die Akzeptor-Komponente ab, welche dann fluoresziert (Holzapfel und Wickert, 2007).

Bei jeder dieser Methoden nimmt die Fluoreszenz im Testansatz durch den Vervielfachungsvorgang der PCR proportional zur Menge der PCR Produkte zu. Wenn die exponentiell ansteigende Fluoreszenzintensität die Signale des Hintergrundrauschens übertrifft, wird der betreffende Amplifikationszyklus als „Cycling- Threshold“ (Ct) oder „Crossing point“ (Cp) als „Zykluszahl“ abgelesen.

Zur weiteren Sicherung der Spezifität der Amplifikationsprodukte kann beim Verfahren der untersuchten Hybridisierungs sonden eine Schmelzpunktbestimmung der entstandenen DNA-Stränge angeschlossen werden. Hierbei wird die Temperatur am Ende des zyklischen Prozesses von der Mindesttemperatur von in der Regel 40 °C bis zu einer Temperatur von 94 °C langsam gesteigert. Beim Abschmelzen der Hybridisierungssonde und damit dem Übergang in die Einzelstrangform verringert sich die messbare Fluoreszenz. In einer Messkurve dargestellt, führt das zu einem sigmoiden Verlauf beziehungsweise in der ersten Ableitung zu einem scharfen Gipfel. Dabei hängt die Temperaturstabilität des Doppelstrangs von der Komplementarität der Einzelstränge ab – je vollkommener diese ist, umso höher ist die Stabilität. Entsprechend hat ein definiertes Probenmaterial eine typische Schmelztemperatur mit deren Erreichen dann ein weiterer Nachweis der PCR-Produktspezifität geliefert wird (Holzapfel & Wickert, 2007).

An die jeweiligen Sonden sind Fluoreszenz-Farbstoffe unterschiedlicher Bauart gebunden, was mit unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima einhergeht. Für das Fluorophor FAM liegt das Fluoreszenzmaximum zum Beispiel bei 520 nm.

Die Wahl des Farbstoffes hängt zum einen von dem benutzten Gerät und seinen Merkmalen ab und zum anderen davon, ob eine Multiplex-PCR durchgeführt werden soll oder nicht. Hierbei werden verschiedene Primer und Sonden mit jeweils anderen Fluorophoren und damit Fluoreszenzmaxima benutzt und in Parallele gemessen. Für dieses Verfahren ist es wichtig, dass die Fluoreszenzmaxima der Fluorophore weit genug auseinander liegen, damit es nicht zu Überstrahlungen bei den Messungen und damit falsch positiven Messergebnissen kommt.

Um die Abwesenheit von unspezifischen Ziel-DNAs zu dokumentieren, werden Negativ-Kontrollen in jedem Testansatz mitgeführt, die alle Reagenzien mit Ausnahme des Probenmaterials enthalten, und bei denen folglich auch nach sehr vielen Amplifikationszyklen kein Signal messbar sein darf. Entsprechend werden zur Dokumentation, dass die PCR prinzipiell funktionieren kann, sprich alle Reagenzien in erforderlicher Qualität und Menge vorliegen sowie keine störend wirkenden Substanzen enthalten sind, Positivkontrollen mitgeführt, die alle Reagenzien enthalten und denen eine Ziel-DNA in definierter Menge zugesetzt wurde. Um eine PCR-Messung quantitativ, das heißt unter Angabe der detektierten Genkopie / Genome, auswerten zu können, ist typischerweise die simultane Messung eines

in seiner Kopienzahl genau bekannten Referenzgens in einer Verdünnungsreihe im linearen Bereich des PCR-Verfahrens erforderlich.

5.6. DNA Aufreinigung

Die oben beschriebenen Patientenproben aus den Jahren 2007-2017 waren zuvor mithilfe des QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland) nach Herstelleranleitung aufgereinigt worden.

Die Aufreinigung wurde in den für diese Untersuchung zugelassenen Räumen des BNITM gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Vorbereitend wurden die Stuhlproben in 2,0 ml Reagenzgefäßen (Eppendorf Tubes 2,0 ml Reaktionsgefäß, Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland) zur Lyse zellulärer und gegebenenfalls auch makromolekularer Strukturen im Thermomixer (Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland) auf 70 °C vorgewärmt.

Für die weiteren Schritte wurden eine interne Extraktionskontrolle und eine negative Extraktionskontrolle mitgeführt. Die Reaktionsgefäße (Eppendorf Tubes 1,5 ml Reaktionsgefäß, Eppendorf) wurden wie in Tabelle 1 gezeigt mit Proben und / oder Reagenzien befüllt.

TABELLE 1: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE DNA AUFREINIGUNG

	Proben	Negative Extraktionskontrolle (NC)	Interne Extraktionskontrolle (IC)
H ₂ O		200 µl	200µl
Stuhlprobe	180-220 mg		
Puffer ASL (QIamp DNA stool mini kit, Qiagen)	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
Inhibitionskontrolle (PhHV)	10 µl		10 µl

Im Anschluss wurden alle 1,5 ml Reaktionsgefäße mit dem Laborschüttler (Vortex Genie 2, Neolab, 69123 Heidelberg, Deutschland) für 1 Minute (Min) durchmischt. Danach wurden die Proben 5 Min bei 70°C erhitzt, dann wieder 15 Sekunden (Sek) mit dem Laborschüttler durchmischt und 1 Min bei 20.000 x g (Zentrifuge 5424, Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. 1,2 ml des zu diesem Zeitpunkt gegebenenfalls noch trüben Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Das Sediment wurde verworfen.

Im nächsten Schritt wurde die InhibitEX-Tablette des Testgebindes (Qiaamp DNA stool mini kit, Qiagen), die PCR-inhibierende Substanzen bindet beziehungsweise inaktiviert und damit unschädlich macht, zugegeben. Dazu wurden die Tabletten direkt aus der Packung in die Ansätze überführt, um mögliche Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Dann wurde das geschlossene Röhrchen mit dem Laborschüttler geschüttelt bis sich die Tablette auflöste. Im Anschluss wurden die Proben 1 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden sie 6 Min bei 20.000 x g zentrifugiert.

Der neue Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 3 Min bei 20.000 x g bildeten sich zum Teil Ausflockungen an der Oberfläche.

In wieder neue 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäße wurden 15 µl Proteinase K-Lösung vorgelegt und 200 µl des Überstands hinzu pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde der Ansatz wieder 15 Sek mit dem Laborschüttler durchmischt.

Die Proben wurden nun 10 Min bei 70 °C inkubiert und danach kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol wurde erneut durchmischt und kurz zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurde das gesamte Lysat eines Ansatzes auf jeweils eine QIAamp Spin Column gegeben. Diese wurde dann 1 Min bei 20.000 x g zentrifugiert, bei Verbleib von Lysat auf der Säule musste die Zentrifugation wiederholt werden. Die Säule wurde im Anschluss wieder in ein neues Collection-tube gestellt.

Das Filtrat wurde verworfen. 500 µl Puffer AW 1 wurden auf jede Säule pipettiert, welche dann 1 Min bei 20.000 x g zentrifugiert wurden. Erneut wurde die Säule in ein neues Collection-tube gestellt. Das Filtrat wurde verworfen.

Auf die Säule wurden 500 µl Puffer AW 2 pipettiert, für 3 Min bei 20.000 x g zentrifugiert und die Säule in neues Collection-tube gestellt. Das Filtrat wurde verworfen. Die Säule wurde nochmals für 1 Min bei 20.000 x g zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml Reagenzgefäß gestellt. Das alte Collection-tube wurde verworfen.

Im Anschluss wurden 200 µl Puffer AE auf die Säule pipettiert und 1 Min bei RT stehen gelassen. Danach wurde das Ganze wieder 1 Min bei 20.000 x g zentrifugiert und die Säule zuletzt verworfen.

Zum Schluss wurden die 1,5 ml mit Proben-Nr. und Datum gekennzeichnet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

5.7. Positivkontrollen

Die Plasmide mit den Sequenzen für die Positivkontrollen (pEX-A128 vector backbone) wurden von der Firma Eurofins Scientific SE, Luxemburg hergestellt. Ein Abgleich der Sequenzen erfolgte in der Blast Gendatenbank (URL: „<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>“, letzter Zugriff am 13. Juli 2018).

Alle Plasmid- und Primersequenzen der verschiedenen PCR-Ansätze sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

TABELLE 2: PLASMID- UND PRIMERSEQUENZEN DER IN-HOUSE PCR 1 UND PCR 2

ALLE NUKLEOTIDSEQUENZEN SIND ENTSPRECHEND DER INTERNATIONALEN KONVENTION IN RICHTUNG 5' NACH 3' ABGEBILDET.

PCR	PCR 1 (Moter et al., 2013)	PCR 2.1 (Fenollar et al., 2008a)	PCR 2.2 (Fenollar et al., 2008a)
Rekombinante Fragmente der Positivkontrollplasmide	AAATCGCAAACCTC GGTGTGATGTTGAT CCAACTCGGATGGT TCTTACGAGGTCGGA TATTATCGCAACAATT CGTTATCTCGCGGCC TTGCATCTCGGTTTC TCCGAGGTTGCGGT GCTAAACAGCAACA	CTGGAGTTTCTGAG TGATGGTAGTCTGA GAGATATGTGTTAT CTATCTGTTTGTGTA TGGGAACAGTTATC TTTGGTTTCTCTGTT ACATGTATGTCAAA GAAGAAGATGTTAC GGGTTGTTAGGAG AGCTATGAGATTG GTTGTTGTCTTTGT TATGGAGACTACTTTC	CTGGAGTTTCTGA GTGATGGTAGTCT GAGAGATATGTGT TATCTATCTGTTTG TGTATGGGAACAGT TATCTTTGGTTTCT CTGTTACATGTATG TCAAAGAAGAAGA TGTTACGGGTTGT TAGGAGAGCTATGA GATTGGTTGTTGTC TTTGTTATGGAGAC TACTTTC
Primer Forward	TwrpoB-F4 CTCGGTGTTGAT GTTGATCCAA	Tw27 TGTTTTGTACTGCTT GTAACAGGATCT	Tw13 TGAGTGATGGTAG TCTGAGAGATATGT
Primer Reverse	TwrpoB-R GCACCGCAACC TCGGAGAAA	Tw182 GATGATAGGAGGGA TAGAGCAGGA	Tw163 TCCATAACAAAGAC AACAACCAATC
Sonde	TwrpoB-HP1 ACGAGGTCGGATATT ATCGC-FL TwrpoB-HP2 Red 640-ACAATTC GTTATCTCGCGGCC	27 forward- 182 reverse 6-FAM- AGAGATACATTTGTGTT AGTTGTTACA-TAMRA	13 forward-163 reverse 6-FAM- AGAAGAAGATGTT ACGGGTTG-TAMRA

Die in dieser PCR genutzten Sequenzen wurden der Veröffentlichung von Moter et al. (2003) entnommen. Dies galt für die beiden Primer TwrpoB-F4 und TwrpoB-R und die beiden Hybridisierungs sonden TwrpoB-HP1 und TwrpoB-HP2. Alle vier Sequenzen entsprachen Abschnitten auf dem *rpoB* Gen von *T. whipplei* (Moter et al., 2013). Das Plasmid für die

Positivkontrollen wurde so gewählt, dass sich sowohl links, als auch rechts von den beiden Primerzielsequenzen zehn Basen mehr befanden. So ergab sich die 143bp-(Basenpaare)-lange Sequenz.

Das gleiche Prozedere wurde mit den Sequenzen aus der Veröffentlichung von Fenollar et al. (2008a) durchgeführt. In diesem PCR-Verfahren war der Forward Primer Tw27 und der Reverse Primer Tw182 mit der Taqman-Sonde 27 forward- 182 reverse auf dem *T. whipplei* spezifischen *Dig 15* Gen zu finden (Fenollar et al., 2008a, Raoult et al., 2010). Auch hier wurden für die Herstellung des rekombinanten Plasmids zehn Basen an beiden Seiten zusätzlich stehen gelassen. Somit entstand ein Plasmid Insert mit 188 bp (Basenpaaren).

Nach dieser Screening-PCR wurde im Anschluss eine weitere PCR zur Ergebnissicherung durchgeführt. Auch diese DNA Abschnitte waren auf dem isolierten *Dig 15* Gen zu finden. Zur Anwendung kamen der Forward Primer Tw13 und der Reverse Primer Tw163. Die zu dieser PCR gehörende Taqman-Sonde war die 13 forward–163 reverse-Sonde, die ebenfalls mit FAM markiert war (Fenollar et al., 2008a, Raoult et al., 2010). Das rekombinante Fragment bestand aus 182 bp.

5.8. PCR Ansätze

Im Folgenden wurde die PCR nach Moter et al. (2013) PCR 1 genannt, die nach Fenollar et al. (2008a) PCR 2 und die kommerzielle PCR von Tib MolBiol PCR 3.

5.8.1. PCR 1: *rpoB* Gen

PCR 1 wurde von Moter et al. (2013) beschrieben. In den 20 µl PCR Ansätzen befanden sich 2 µl LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Mix (Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland), insgesamt 5 mM MgCl₂, 250 nM Primer TwrpoB F4, 500 nM Primer TwrpoB R, 200 nM jeder Sonde und schließlich 5 µl Proben-DNA (Moter et al., 2013). Da der LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Mix (Roche Diagnostics) schon 2,5 mM MgCl₂ beinhaltete, wurden zu den bereits enthaltenen 2,5 mM MgCl₂ noch weitere 2,5 mM MgCl₂ hinzugefügt. Das Pipettierschema für den Mastermix, dargestellt am Beispiel von 72 Proben, wurde wie folgt pipettiert (Tabelle 3). Pro Reaktionsansatz wurden 15 µl Reaktionsmix mit 5 µl Proben-DNA versetzt. Im Falle der Positivkontrolle wurde das Plasmid in der Verdünnungsstufe 10⁻⁶ (634 Kopien) als Proben-DNA hinzugegeben, bei der Negativkontrolle stattdessen Wasser mit PCR-Reinheitsgrad.

TABELLE 3: PIPETTIERSCHEMA PCR 1 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN

		Anteiliges Volumen für 1 Probe (µl)	Gesamtes für den jeweiligen Ansatz verwendetes Volumen (µl)
1.	LightCycler Fast HybProbe	2	144
2.	MgCl ₂	2	144
3.	H ₂ O	10,2	734,4
4.	Primer TwrpoB F4	0,2	14,4
5.	Primer TwrpoB R	0,2	14,4
6.	Sonde TwrpoB HP 1	0,2	14,4
7.	Sonde TwrpoB HP 2	0,2	14,4
Gesamt		15	1080

Die PCR 1 wurde auf dem Roche Light Cyclers Version 2.0 (LightCycler 2.0 Instrument, Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Zum PCR-Protokoll gehörte eine Denaturierungsphase von 15 Min bei 95 °C. Daran schlossen sich 50 Zyklen mit 10 Sek Denaturierung bei 95 °C, 20 Sek Annealing bei 55 °C und 30 Sek Elongation bei 75 °C an (Moter et al., 2013).

Im Anschluss an die Zyklen erfolgte eine Schmelzpunktbestimmung, beginnend bei 40 °C mit einem Anstieg von 0,2 °C pro Sekunde bis auf 95 °C. Für *T. whipplei* lag der spezifische T_m-Wert (Schmelztemperatur) bei 63 °C (Moter et al., 2013). Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn ein exponentieller Anstieg der Amplifikationskurve zu sehen war und der T_m-Wert 63 °C ± 1 °C betrug.

5.8.2. PCR 2: *Dig 15 Gen*

PCR 2, zusammengesetzt aus den Einzel-PCRs PCR 2.1 und 2.2, wurde von Fenollar et al. (2008a) beschrieben. PCR 2.1 enthielt die Primer Tw 27 und Tw 182 und die Sonde 27 forward- 182 reverse. Hier bestand ein PCR-Ansatz ebenfalls aus 20 µl. In diesem befanden sich 10 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland), insgesamt 8 mM MgCl₂, 250 nM je Primer, 50 nM Sonde und 2 µl Nukleinsäureextrakt (Fenollar et al., 2008a).

In dem Mastermix befanden sich in den 10 µl schon 1,5 mM MgCl₂, so dass noch 6,5 mM MgCl₂ hinzugefügt wurden, um auf die finalen 8 mM MgCl₂ zu kommen. Das Pipettierschema des Mastermixes wird am Beispiel von 72 Proben in Tabelle 4 veranschaulicht. Zu 2 µl DNA-Probe wurden 18 µl des Mastermixes hinzugefügt. Als Positiv- beziehungsweise

Negativkontrolle wurden jeweils 18 µl des Mastermix und 2 µl Positivkontrollplasmid der Verdünnungsstufe 10^{-5} (138) beziehungsweise 2 µl Wasser mit PCR-Reinheitsgrad eingesetzt.

TABELLE 4: PIPETTIERSCHEMA PCR 2.1 / 2.2 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN

		Anteiliges Volumen für 1 Probe (µl)	Gesamtes für den jeweiligen Ansatz verwendetes Volumen (µl)
1.	HotStar Taq	10	720
2.	MgCl ₂	5,2	374,4
3.	H ₂ O	2,2	158,4
4.	Primer Tw 27 / Tw 13	0,2	14,4
5.	Primer Tw 182 / Tw 163	0,2	14,4
6.	Sonde Tw 27-182 / Tw 13-163	0,2	14,4
Gesamt		18	1296

Bei diesem in-house Verfahren wurde vom Protokoll aus der Veröffentlichung Fenollar et al. (2008a) in einigen Punkten abgewichen. Im Detail waren dies folgende Veränderungen.

In den Veröffentlichungen waren keine genauen Angaben zu den optimalen MgCl₂ Konzentrationen zu finden, sondern nur in einer Quelle eine Angabe eines Mastermix Kits (Raoult et al., 2010). Dieses Kit beinhaltete gemäß Herstellerangabe 8 mM MgCl₂, diese Konzentration wurde für den Ansatz übernommen. Des Weiteren wurde im Protokoll eine Sondenmenge von 5 µl mit einer Konzentration von 2 µmol/µl angegeben (Fenollar et al., 2008a). Hierbei handelte es sich offenbar um einen Tippfehler in der Publikation, da bereits eine Menge von 0,2 µl mit einer Konzentration von 2 pmol/µl zu reproduzierbaren Ergebnissen bei guter Fluoreszenzintensität führte.

Die PCR wurde nicht wie in der Publikation von Fenollar et al. (2008a) auf dem Light Cycler (LightCycler Version 2.0 Instruments, Roche Diagnostics) durchgeführt, sondern auf der Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Rotor Gene 6000 Real-time PCR Maschine, Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland) und dem Corbett Rotor Gene Q-Cycler (Corbett Rotor Gene Q, Qiagen, 40724 Hilden, Deutschland). Das Protokoll war für beide PCRs identisch.

Es umfasste eine Denaturierungsphase von 15 Min bei 95 °C, danach 40 Zyklen mit je 15 Sek Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 60 Sek bei 60 °C für Annealing und Elongation. Im Anschluss wurde innerhalb von 30 Sek auf 40°C abgekühlt (Fenollar et al., 2008a, Raoult et al., 2010). Als Fluorophor wurde FAM eingesetzt, welches bei 520 nm Wellenlänge sein Maximum der Fluoreszenzemission aufweist. Immer im Anschluss an die Annealing- und

Elongationsphase wurde bei jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität gemessen. Proben mit einem exponentiellen Fluoreszenzanstieg wurden als positiv gewertet (Abbildung 2).

Der Kontrolldurchlauf mit dem zweiten Primerpaar Tw 13 und Tw 163 war genauso anzusetzen wie PCR 2.1. PCR 2.2 wurde in dieser Studie als qualitative Bestätigungs-PCR eingesetzt und nicht, wie beschrieben, zu Quantifizierungszwecken (Fenollar et al., 2008a). Eine Probe galt als positiv, wenn PCR 2.1 und PCR 2.2 ein positives Ergebnis zeigte.

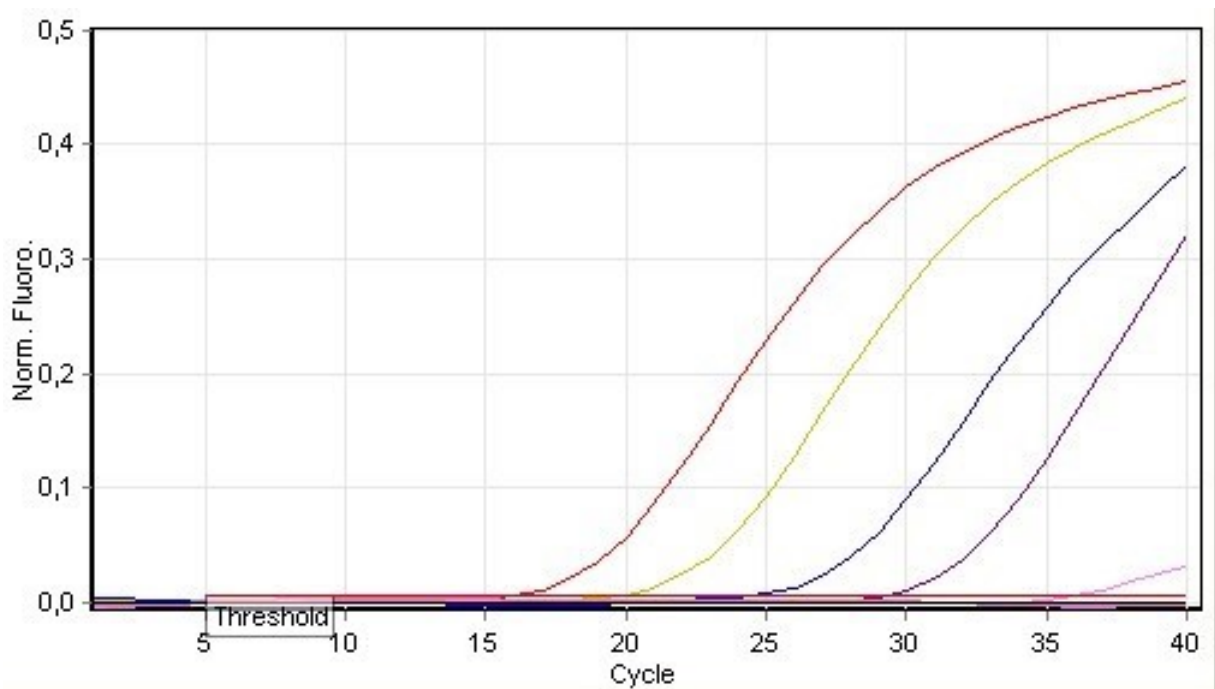


ABBILDUNG 2: PCR 2.1 POSITIVKONTROLLPLASMID-VERDÜNNUNGSREIHE, $10^6 - 10^0$ KOPIEN, EXPONENTIELLER ANSTIEG BIS 10^2 KOPIEN PRO REAKTIONSANSATZ

5.8.3. PCR 3: Tib MolBiol

Ferner wurden die Proben mit dem kommerziellen System getestet. Die PCR 3 wurde mit dem LightMix Modular *T. whipplei* (Cat. No. 53-0606-96, Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland) gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt. Diese PCR erfolgte auf der Corbett Rotor Gene 6000 und auf der Corbett Rotor Gene Q.

Ein 20 µl PCR Ansatz enthielt 4,0 µl Masterkit Roche Master (Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland), 10 µl Wasser mit PCR-Reinheitsgrad, 0,5 µl gelbe Reagenz (*T. whipplei* Primer und Sonden, Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland), 0,5 µl grüne Reagenz (PhHV Kontrolle: Cat. No. 66-0625096, Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland) und 5 µl DNA-Probe. Nach Pipettieren des Mastermixes (Tabelle 5) wurden jeweils 15 µl davon mit 5 µl Nukleinsäureextrakt in die Reaktionsgefäße gegeben. Wäre aus anderem Probenmaterial

DNA gewonnen worden, hätte man gemäß der Herstellerangaben 10 µl DNA zu 10µl Mastermix pipettieren müssen.

Bei dieser PCR wurde als Positivkontrolle das Reagenz im schwarzen Probengefäß (Tib MolBiol, 12103 Berlin, Deutschland), das extrahierte *T. whipplei* DNA enthielt, verwendet und für die Negativkontrolle Wasser mit PCR-Reinheitsgrad. Der Herstelleranleitung war zu entnehmen, dass es sich bei der Positivkontrolle um ein 85-bp-Fragment aus der „genomic repeated sequence“ von *T. whipplei* handelte.

TABELLE 5: PIPETTIERSCHEMA PCR 3 AM BEISPIEL VON 72 PROBEN

		Anteiliges Volumen für 1 Probe (µl)	Gesamtes für den jeweiligen Ansatz verwendetes Volumen (µl)
1.	Roche Master	4	288
2.	H ₂ O	10	720
3.	Gelbe Reagenz (<i>T. whipplei</i>)	0,5	36
4.	Grüne Reagenz (PhHV)	0,5	36
Gesamt		15	1080

Das Protokoll für PCR 3 sah eine Denaturierungsphase bei 95 °C für 5 Min vor, im Anschluss daran folgten 45 Zyklen zu je 5 Sek bei 95 °C, dann 15 Sek bei 60 °C und 15 Sek bei 72 °C. Zum Schluss wurde innerhalb von 30 Sek auf 40 °C abgekühlt. Das Fluorophormolekül für *T. whipplei* war FAM, welches sein Fluoreszenzmaximum bei 520 nm hat und im 530 nm Kanal der Corbett Rotor Gene 6000 und der Corbett Rotor Gene Q gemessen wurde. Ferner war PhHV mit LC670 gelabelt, was bei 660 nm sein Maximum an Fluoreszenz erreichte.

Eine Probe galt als positiv für *T. whipplei*, wenn der Ct-Wert unter 42 lag und die Negativkontrolle kein Signal zeigte. Ferner war das Ergebnis gemeinsam mit der PhHV-PCR, welche als Inhibitionskontrolle diente, zu bewerten. Bei nicht inhibierten Proben, die keine *T. whipplei* DNA beinhalteten, war ein positives PhHV-Signal zu erwarten. Wenn eine Probe im *T. whipplei* Kanal kein Signal zeigte, aber im PhHV Kanal ein Signal detektierbar war, so galt diese Probe als auswertbar und somit negativ für den Parameter *T. whipplei*. Zeigte eine Probe in beiden Kanälen kein Signal, so galt diese Probe als inhibiert und konnte nicht ausgewertet werden. Vereinzelt gab es Proben, die im 530 nm Kanal positiv wurden, jedoch kein Signal im

660 nm Kanal zeigten. Diese waren dennoch als positiv für *T. whipplei* zu bewerten, da hier von einem Kompetitionsphänomen auszugehen war.

5.9. Statistische Methoden

Um eine Vergleichbarkeit der drei PCR-Systeme zu gewährleisten, wurden die Testcharakteristiken bestimmt. Hierzu gehörten Sensitivität und Spezifität. Ferner wurden die Ct-Werte deskriptiv analysiert.

5.9.1. Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnung

Die Leistungsparameter Sensitivität und Spezifität wurden in dieser Arbeit wie folgt verwendet: Die Sensitivität gibt den Prozentsatz der mit *T. whipplei* Besiedelten oder Infizierten, die im Test auch korrekt als positiv erkannt wurden, an. Mathematisch lässt sich dies als Quotient der richtig positiven Testergebnisse geteilt durch die Summe der richtig positiven und der falsch negativen Testergebnisse beschreiben. Der Parameter Spezifität gibt den Prozentsatz der Nichtinfizierten bzw. Nichtbesiedelten, die im Test korrekt als negativ erkannt wurden, an. Dies wiederum lässt sich mathematisch als Quotient aus den richtig negativen Testergebnissen geteilt durch die Summe der richtig negativen und der falsch positiven Testergebnisse beschreiben.

Die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität für die PCR-Ansätze erfolgte mittels indirekter Methode nach den Ansätzen von Hui und Walter (1980) sowie Gart und Buck (1966). Die Methode von Hui und Walter wurde auf PCR 2.1 und 2.2 angewandt, da hier die Proportionen über beide Kollektive vergleichbar waren. Es wurden zwei Vierfeldertafeln erzeugt, jeweils für eine Population (Abbildung 3). Gegenübergestellt wurden PCR 2.1 als Test 1 und PCR 2.2 als Test 2. Dabei wurde bewertet, ob das Ergebnis des Tests positiv (T+) oder negativ (T-) war. Die Probenanzahl, die bei beiden Tests positiv ausgefallen war, stand so im Feld a. Im Feld d stand die Probenanzahl für alle Proben, die in beiden Tests negativ waren. Abweichungen der beiden Testsysteme spiegelten b und c wider. Die Variable n stand für die Gesamtpopulation. Aus den folgenden Formeln konnten nun die Sensitivität und die Spezifität errechnet werden.

Test 2	Test 1		
	T+	T-	
T+	a_i	b_i	g_i
T-	c_i	d_i	h_i
	e_i	f_i	n_i

ABBILDUNG 3: VIERFELDERTAFEL

Im Folgenden wurde davon ausgegangen, dass die Einschränkungen von Sensitivität und Spezifität in beiden Populationen den gleichen Messungenauigkeiten unterlagen. Somit wurden die beiden Populationen mit ihren unterschiedlichen Prävalenzen zur Bestimmung der Testgenauigkeiten genutzt (Abbildungen 4,5).

$$(1) \quad S_{e1} = \frac{\frac{g_1 e_2 - e_1 g_2}{n_1 n_2} + \frac{a_2}{n_2} - \frac{a_1}{n_1} + F}{2\left(\frac{e_2}{n_2} - \frac{e_1}{n_1}\right)}$$

$$(2) \quad S_{e2} = \frac{\frac{g_2 e_1 - e_2 g_1}{n_1 n_2} + \frac{a_2}{n_2} - \frac{a_1}{n_1} + F}{2\left(\frac{g_2}{n_2} - \frac{g_1}{n_1}\right)}$$

$$(3) \quad S_{p1} = \frac{\frac{f_1 h_2 - h_1 f_2}{n_1 n_2} + \frac{d_1}{n_1} - \frac{d_2}{n_2} + F}{2\left(\frac{e_2}{n_2} - \frac{e_1}{n_1}\right)}$$

$$(4) \quad S_{p2} = \frac{\frac{f_2 h_1 - h_2 f_1}{n_1 n_2} + \frac{d_1}{n_1} - \frac{d_2}{n_2} + F}{2\left(\frac{g_2}{n_2} - \frac{g_1}{n_1}\right)}$$

$$(5) \text{ mit } F = \pm \sqrt{\left(\frac{g_1 e_2 - g_2 e_1}{n_1 n_2} + \frac{a_1}{n_1} - \frac{a_2}{n_2}\right)^2 - 4\left(\frac{g_1}{n_1} - \frac{g_2}{n_2}\right) \times \frac{a_1 e_2 - a_2 e_1}{n_1 n_2}}$$

ABBILDUNG 4: BERECHNUNG SENSITIVITÄT (SE) UND SPEZIFITÄT (SP) NACH HUI UND WALTER, 1980.

In die oberen Formeln zur Berechnung von S_e und S_p wurde der Teil-Term F eingesetzt. Er war in diesem Fall einzeln dargestellt, da für F spezielle Voraussetzungen für dessen Gültigkeit erfüllt sein mussten. Der Term F kann ein positives und ein negatives Ergebnis annehmen. Damit F jedoch gültig war, musste die Summe aus Sensitivität und Spezifität größer 1 sein. So musste der Wert F zum Beispiel negativ gewählt werden, wenn der Nenner negativ war, um wieder ein positives Ergebnis zu generieren.

Für die PCR 1 und 3 wurden Sensitivität und Spezifität mit dem Ansatz von Gart und Buck (1966) unter Verwendung der PCR-Plattform 2.1 als Referenztest bewertet. Die Methode konnte genutzt werden, da die Sensitivität und Spezifität von PCR 2.1 aus dem Ansatz von Hui und Walter (1980) bekannt waren. Die Variablen blieben die gleichen wie oben in der Vierfeldertafel dargestellt. Hierfür wurde eine Vierfeldertafel pro Population aufgestellt (mit der zu untersuchenden PCR und der Referenz-PCR).

$$(6) \quad S_{e_n} = \frac{gS_{p_R} - b}{n(S_{p_R} - 1) + e}$$

$$(7) \quad S_{p_n} = \frac{hS_{e_R} - c}{nS_{e_R} - e}$$

ABBILDUNG 5: BERECHNUNG VON SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT NACH GART UND BUCK, 1966.

N STEHT HIER FÜR PCR 1 BEZIEHUNGSWEISE 3 ALS UNTERSUCHTE TESTS, R DEFINIERT DEN REFERENZTEST, ALSO PCR 2.1.

Eine Übereinstimmung zwischen den drei PCR-Tests wurde über die Fleiss' Kappa Formel berechnet. Der Fleiss' Kappa ist ein statistisches Maß, das angibt, ob die Übereinstimmung, im hier geschilderten Fall von den verschiedenen Testsystemen, zufällig oder begründet 1 ist, das heißt den Wert 0 oder 1 annimmt. Hierfür wurde eine Kontingenztafel aus den drei Systemen erstellt. Verwendet wurde die Software Stata / IC 14.1 für Mac 64-Bit Intel (College Station, Texas, USA).

$$(1) \quad p_o = \frac{\sum_i h_{iii}}{N}$$

$$(2) \quad p_c = \frac{1}{N^3} \times \sum_{i=1}^Z h_{i..} \times h_{.i.} \times h_{..i}$$

$$(3) \quad K_n = \frac{p_o - p_c}{1 - p_c}$$

N = Summe aller Proben

p_o = übereinstimmende Einschätzung der Tests

h = Urteilshäufung

p_c = erwartete zufällige Übereinstimmung

K_n = Fleiss' Kappa Wert

ABBILDUNG 6: BERECHNUNG DES FLEISS' KAPPA WERTES

Die Einteilung der Übereinstimmung zwischen den PCR-Verfahren von K_n erfolgte nach Landis und Koch in die Kategorien: schlecht (unter 0,00), gering (0,00-0,20), ausreichend (0,21-0,40), mittelgradig (0,41-0,60), beachtlich (0,61-0,80) und fast vollkommen (0,81-1,00) (Landis & Koch, 1977). Hierfür wurde ein 95% Konfidenzintervall (KI) angegeben.

5.9.2 Auswertung der Ct-Werte

Die Ct -Werte aller PCRs mit einem positiven *T. whipple*-Nachweis wurden deskriptiv beurteilt. Dazu wurden die für die Proben gemessenen Ct - Werte verschiedenen Klassen zugeordnet. Die Einteilung erfolgte in „stark positive“ Ergebnisse, wenn alle drei Tests für die jeweilige Probe positiv ausfielen, in „positive“ Ergebnisse, wenn positive Ergebnisse für zwei von drei Testplattformen beobachtet wurden und in „schwach positive“ Ergebnisse, wobei nur bei einem Test ein positives Ergebnis auftrat. Innerhalb der Gruppen wurden die Ct-Werte für jedes einzelne Verfahren gesammelt und statistisch ausgewertet. Ein Vergleich wurde für Mittelwerte neben Standardabweichungen (standard deviation, SD) und für Mediane mit den Intervallen aus den verschiedenen Klassen durchgeführt. Die Intervallgrenzen bestanden aus Minimum und Maximum der jeweiligen Ct-Werte für die Proben, die in die jeweilige Klasse gehörten.

6. Ergebnisse

Mittels PCR 3 konnten 11 Stuhlproben der deutschen Soldaten und Polizisten sowie 1 Stuhlprobe der ghanaischen Kinder mit PCR-inhibierenden Eigenschaften identifiziert werden. Die Proben gingen in die Berechnungen für PCR 3 nicht als negative Resultate ein, sondern wurden für diese Auswertung nicht miteingerechnet. In einem Fall wurde eine der inhibierten Probe aus PCR 3 in allen anderen PCR-Systemen als positiv erkannt. Bei den in-house PCRs 1 und 2 wurden keine Inhibitionskontrollen mitgeführt. Somit wurden dort die Ergebnisse aus allen 300 Proben in die Berechnungen aufgenommen.

6.1. Technische Sensitivitätsgrenzen

Die Sensitivitätsgrenze wurde bei PCR 1, PCR 2.1 und PCR 2.2 jeweils durch Einsatz von Verdünnungsreihen der Stufen 10^{-4} bis 10^{-12} der Positivkontrollplasmide bestimmt. Damit wurde für jedes PCR-Systeme die Verdünnungsstufe ermittelt, welche als letzte noch positiv detektiert wurde. Die Ergebnisse sind Tabelle 6 zu entnehmen.

In beiden Teilanalysen der PCR 2 wurde ein positives Ergebnis mit der Positivkontrolle noch bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-8} erreicht. Bei einer Plasmidgröße von 2638 bp für die Positivkontrolle der PCR 2.1, ließ sich die Sensitivitätsgrenze bei circa 138 Kopien (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>, letzter Zugriff am 28. Mai 2018) ermitteln. Das Plasmid der Positivkontrolle für die PCR 2.2 hatte eine Größe von 2632 bp und somit wurde die Grenze bei etwa 100 Genomäquivalenten berechnet. Für die Messungen mittels der PCR 2.1 und 2.2 waren die technischen Sensitivitätsgrenzen also nahezu identisch.

Die Verdünnungsreihe der Positivkontrolle von PCR 1 zeigte noch ein positives Ergebnis bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-8} . Die Größe dieses Plasmids betrug bei 2593 bp. Somit lag die technische Sensitivitätsgrenze von PCR 1 bei 634 Genomäquivalenten.

Für PCR 3 gibt der Hersteller eine Sensitivitätsgrenze von 10 genomäquivalenten Kopien an. Damit ist sie nominell zehnmal sensitiver als PCR 2. Als Grund dafür führte der Hersteller die Verwendung eines Multicopy-Targets als Zielstruktur an.

TABELLE 6: SENSITIVITÄTSGRENZEN VON PCR 1 UND PCR 2.

DIE MINIMAL DETEKTIERBAREN GENOMISCHEN ÄQUIVALENTE WURDEN ANHAND DER KONZENTRATIONEN DER POSITIVPLASMIDE MIT DER SOFTWARE „THE SCIENCEPRIMER“ ([HTTP://SCIENCEPRIMER.COM/COPY-NUMBER-CALCULATOR-FOR-REALTIME-PCR](http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr), LETZTER ZUGRIFF AM 28. MAI 2018) BERECHNET.

PCR	Basenpaare	Letzte positive Verdünnungsstufe	Konzentration der Stammlösung	Kopienanzahl
PCR 1	2593	10 ⁻⁸	36 ng/μl	6,34*10 ²
PCR 2.1	2638	10 ⁻⁸	20 ng/μl	1,38*10 ²
PCR 2.2	2632	10 ⁻⁸	15 ng/μl	1,04*10 ²

6.2. Sensitivität und Spezifität der PCR Plattformen

Die mittels indirekter Verfahren (siehe Kapitel 5.8.1) errechneten Angaben zu Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

TABELLE 7: SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER UNTERSUCHTEN PCR-PLATTFORMEN

<i>PCR</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Spezifität</i>
<i>PCR 1</i>	0,48	1
<i>PCR 2</i>	0,86	1
<i>PCR 2.1.</i>	1	1
<i>PCR 2.2.</i>	0,85	0,96
<i>PCR 3</i>	0,68	0,97

Der Fleiss' Kappa Wert lag für den Vergleich von PCR 1, 2 und 3 bei 0,66 (95% Konfidenzintervall KI: 0,58; 0,73) und bei zusätzlicher Einzelbetrachtung der PCR 2.1 und der PCR 2.2 mit 0,67 (KI: 0,60; 0,73) nur unwesentlich höher.

Während alle drei PCR-Plattformen eine sehr gute bis exzellente Spezifität von 96% bis 100% aufwiesen, unterschieden sich die errechneten Sensitivitäten teils deutlich. Das hinsichtlich der Sensitivität beste Ergebnis wurde von PCR-Plattform 2 erreicht, gefolgt von PCR 3 und PCR 1.

6.3. Übereinstimmung und Diskrepanzen der Testsysteme

Des Weiteren wurden die Übereinstimmungen der PCR-positiven Ergebnisse wie folgt charakterisiert. Die Einteilung erfolgte in „stark Positive“, wenn drei von drei PCR Plattformen positive Ergebnisse zeigten, sowie „Positiv“, wenn zwei von drei PCR Plattformen positiv waren und „schwach Positive“, wenn eine PCR von drei PCR Plattformen ein positives Ergebnis zeigte (Tabelle 8).

TABELLE 8: ÜBEREINSTIMMUNGEN POSITIVER ERGEBNISSE IN DER PCR. DARSTELLUNG DER KATEGORIEN.

„SCHWACH POSITIV“ (1 POSITIVES ERGEBNIS UNTER DEN 3 TESTPLATTFORMEN), „POSITIV“ (ZWEI VON DREI PCR-TEST ZEIGEN EIN POSITIVES) UND „STARK POSITIV“ (DREI VON DREI SYSTEMEN SIND POSITIV FÜR DIE). EBENFALLS DARGESTELLT IST DIE ANZAHL DER GESAMTPOSITIVEN AUS EINEM SYSTEM.

<i>Erreger</i>	<i>PCR</i>	<i>Schwach positiv n (%)</i>	<i>Positiv n (%)</i>	<i>Stark positiv n (%)</i>	<i>Insgesamt positiv n (%)</i>
<i>T. whipplei</i>	PCR 1	0	7 (1)	40 (7)	47 (8)
	PCR 2*	14 (2)	31 (5)	40 (7)	85 (14)
	PCR 3	19 (3)	24 (4)	40 (7)	83 (14)

***FÜR PCR 2 WURDEN HIER NUR DIE PROBEN DARGESTELLT, DIE IN BEIDEN TEILSYSTEMEN POSITIV WURDEN. INSGESAMT WURDEN IN PCR 2.1 99 POSITIVE ERGEBNISSE UND IN PCR 2.2 101 POSITIVE ERGEBNISSE VERZEICHNET.**

Mit 99 beziehungsweise 101 positiven Ergebnissen konnten insgesamt mehr positive Ergebnisse in den einzelnen PCRs 2.1 und 2.2 verzeichnet werden, Übereinstimmungen zwischen den beiden Teil-PCRs ergaben sich aber nur für 85 (14%) Proben, die dann für die Gesamtplattform PCR 2 als positiv gewertet wurden.

Eine Diskrepanzanalyse für die „Positiven“ zeigte, dass die 7 „Positiven“ in PCR 1 alle mit PCR 2 und nie mit PCR 3 übereinstimmten. Bei PCR 2 stimmten von den 31 „Positiven“ 7 mit PCR 1 und 24 mit PCR 3 überein. Von den 24 „Positiven“ in PCR 3 zeigten alle eine Übereinstimmung mit PCR 2, während eine solche Übereinstimmung mit PCR 1 nie beobachtet wurde.

6.4. Ct-Wert Bereiche

Der Ct-Wert wird in der PCR-basierten mikrobiologischen Diagnostik für eine semiquantitative Abschätzung der mutmaßlich in der Probe vorhandenen Erregermenge eingesetzt. Ein niedriger Ct-Wert, also ein positives Ergebnis nach weniger Replikationszyklen, deutet auf einen höheren anfänglichen Gehalt an Ziel-DNA in der Probe hin. In den folgenden Tabellen sind alle detektierten Ct-Wert-Intervalle mit der Unterscheidung in „schwach Positive“ (Tabelle 9), „Positive“ (Tabelle 10) und „Stark Positive“ (Tabelle 11) aufgeführt. Eine Auswertung von PCR 2 fand für die Teil-PCRs 2.1 und 2.2 getrennt statt.

TABELLE 9: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „SCHWACH POSITIVEN“ PROBEN

Schwach Positive				
		n	Mean (SD)	Median (Min, Max)
<i>T. whipplei</i>	PCR 1	0	-	-
	PCR 2			
	PCR 2.1	14	33 (2,9)	33 (27,37)
	PCR 2.2	14	30 (2,7)	30 (24,33)
	PCR 3	19	35 (2,2)	36 (29,39)

TABELLE 10: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „POSITIVEN“ PROBEN

Positive				
		n	Mean (SD)	Median (Min, Max)
<i>T. whipplei</i>	PCR 1	7	33 (6,6)	29 (25,41)
	PCR 2			
	PCR 2.1	31	32 (2,5)	33 (27,35)
	PCR 2.2	31	30 (3,4)	30 (23,36)
	PCR 3	24	34 (2,5)	34 (29,39)

TABELLE 11: AUSWERTUNG VON MITTELWERT (MEAN) MIT STANDARDABWEICHUNG (SD) UND MEDIAN MIT INTERVALLGRENZEN BEI „STARK POSITIVEN“ PROBEN

		Stark Positive		
		n	Mean (SD)	Median (Min, Max)
<i>T. whipplei</i>	PCR 1	40	31 (4,3)	29 (25,40)
	PCR 2			
	PCR 2.1	40	30 (2,3)	30 (25,34)
	PCR 2.2	40	27 (2,2)	27 (23,31)
	PCR 3	40	32 (2,4)	32 (27,36)

Bei allen PCR Systemen gab es nur geringe Unterschiede bezüglich des Mittelwertes und des Medians. Insofern lag für kein PCR-Verfahren eine offensichtliche Rechts- oder Linksverschiebung der Wertepaare vor.

6.5. Besiedlungsprävalenz für *T. whipplei*

Für alle Proben wurden die Beurteilung, ob eine Probe negativ oder positiv war, und die zugehörigen Ct-Werte dokumentiert. Für die Probanden aus Gruppe 1, die aus ghanaischen Kindern bestand, waren in PCR 1 44 von 300 Proben mit einem positiven Ergebnis vergesellschaftet, was auf der Basis dieses Tests einer Besiedlungsprävalenz von 14,7% entsprach. Mittels PCR 2 lag für dieses Kollektiv die Besiedlungsprävalenz bei 24,3%, da 73 von 300 Proben ein Signal in beiden Teilanalysen zeigten. In Einzelbetrachtung der Ergebnisse aus PCRs 2.1 und 2.2 waren 28,3% (85/300) beziehungsweise 26,7% (80/300) der Probanden besiedelt. Eine Besiedlungsprävalenz von 18,1% wurde auf der Basis der Ergebnisse aus PCR 3 dokumentiert, denn dort waren 54 von 299 nicht-inhibierten Proben als positiv ausgewiesen.

Für Gruppe 2, bestehend aus deutschen Soldaten und Polizisten, die aus Einsätzen in tropischen Weltregionen zurückgekehrt waren, wurden mittels PCR 1 nur 4 Positive unter 300 Proben verzeichnet, was einer Besiedlungsprävalenz von 1,5% entsprach. In PCR 2 waren 13 von 300 Proben positiv mit einer daraus resultierenden Besiedlungsprävalenz von 4,3%. In den Teil-PCRs 2.1 und 2.2 lagen die Werte bei 5,0% (15/300) beziehungsweise bei 7,3% (22/300). In PCR 3 zeigte sich eine Prävalenz von 10,0% (29/289) auf der Basis der positiven Testergebnissen unter den nicht inhibierten Proben.

Anhand der im vorausgegangenen errechneten Testcharakteristika aller drei PCR-Verfahren konnte die *T. whipplei* Besiedlungsprävalenz in der Gruppe der ghanaischen Kinder auf 28,3%

und die der Soldaten und Polizisten nach Rückkehr aus tropischen Einsätzen auf 5,0% geschätzt werden.

7. Diskussion

Die Studie verglich zwei etablierte in-house PCR Verfahren aus Marseille, Frankreich, und Berlin, Deutschland, mit einem kommerziellen Testsystem von Tib MolBiol, Berlin, Deutschland, hinsichtlich ihrer diagnostischen Zuverlässigkeit für den Nachweis von *T. whipplei* in Stuhlproben im Rahmen tropischer Surveillance-Screenings.

Im Folgenden werden nun die die Nachweisqualität bestimmenden Leistungsparameter der drei PCR-Verfahren auf der Basis der in dieser Studie ermittelten Werte miteinander verglichen: dies sind die Nachweisgrenzen, Sensitivität und Spezifität sowie die Ct-Werte der PCR-Verfahren.

7.1. Auswertung der Nachweisgrenze (technische Sensitivitätsgrenze)

Der Leistungsparameter Nachweisgrenze wird für eine PCR in Genomäquivalenten pro Reaktion angegeben. Er bedeutet für diese PCR, ob nur Patienten mit viel Erreger-DNA zum Beispiel im Rahmen einer floriden Infektion oder auch Menschen mit wenig Erreger-DNA im Rahmen einer Rekonvaleszenz oder eines asymptomatischen Trägerstatus erkannt werden. Er sagt zu dem etwas über die Intaktheit der Ziel-DNA und damit etwas über die Qualität des Transports und der Lagerung der jeweiligen Probe aus.

PCR 1 hatte mit circa 600 Genomäquivalenten die schlechteste Sensitivität der untersuchten PCRs, gefolgt von PCR 2 mit circa 100 Genomäquivalenten. PCR 3 ist mit den circa 10 Genomäquivalenten die sensitivste PCR. Zu erwarten wäre somit, dass PCR 3 auch Proben mit geringeren Mengen an *T. whipplei* hätte detektieren können (s.u.).

Mittels PCR 1 wurden keine „schwach positiven“ Proben im Gegensatz zu PCR 2 und PCR 3 nachgewiesen. Mit „schwach positiven“ Proben sind Proben gemeint, die nur in einer von drei Plattformen zu einem positiven Ergebnis geführt haben. Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass die Nachweisgrenze von PCR 1 mit circa 600 Genomäquivalenten im Vergleich zu PCR 2 mit circa 100 und PCR 3 mit circa 10 Genomäquivalenten höher lag. Somit konnten PCR 2 und 3 noch Proben mit sehr geringeren Ziel-DNA-Mengen im Bereich ihrer jeweiligen Nachweisgrenze detektieren, die von PCR 1 schon nicht mehr nachgewiesen wurden.

Durch DNA Fragmentierung, die aufgrund der Kühlung der aus den Patientenproben präparierten DNA auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu erwarten war, erbringen PCRs mit kurzen Amplifikaten eher Ergebnisse als solche mit längeren Amplifikaten. Dies würde bedeuten, dass die PCR 1 mehr positive Ergebnisse erbringen sollte. Das Gegenteil war der Fall, so dass sich der geringe

Größenunterschied der Amplifikate gegenüber den weiteren Einflussgrößen nicht bemerkbar machte.

Des Weiteren fiel auf, dass in PCR 3 mit der nominell niedrigsten Nachweisgrenze auch die größte Anzahl an „schwach positiven“ Proben nachgewiesen wurden, was eine Ursache für die errechnete geringere Spezifität (s.u.) sein könnte. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass einige der scheinbar falsch positiven Befunde tatsächlich existierende asymptomatische Trägerstadien mit geringer Keimdichte dokumentierten.

7.2. Auswertung der Ct-Werte

Der Ct-Wert einer PCR beschreibt die Zyklenzahl der Reaktion, ab der es zu messbaren Mengen an PCR-Produkt kommt. Damit ist der Ct-Wert ein alternatives Maß für die Nachweisgrenze des jeweiligen Tests. Probenergebnisse mit vielen Zyklen beinhalten weniger Ziel-DNA, als Probenergebnisse mit weniger Zyklen, welche viel Ziel-DNA aufweisen. Ebenso wurde eine Einteilung in „schwach positive“, „positive“ und „stark positive“ Proben, anhand der qualitativen Übereinstimmung der Ergebnisse, vorgenommen (siehe Kapitel 6.3).

Im Allgemeinen bestand eine Übereinstimmung der Minima und Maxima der Ct-Werte bei den „schwach positiven“ und bei den „positiven“ Proben innerhalb eines jeden PCR-Systems in dieser Studie. Es ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Ct-Wert-Intervallen bei den als „schwach positiv“ und „positiv“ charakterisierten Proben erkennen, die mit hohen Ct-Werten, also wenig Ziel-DNA in den Proben, assoziiert waren.

Die Ct-Wert-Intervalle bei den „stark positiven“ Proben waren jedoch in einem sichtbar niedrigeren Bereich angesiedelt. Die zu erwartende niedrige Kolonisationsdichte bei den asymptomatischen Probanden, von denen die Proben stammten, ist ein Faktor, welcher die beobachteten, nur marginalen Unterschiede der Ct-Werte der untersuchten Testsysteme zwischen „schwach positiven“ und „positiven“ Proben, im Bereich der diagnostischen Sensitivitätsgrenze bedingt haben kann. Bei den „stark positiven“ Proben ließ sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ct-Werte über die verglichenen Systeme hinweg feststellen. Da bei Patienten mit M. Whipple, die in der hier vorgestellten Studie nicht vertreten waren, bekanntermaßen höhere Ziel-DNA-Konzentrationen vorliegen als im Fall von Kolonisationsereignissen (Fenollar et al., 2008a), wären Proben von M. Whipple-Patienten vermutlich von allen untersuchten Testplattformen detektiert worden.

PCR 1 enthielt keine Proben der Kategorie „schwach positiv“. In der Kategorie „positiv“ fand sich ebenfalls bei PCR 1 im Vergleich zu den anderen PCRs der geringste Anteil. Das heißt, mehr als 80% (40 von 47) aller „positiven“ Proben wurden von allen anderen Tests ebenfalls als positiv erkannt und 100% von mindestens einem anderen Test. Dies ist im Einklang mit

der hohen Spezifität des Testsystems PCR 1. Die Ct-Werte waren bei „positiven“ und „stark positiven“ Proben praktisch identisch.

PCR 2.1 und 2.2 zeigten bei den „stark positiven“ Proben den geringsten Ct-Wert, die Differenz zu den Ct-Werten von „schwach positiven“ Proben war aber weniger deutlich als bei PCR 3. Anzunehmen ist, dass noch weitere Faktoren neben der DNA-Konzentration für die Abweichungen zwischen den Testsystemen und damit für die Eingruppierung in „schwach positiv“ beziehungsweise „positiv“ verantwortlich sind, zum Beispiel PCR-spezifische Inhibitionsunterschiede sowie unterschiedliche Testspezifitäten.

Des Weiteren ließ sich für alle PCR-Systeme zeigen, dass sich die „stark positiven“ Proben um drei bis vier Zyklen von den „schwach positiven“ Proben unterschieden. Diese drei bis vier Zyklen entsprechen, Linearität der Amplifikation vorausgesetzt, in etwa einer Menge von einer Zehnerpotenz *T. whipplei*-DNA im Stuhl. Zusammenfassend folgt aus den übereinstimmenden Ergebnissen in der Kategorie der „stark positiven“ Proben für die untersuchten Testsysteme, dass alle Tests bei mehr als marginaler Ziel-DNA-Menge *T. whipplei* zuverlässig nachweisen können. Bei sehr geringen DNA-Mengen im Bereich der Sensitivitätsgrenzen reagierten die Tests dagegen teils unterschiedlich.

PCR 1, welche die höchste Nachweisgrenze aufwies und damit am wenigsten sensitiv ist, zeigte keine „schwach positiven“ Proben, was damit im Zusammenhang stehen könnte, dass PCR 2.1, 2.2 und 3 Proben mit geringeren Ziel-DNA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze von PCR 1 als positiv detektieren konnten. Des Weiteren zeigte sich, dass PCR 2 und PCR 3 in etwa gleich viele „schwach positive“ Proben nachweisen konnten und 24 übereinstimmende Ergebnisse bei den „positiven“ Proben zeigten. Weder bezüglich der diagnostischen Nachweisgrenze noch bei den Ct-Wertdifferenzen zwischen „positiven“ und „schwach positiven“ Proben ließen sich für die PCR-Plattformen 2 und 3 relevante Unterschiede aufzeigen.

Als Fazit lässt sich somit – keinesfalls unerwartet - zusammenfassen: Je weniger Zielgen-DNA die Proben enthielten, desto unsicherer wurden die Zielsequenzen von allen drei Systemen detektiert.

7.3. Auswertung von Sensitivität und Spezifität

Der Leistungsparameter Sensitivität und Spezifität in der Infektionsdiagnostik reflektieren, wie viele Menschen als Keimträger oder Infizierte überhaupt und dann richtig erkannt werden (siehe Kapitel 5.9.1). Die beiden Parameter sind keine absoluten Größen, sondern hängen von der Prävalenz des detektierten Zustandes ab. Fleiss' Kappa gibt die aufgetretene Übereinstimmung der PCR Messergebnisse an (siehe Kapitel 5.9.1).

Der Fleiss' Kappa Wert aller PCR Systeme war mit 0,66 beziehungsweise bei gesonderter Mitbetrachtung der Teilanalysen PCR 2.1 und 2.2 als Bestandteile der Plattform PCR 2 – mit 0,67 als beachtlich zu bewerten (Landis & Koch, 1977).

PCR 1 wies in den Versuchen mit 48% eine geringe Sensitivität auf, mit 100% jedoch eine hervorragende Spezifität.

Moter et al. (2013) nutzten die von uns als PCR 1 bezeichnete PCR in ihrer Evaluationsstudie mit anderen Probenkollektiven und fanden im Vergleich zum Goldstandard der histopathologischen Untersuchung nur 3% falsch negative Befunde, das heißt eine Sensitivität von 97%. Diese Studie war jedoch mit Proben von Gesunden und an M. Whipple Erkrankten durchgeführt worden. In unserer Studie waren 40 von 47 in PCR 1 positiven Stuhlproben der „stark positiven“ Gruppe zugeordnet.

Dies legt den Schluss nahe, dass PCR 1 wegen der hohen Spezifität für die Diagnostik von Patienten sehr gut einsetzbar sein könnte. Für ein Screening von asymptomatischen Trägern in Hochendemiegebieten sollte diese PCR weniger in Betracht gezogen werden, da für ein epidemiologisches Screeningverfahren auch eine hohe Sensitivität wünschenswert ist. Unterstützt wird diese Einschätzung von den Daten von Fenollar et al. (2008a), dass sich bei Patienten mit M. Whipple quantitativ mehr *T. whipplei* Genomäquivalente im Stuhl nachweisen ließen. Um dies weiter zu evaluieren, sind Untersuchungen mit Proben von an M. Whipple Erkrankten nötig.

Die Sensitivität von PCR 2 veränderte sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus beiden Teil-PCRs von 1 beziehungsweise 85% auf 86%. Hier stellt sich die Frage, ob eine Analyse von beiden Teil-PCRs zusammen notwendig ist, oder ob auch eine Einzelbewertung der beiden Teil-PCR-Systeme in Frage kommt. PCR 2.1 konnte bei isolierter Betrachtung mit einer hervorragenden Sensitivität und Spezifität überzeugen, während die Sensitivität in der Gesamtauswertung der PCR 2 sank. Zu überlegen wäre daher, PCR 2.1 als Einzelsystem zu etablieren. Für die Einzelbewertung spräche auch, dass die Fleiss' Kappa Werte unter Einschluss der Subanalysen gleichwertig mit denen waren, bei denen keine Diskriminierung der Einzel-PCRs stattgefunden hatte. Eine Beschränkung auf PCR 2.1 wurde auch von anderen Autoren wie Garcia-Alvarez et al. (2016), als Option diskutiert. Durch die gemeinsame Auswertung der Teil-PCRs wurde die Spezifität nicht schlechter, sondern blieb bei 1, wie es auch für die isolierte Betrachtung der PCR 2.1 dokumentiert werden konnte.

PCR 3, mit 68%-iger Sensitivität und 97%-iger Spezifität, lag im Mittelfeld der untersuchten Methoden. Die geringe errechnete Sensitivität war bei einer Zielsequenz, die bekanntermaßen in zahlreichen Kopien im Erregergenom vorliegt, unerwartet. Den Herstellerangaben zufolge wurde der kommerziell vertriebene Test geprüft und wies in der Firmenevaluation eine Sensitivität und Spezifität von 100% auf, was sich in dieser Arbeit nicht bestätigen lies. Über

die Gründe für die Diskrepanz zwischen den eigenen und den Firmen-Ergebnissen kann nur spekuliert werden, da die Firma die Zielsequenz für die PCR nicht öffentlich zugänglich macht. Für PCR 3 fehlt ferner aufgrund der Unmöglichkeit einer in-silico-Evaluation bei unbekannter PCR-Zielsequenz, ein Beweis für das ausschließliche Vorkommen des Zielgens im Genom von *T. whipplei*. Somit kann eine Ergebnisbeurteilung bei epidemiologischen Studien nur unter Anwendung der mathematischen Algorithmen (Rogan und Gladen, 1978) erfolgen.

7.4. Zielsequenzen, Möglichkeit und Grenzen der Analytik

Bei der Beurteilung der Testsysteme muss man berücksichtigen, dass die durchgängige Anwesenheit der für die PCR-Systeme verwendeten Zielsequenzen *rpoB*, *Dig15* und die repetitive Sequenz in den jeweiligen Bindungssequenzen für die eingesetzten Oligonukleotide oder gar überhaupt bisher nicht untersucht, sondern postuliert wurde. Es ist außerdem möglich, dass sequenzgleiche Zielstrukturen auch in anderen, stammesgeschichtlich und genetisch eng verwandten Spezies, vorkommen können, auch wenn sich mittels Datenbanksuche (URL: „<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>“, letzter Zugriff 17.07.2018) keine Hinweise auf solche Spezifitätsprobleme in den dort hinterlegten Sequenzen finden.

In PCR 1 wurde ergänzend versucht, das Risiko möglicher falsch positiver Reaktionen durch die Auswertung einer Schmelzpunktbestimmung zu reduzieren. Hierbei zeigten sich in den Kurven meist zwei doppelgipflige Maxima, was für die PCR 1 typisch ist (Moter et al., 2013). Spezifische Schmelzpunkte konnten für alle positiv befundeten Proben nachgewiesen werden.

Bei der Interpretation der ermittelten Testcharakteristika ist zu beachten, dass es sich um die Resultate mathematischer Algorithmen diskutiert werden, die nicht die wahre Häufigkeit von Besiedlungen mit *T. whipplei* berücksichtigen. Die Zuverlässigkeit der berechneten Werte wird von den oben genannten systematischen Fehlerrisiken, wie zum Beispiel Kreuzreaktionen mit phylogenetisch engverwandten Spezies beziehungsweise von zweifelhafter Sequenzstabilität der Zielgene, beeinträchtigt.

Diese Limitationen ließen sich aus den erhobenen Daten nicht auflösen und waren somit Quellen einer möglichen Verzerrung des Rechenmodells. Somit handelte es sich in dieser Arbeit um einen relativen Vergleich der Zuverlässigkeit der Testsysteme ohne letzte Sicherheit, da es keinen Goldstandard zur Kontrolle gab. Zum Ausschluss solcher Bias-Quellen kommen nur Untersuchungen mit gut charakterisiertem Patientenmaterial und histologischer Kontrolle als Goldstandard in Frage, wie sie zum Beispiel von Moter et al. (2013) für PCR 1 durchgeführt worden waren.

7.5. Praktische Anwendung der PCR-Systeme

Von der Kostenseite betrachtet, sind die in-house PCR Verbrauchsmittelkosten mit circa 2-3 Euro pro Probe bei Nutzung des Standardmixes ohne DNA-Aufreinigung anzusetzen. Das ist etwas kostengünstiger als die kommerzielle PCR von Tib MolBiol, die ohne Mastermix angeboten wird. Vorteilhaft an dieser PCR 3 war dagegen der geringe Aufwand der Durchführung und das sofortige Bereitstehen der fertigen Reaktionsgemische. Somit kann eine Verwendung im tropischen Umfeld auch durch weniger erfahrenes Personal einfacher gehandhabt werden. Die fertigen Reagenzien müssen nur bei 4-6 °C gelagert werden, weshalb das Vorhandensein eines Tiefkühlschranks keine Voraussetzung darstellt.

Die beobachteten Unterschiede der Testcharakteristika sind vor allem für Surveillance- und Punktprävalenzstudien zum Nachweis von asymptomatischen Trägern mit *T. whipplei* von Bedeutung. Im klinischen Gebrauch kann die sehr niedrige Sensitivitätsgrenze von PCR 3 eine gute Voraussetzung für Verlaufskontrollen sein. Da Patienten mit M. Whipple deutlich erhöhte Mengen von *T. whipplei* im Stuhl aufweisen (Fenollar et al., 2008a), sollten die Unterschiede der Nachweisgrenzen bei den untersuchten PCR-Systemen für die Erstdiagnose von Erkrankten jedoch keine Probleme bereiten. Als Puzzlestein im Rahmen der Diagnostik von symptomatischen Patienten kommen mithin alle Systeme in Frage, da Proben mit niedrigeren Ct-Werten von allen PCRs erkannt wurden. Ein Vergleich der PCR-Systeme mit Proben von an M. Whipple Erkrankten wäre jedoch erforderlich, um die Hypothese mit schlüssiger Evidenz abzusichern.

PCR 2.1 könnte auch als Einzel-PCR für ein Surveillance-Screening zur Anwendung kommen, da ihre Sensitivität und Spezifität für diese Anwendung mit 1 berechnet wurde. Die in-house PCRs erfüllen die Voraussetzungen für tropische Surveillance und sind zugleich kostengünstiger als der kommerzielle Ansatz. Beim unmittelbaren Vergleich der Ergebnisse der einzelnen PCR Systeme ohne mathematische Korrektur ist jedoch Vorsicht geboten, da sich deutliche Unterschiede in der Sensitivität der Protokolle zeigten.

Falls eine Benutzung der in-house PCR Techniken als Element individualmedizinischer M. Whipple Diagnostik erwogen wird, bestätigen unsere Ergebnisse die Studien von Rolain et al. (2007), dass besser mehr als eine real-time PCR durchgeführt werden sollte, um eine ausreichende diagnostische Zuverlässigkeit zu gewährleisten. So werden für die Diagnose von M. Whipple zwei PCR Ansätze, eine histologische Untersuchung und ein Abgleich mit dem klinischen Bild als notwendig empfohlen (Hagel et al., 2015).

7.6. Limitationen der Studie

Durchführung

Bei jeder PCR- basierten Diagnostik kann es während des Arbeitsablaufs zu Kontaminationen kommen, welche die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflussen. Selbstverständlich können auch menschliche Fehler, zum Beispiel beim Durchführen und Messen, oder technische Fehler vorkommen. Außerdem fehlten für die PCR-Systeme PCR 1 und 2 Inhibitionskontrollen, um mögliche Inhibitionen in die Beurteilung der in-house Techniken mit einbeziehen zu können. Damit wären falsch negative Resultate in PCR 1 und 2 auch aufgrund nicht detektierter Inhibitionen möglich.

Es handelte sich bei den verwendeten Berechnungen um verzerrungsanfällige Schätzungen von Sensitivität und Spezifität, der Qualität davon abhängig ist, wie gut die angewendeten mathematischen Modelle auf die Probenkollektive anwendbar sind. Aufgrund disproportionaler Unterschiede der Sensitivitäten für die Einzelkollektive wurden PCR 1 und 3 nicht mit dem Ansatz von Hui und Walter (1980) bewertet. Die Hauptaussagen zur möglichen Nutzung der PCR Ansätze bleiben hiervon jedoch unberührt.

Bei diskrepanten Ergebnissen wurde von einer Klonierung und Sequenzierung nach Sanger abgesehen (Sanger et al., 1977). Die Begründung hierfür lag in den fehlenden finanziellen Mitteln. Ferner standen die Sequenzen der Primer von Tib MolBiol nicht zur Verfügung.

Grenzen des Probenmaterials

Eine weitere Limitation liegt im Fehlen von Kontrollstuhlproben von M. Whipple Erkrankten. Überdies fehlten auch Vergleichsproben mit erheblichen Mengen an *T. whipplei*, wie es bei Stuhlproben von Erkrankten oft der Fall ist. Ebenso fehlten Vergleichsproben, in welchen definitiv kein *T. whipplei* war. Außerdem fehlte eine Korrelation mit Symptomen, die für das mathematische Modell jedoch irrelevant war. Tropische Proben von Patienten mit M. Whipple sind nicht realistisch zu beschaffen. So wurde aus Afrika beispielsweise lediglich ein Fall eines M. Whipple beschrieben (Berbich et al., 1967). Vorausgegangene Forschungen zu *T. whipplei* Kolonisationen belegen auch keine Assoziation mit Symptomen wie zum Beispiel Durchfall (Vinnemeier et al., 2016), so dass auch solche Parameter nicht zur Beurteilung in Frage kamen. Da es sich in dieser Arbeit um eine retrospektive Studie mit Proben aus den Jahren 2007-2017 handelte, waren diese Limitationen unabänderlich. Entsprechend konnten mit dieser Studie nur Aussagen zur Darmkolonisierung getroffen werden.

Für diese Studie wurde die DNA aus Stuhlproben gewonnen, was eine weitere Limitation mit Blick auf die klinische Interpretierbarkeit der Ergebnisse darstellt. Die Nukleinsäureextraktion aus Stuhl ist für die Diagnostik von *T. whipplei* in den deutschen Richtlinien für Ärzte sehr

umstritten (Hagel et al., 2015). Durch den engen Kontakt von Magen und Darm zur Umwelt gibt es auch regelmäßig Kolonisationen mit fakultativ pathogenen Erregern beziehungsweise ihrer DNA. Bei der Ausscheidung kann es auch zur Extraktion von DNA-Fragmenten kolonisierender Erreger kommen, welche dann in der PCR aus Stuhlproben nachweisbar sind. Trotzdem setzen einige Labore auf die Diagnostik aus Stuhlproben, da der klinisch relevante Befall sich in den Makrophagen im Dünndarm abspielt. In den deutschen Leitlinien (Hagel et al., 2015) wurde eine Diagnostik aus DNA, die aus Liquor und Blut aufgereinigt wurde, als die PCR-Methode der Wahl beschrieben, um *M. Whipple* zu diagnostizieren. Ein besonderer Vorteil der PCR-basierten Detektion von DNA aus Stuhlproben ist die Einfachheit und geringe Invasivität der Probenentnahme, im Gegensatz zum Beispiel zur Gewinnung von Liquor. Außerdem ist eine PCR in vielen Laboren durchführbar, wogegen eine Untersuchung von einem Pathologen, der die Makrophagen-Typen klassifizieren kann, nur sehr viel höherschwelliger erreichbar ist.

Ein austherapierter *M. Whipple* zeigt lediglich eine Typänderung im histologischen Präparat. Die Ziel-DNA für den PCR-Nachweis kann eliminiert sein, muss es aber nicht. Damit ist diese Situation PCR-technisch nicht von einer möglichen Neubesiedlung als asymptomatischer Träger zu unterscheiden. Bei Abflusskanalarbeitern kam es beispielsweise nach Erstkolonisation später zu einer Neubesiedelung mit einem anderen Stamm, was durch Sequenzierung gesichert wurde (Fenollar et al., 2015). Deswegen wird für die *M. Whipple* Diagnostik zu einer Kombination von histologischen Untersuchungen und PCR geraten.

Forschungen zur Punktprävalenz sowie die Surveillance in den Tropen profitieren jedoch von der sehr kostengünstigen und unkomplizierten Gewinnung von Stuhlproben für die PCR. Auch die Forschungen zu den Übertragungswegen von *T. whipplei* und den Reservoiren des Erregers profitieren von einem einfachen PCR-gestützten Nachweis.

7.7. Prävalenzanalyse

Die Prävalenz einer Erkrankung beschreibt zu einem definierten Zeitpunkt (Punktprävalenz) oder Zeitraum (Periodenprävalenz) den Anteil der Erkrankten an den Untersuchten bzw. in die Analyse Einbezogenen. In diesem Fall wurde die Besiedlungsprävalenz mittels mathematischer Algorithmen bestimmt und beschreibt jeweils die Anzahl der Träger von *T. whipplei* im Bezug zur Gesamtheit der jeweiligen Kollektive.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Besiedlungsprävalenz von 28,3% über alle PCR-Systeme für das untersuchte Kollektiv der ghanaischen Kinder berechnet, was nahezu mit dem von Vinnemeier et al. (2016) veröffentlichten Wert von 27,5% übereinstimmte. Betrachtete man die mittels der ebenfalls von Vinnemeier et al. (2016) angewendeten Kombinations-PCR 2 ermittelten Prävalenz, so war diese mit 24,3% ebenfalls mit dem eigenen

Ergebnis vergleichbar. Die, wenngleich geringen, Unterschiede resultieren daraus, dass bei gleichem Patientenkollektiv andere Proben als bei der Vinnemeier-Studie für die Untersuchung genutzt wurden. Anders als in der vorgestellten Studie wurden von Vinnemeier et al. (2016) keine Berechnungen zur Korrektur der Ergebnisse nach den Vorgaben von Rogan und Gladen (1978) angewandt, sondern es hatte eine direkte Auswertung der PCR Ergebnisse stattgefunden.

Bei Einzelauswertung der Ergebnisse von PCR 2.1 und 2.2 lagen die Prävalenzen der Gruppe ghanaischer Kinder mit 28,3% und 26,7% sehr nah an den 27,5% der von Vinnemeier et al. (2016) postulierten Besiedlungsprävalenz. Bei den Soldaten und Polizisten, welche aus tropischen Einsätzen zurückgekommen waren, betrug die Prävalenz asymptomatischer Träger 5,0% und war damit nur sehr geringfügig höher als die Besiedlung der durchschnittlichen Europäer mit *T. whipplei*, die mit 1-4% angegeben wird (Fenollar et al., 2008 a/b, 2012). Somit finden sich keine Hinweise, dass kurzfristige Tropenaufenthalte mit einem relevant erhöhten Besiedlungsrisiko durch *T. whipplei* einhergehen.

Diese Ergebnisse unterstützen nicht die These, dass eine erhöhte Gefahr für die Besiedelung mit *T. whipplei* bei kurzfristeten Tropeneinsätzen bestehen könnte. Somit kann nicht zu einer Aufnahme von *T. whipplei* in das Standardscreeningverfahren für Tropenrückkehrer geraten werden.

Die Folgen einer Erkrankung an M. Whipple sind jedoch fatal. Deshalb sollte eine Diagnostik bei auffälligen Symptomen, wie einer Kombination aus Arthritis, Gewichtsabnahme und Diarrhoe, chronisch seronegativer Arthritis, kulturnegativer Endokarditis oder Blicklähmung und Myoklonus, in Erwägung gezogen werden (Hagel et al., 2015). Bei Reisenden mit M. Whipple-typischer Symptomatik sollte *T. whipplei* mit in die möglichen Differentialdiagnosen relevanter Erreger aufgenommen und im Einzelfall mittels leitliniengerechter Diagnostik diagnostiziert werden. Dabei kann die PCR nur ein einzelnes Element unter vielen sein.

7.8. Ausblick

Weitere Forschungen zum Vergleich von verschiedenen diagnostischen Methoden zum Nachweis von *T. whipplei* sind zukünftig wünschenswert. Folgeuntersuchungen sollten Stuhlproben von M. Whipple Erkrankten sowie Stuhlproben, die von zweifelsfrei gesunden Vergleichsgruppen stammen, beinhalten. Eine weitere Untersuchung sollte zum Abgleich der Makrophagen-Typen nach Herbay (Hagel et al., 2015) aus den endoskopischen Biopsien beider Kollektive durchgeführt werden, um genauere Aussagen zur Infektionsaktivität treffen zu können. Da in der deutschen S2k-Leitlinie „Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple“ (Hagel et al., 2015) eine Diagnostik aus Liquor und Blutproben empfohlen wurde, sollte, sofern realisierbar, auch eine Testung dieses Probenmaterials von den benannten Kollektiven erwogen werden.

7.9. Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei PCR-Systeme eine befriedigende Spezifität aufwiesen. PCR 2.1 und PCR 2.2 eignen sich aufgrund ihrer Sensitivität sowohl in Kombination als auch einzeln für den Nachweis von *T. whipplei*, auch wenn diese in geringer Dichte vorliegen. Unter diesem Aspekt schnitten sowohl PCR 1 als auch 3 vergleichsweise schlechter ab. Die daraus resultierende unterschiedliche Zuverlässigkeit der Testverfahren muss berücksichtigt werden, wenn Punktprävalenz- und Surveillancestudien zum *T. whipplei*-Trägerstatus ausgewertet werden und zueinander in Bezug gesetzt werden sollen.

Jedoch können alle Verfahren grundsätzlich für Forschungszwecke zur Anwendung kommen, wenn die korrigierenden Algorithmen von Rogan und Gladen (1978) angewendet werden, wobei Sensitivität und Spezifität der Tests in die Korrektur der Ergebnisse einbezogen werden. Die sehr sensitive PCR 2.1 zeigte Potential, als alleiniges Screeningtool in Surveillance-Screenings zur Anwendung zu kommen, was durch Untersuchungen im Gefolge dieser Arbeit verifiziert werden soll.

8. Literaturverzeichnis

- Al Moussawi K, Malou N, Mege JL, Raoult D, Desnues B.
An Experimental Mouse Model to Establish *Tropheryma Whipplei* as a Diarrheal Agent.
The Journal of Infectious Diseases. 2011;204: 44–50.
- Berbich A, Delons S, Mortara F, Becker D, Reynaud R.
First Moroccan case of Whipple's disease.
Tunis Med. 1967; 45: 397-407.
- Biagi, F, Balduzzi D, Delvino P, Schieppatti A, Klersy C, Corazza GR.
Prevalence of Whipple's Disease in North-Western Italy.
European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2015; 34: 1347–48.
- Bianca Holzapfel, Lucia Wickert.
Methoden und Anwendungsgebiete Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).
Biologie unserer Zeit. 2007: 37: 120-126.
- Bentley SD, Maiwald M, Murphy LD, Pallen MJ, Yeats CA, Dover LG, Norbertczak HT, Besra GS, Quail MA, Harris DE, von Herbay A, Goble A, Rutter S, Squares R, Squares S, Barrell BG, Parkhill J, Relman DA.
Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*.
Lancet. 2003; 361: 637-44
- Diatte G, Ratmanov P, Bassene H, Raoult D, Keita AK, Roucher C, Fenollar F.
Looking for *Tropheryma Whipplei* Source and Reservoir in Rural Senegal.
The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2013; 88: 339–43.
- Dobbins WO III, Ruffin JM.
A light- and electron-microscopic study of bacterial invasion in Whipple's disease.
Am J Pathol. 1967; 51: 225–42.
- Durand DV, Lecomte C, Cathebras P, Rousset H, Godeau P, The SNFMI Research Group on Whipple Disease.
Whipple Disease Clinical review of 52 cases.
Medicine. 1997; 76: 170-84.
- Florence F, Puéchal X, und Raoult D.
Whipple's Disease.
The New England Journal of Medicine. 2007; 12: 55-66
- Fenollar F, Laouira S, Lepidi H, Rolain JM, Raoult D.
Value of *Tropheryma whipplei* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening.
Clin Infect Dis. 2008a; 47: 659-67.
- Fenollar F, Trani M, Davoust B, Salle B, Birg ML, Rolain JM, Raoult D.
Prevalence of asymptomatic *Tropheryma whipplei* carriage among humans and nonhuman primates.
J Infect Dis. 2008b; 197: 880-7.
- Fenollar F, Trape JF, Bassene H, Sokhna C, Raoult D.
Tropheryma whipplei in Fecal Samples from Children, Senegal.
Emerging Infectious Diseases. 2009a; 6: 922-4.

- Fenollar F, Rolain JM, Alric L, Papo T, Chauveheid MP, van de Beek D, Raoult D. Resistance to Trimethoprim/Sulfamethoxazole and *Tropheryma Whipplei*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009b; 34: 255–59.
- Fenollar F, Mediannikov O, Socolovschi C, Bassene H, Diatta G, Richet H, Tall A, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. *Tropheryma Whipplei* Bacteremia during Fever in Rural West Africa. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 51: 515–21.
- Fenollar F, Nicoli F, Paquet C, Lepidi H, Cozzone P, Antoine JC, Pouget J, Raoult D. Progressive Dementia Associated with Ataxia or Obesity in Patients with *Tropheryma Whipplei* Encephalitis. *BMC Infectious Diseases*. 2011;11.
- Fenollar F, Keita AK, Buffet S, Raoult D. Intrafamilial circulation of *Tropheryma whipplei*, France. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 949-55.
- Fenollar F, Marth T, Lagier JC, Angelakis E, Raoult D. Sewage Workers with Low Antibody Responses May Be Colonized Successively by Several *Tropheryma Whipplei* Strains. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 35: 51–55.
- Hagel S, Eppe HJ, Feurle GE, Kern WV, Jansen PL, Malfertheiner, Marth T, Meyer E, Mielke Moos V, von Müller L, Nattermann J, Nothacker M, Pox C, Reisinger E, Salzberger B, Salzer HJF, Weber M, Weinke T, Suerbaum S, Lohse AW, Stallmach A. S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. *Z Gastroenterol*. 2015; 53: 418-459.
- Frickmann H, Wiemer D, Frey C, Hagen RM, Hinz R, Podbielski A, Köller T, Warnke P. Low Enteric Colonization with Multidrug-Resistant Pathogens in Soldiers Returning from Deployments- Experience from the Years 2007-2015. *PLoS One*. 2016; 11: e0162129.
- Frickmann H, Schwarz NG, Wiemer DF, Fischer M, Tannich E, Scheid PL, Müller M, Schotte U, Bock W, Hagen RM. Food and drinking water hygiene and intestinal protozoa in deployed German soldiers. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2013; 3:53-60.
- García-Álvarez L, Pérez-Matute P, Blanco JR, Ibarra V, Oteo JA. High prevalence of asymptomatic carriers of *Tropheryma whipplei* in different populations from the North of Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34: 340-5.
- Gart JJ, Buck AA. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for comparison of diagnostic tests. *American Journal of Epidemiology*. 1966; 83: 593–602.
- Gautret P, Lagier JC, Benkouiten S, Fenollar F, Raoult D, Brouqui P. Does *Tropheryma whipplei* contribute to travelers' diarrhea?: A PCR analysis of paired stool samples in French travelers to Senegal. *Travel Med Infect Dis*. 2014; 12: 264-7.
- Hahn A, Luetgehetmann M, Landt O, Schwarz NG, Frickmann H.

Comparison of one commercial and two in-house TaqMan multiplex real-time PCR assays for detection of enteropathogenic, enterotoxigenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Trop Med Int Health*. 2017; 22: 1371-1376.

Herold G.

Innere Medizin: Eine Vorlesungsorientierte Darstellung; Unter Berücksichtigung Des Gegenstandskataloges Für Die Ärztliche Prüfung; Mit ICD 10-Schlüssel Im Text Und Stichwortverzeichnis.

Herold, 2015; 1: 473-4.

Hinrikson, HP, Dutly F, Nair S, Altwegg M.

Detection of Three Different Types of *Tropheryma Whipplei* Directly from Clinical Specimens by Sequencing, Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Type-Specific PCR of Their 16S-23S Ribosomal Intergenic Spacer Region.

International Journal of Systematic Bacteriology. 1999; 49: 1701–6.

Hui SL, Walter SD.

Estimating the error rates of diagnostic tests.

Biometrics. 1980; 36: 167–171.

Lagier JC, Lepidi H, Raoult D, Fenollar F.

Systemic *Tropheryma whipplei* Clinical Presentation of 142 Patients With Infections Diagnosed or Confirmed in a Reference Center.

Medicine. 2010; 89: 337-345.

Lagier JC, Fenollar F, Lepidi H, Giorgi R, Million M, Raoult D.

Treatment of Classic Whipple's Disease: From in Vitro Results to Clinical Outcome.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014; 96: 219–27.

Keita AK, Bassene H, Tall A, Sokhna C, Ratmanov P, Trape JF, Raoult D, Fenollar F.

Tropheryma whipplei: a common bacterium in rural Senegal.

PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5: e1403.

Keita AK, Raoult D, Fenollar F.

Tropheryma whipplei as a commensal bacterium.

Future Microbiol. 2012; 8: 57–71.

Keita AK, Brouqui P, Badiaga S, Benkouiten S, Ratmanov P, Raoult D, Fenollar F.

Tropheryma whipplei prevalence strongly suggests human transmission in homeless shelters.

International Journal of Infectious Diseases. 2013; 17: e67-8.

Keita AK, Dubot-Pérès A, Phommason K, Sibounheuang B, Vongsouvath M, Mayxay M, Raoult D, Newton PN, Fenollar F.

High prevalence of *Tropheryma whipplei* in Lao kindergarten children.

PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9: e0003538.

Krumkamp R, Sarpong N, Schwarz NG, Adlkofer J, Loag W, Eibach D, Hagen RM, Adu-Sarkodie Y, Tannich E, May J.

Gastrointestinal infections and diarrheal disease in Ghanaian infants and children: an outpatient case-control study.

PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9: e0003568.

La Scola B, Fenollar F, Fournier PE, Altwegg M, Mallet MN, Raoult D.

Description of *Tropheryma whipplei* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus.

Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51: 1471-9.

- Landis JR, Koch GG.
The measurement of observer agreement of categorical data.
Biometrics. 1977; 33: 159-174.
- Li, W, Fenollar F, Rolain JM, Fournier PE, Feurle GE, Muller C, Moos V.
Genotyping Reveals a Wide Heterogeneity of *Tropheryma Whipplei*.
Microbiology. 2008; 154: 521–27.
- Maibach RC, Martin Altwegg M.
Cloning and Sequencing an Unknown Gene of *Tropheryma Whipplei* and Development of Two LightCycler® PCR Assays.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 46: 181–87.
- Moter A, Schmiedel D, Petrich A, Wiessner A, Kikhney J, Schneider T, Moos V, Göbel UB, Reischl U.
Validation of an *rpoB* gene PCR assay for detection of *Tropheryma whipplei*: 10 years' experience in a National Reference Laboratory.
J Clin Microbiol. 2013; 51: 3858-61.
- Paulley JW.
A case of Whipple's disease (intestinal lipodystrophy).
Gastroenterology. 1952; 22: 128 –133.
- Ramharter M, Harrison N, Bühler T, Herold B, Lagler H, Lötsch F, Mombo-Ngoma Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, Roux V, Piette JC, Vandenesch F, Vital-Durand D, Marrie TJ.
Cultivation of the bacillus of Whipple's disease.
N Engl J Med. 2000; 342: 620–625.
- Ramharter M, Harrison N, Bühler T, Herold B, Lagler H, Lötsch F, Mombo-Ngoma G, Müller C, Adegnika AA, Kremsner PG, Makristathis A.
Prevalence and risk factor assessment of *Tropheryma whipplei* in a rural community in Gabon: a community-based cross-sectional study.
Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 1189-94.
- Raoult D, Ogata H, Audic S, Robert C, Suhre K, Drancourt M, Claverie JM.
Tropheryma whipplei twist: a human pathogenic actinobacteria with a reduced genome.
Genome Res. 2003; 13: 1800-09.
- Raoult D, Fenollar F, Rolain JM, Minodier P, Bosdure E, Li W, Garnier JM, Richet H.
Tropheryma Whipplei in Children with Gastroenteritis.
Emerging Infectious Diseases. 2010; 16: 776-82.
- Relman DA, Schmidt TM, Dermott RP, Falkow S.
Identification of the uncultured bacillus of Whipple' disease.
The new England Journal of Medicine. 1992; 327: 293-301.
- Rogan WJ, Gladen B.
Estimating prevalence from the results of a screening test.
Am J Epidemiol. 1978; 107: 71-76.
- Rolain JM, Fenollar F, Raoult D.
False positive PCR detection of *Tropheryma whipplei* in the saliva of healthy people.
BMC Microbiol. 2007; 7: 48.
- Rollin DC, Paddock CD, Pritt BS, Cunningham SA, Denison AM.

Genotypic Analysis of *Tropheryma Whipplei* from Patients with Whipple Disease in the Americas.

Journal of Clinical Pathology. 2017; 70: 891–95.

Saito H, Shiode J, Ohya S, Yao A, Saito S, Fujii M, Itoh M, Ishiyama S, Fujiwara A, Nasu J, Yoshioka M, Yamamoto K.

Whipple's Disease: A Case Report with Long-Term Endoscopic Follow-Up. *Internal Medicine*. 2018: 1-7.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977: 5463-7

Schneider T, Moos V.

Tropheryma whipplei: pathogen of Whipple's disease and more.

Dtsch Med Wochenschr. 2015; 140: 428-32.

Schöniger-Hekele M, Petermann D, Weber B, Müller C.

Tropheryma whipplei in the environment: survey of sewage plant influxes and sewage plant workers.

Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 2033-5.

Sloan LM, Rosenblatt JE, Cockerill FR.

Detection of *Tropheryma Whipplei* DNA in Clinical Specimens by LightCycler Real-Time PCR.

Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 3516–18.

Sokhna C, Mediannikov O, Fenollar F, Bassene H, Diatta G, Tall A, Trape JF, Drancourt M, Raoult D.

Point-of-care laboratory of pathogen diagnosis in rural Senegal.

PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7: e1999.

Staroscik, A.

The Scienceprimer. <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realttime-pcr>. letzter Zugriff am 28. Mai 2018.

Tib MolBiol (Herstellerangaben)

LightMix Modular T.whipplei.

Cat.-No. 53-0606-96.

Vinnemeier CD, Klupp EM, Krumkamp R, Rolling T, Fischer N, Owusu-Dabo E, Addo MM, Adu-Sarkodie Y, Käsmäier J, Aepfelbacher M, Cramer JP, May J, Tannich E.

Tropheryma whipplei in children with diarrhoea in rural Ghana.

Clin Microbiol Infect. 2016; 22: e1-65.

Von Herbay A, Maiwald M, Ditton HJ.

Histology of intestinal Whipple's disease revisited. A study of 48 patients.

Virchows Arch. 1996; 429: 335-343.

Von Herbay A, Otto HF, Stolte M, Borchard F, Kirchner T, Ditton HJ, Maiwald M.

Epidemiology of Whipple's disease in Germany. Analysis of 110 patients diagnosed in 1965-95.

Scand J Gastroenterol. 1997; 32: 52–57.

Von Herbay A.

Whipple's disease. Histologic diagnosis after the discovery of *Tropheryma whippelii*.

Der Pathologe. 2001; 22: 82-88.

Whipple GH.

A hitherto undescribed disease characterized anatomically by deposits of fat and fatty acids in the intestinal and mesenteric lymphatic tissues.

Bull Johns Hopkins Hosp. 1907; 18: 382–93.

Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JAP.

Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium.

Lancet. 1991; 338: 474-5.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mir bei der Fertigstellung dieser Doktorarbeit geholfen haben. Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Podbielski für die Bereitstellung dieses Themas, die Hilfe beim Schreiben der Dissertation und die somit verbundene Möglichkeit, tiefer in die Erkenntniswelt der Mikrobiologie und Tropenmedizin einzudringen.

Des Weiteren möchte ich Dr. med. Hagen Frickmann und der ganzen Klinik XXI des Bundeswehr Krankenhauses Hamburgs für die sehr liebevolle Aufnahme in ihrer Dienststelle danken. Bei Dr. med Hagen Frickmann möchte ich mich zusätzlich dafür bedanken, dass er mir jederzeit für Fragen, Anregungen und Diskussionen zur Seite gestanden hat, mich durch die Versuche begleitet hat und mit mir die Veröffentlichung des Themas fertiggestellt hat. Ebenfalls möchte ich Annett Michel und Simone Priesnitz für die immer dagewesene Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken. Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. Rebecca Hinz bedanken für die konstruktive Kritik, die die Arbeit weit vorangetrieben hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dipl. math. Dr. rer. med. Andreas Hahn, welcher mir für jede Frage zur statistischen Auswertung zur Seite stand. Ferner bedanke ich mich bei Judith Kikhney für alle Ratschläge und Tipps zur Durchführung der PCR 1, bei Egbert Tannich für die Bereitstellung der ghanaischen Proben und bei Olfert Landt für die Bereitstellung der Kits von der *T. whipplei* PCR 3.

Mein besonderer Dank gilt zuletzt meinen Eltern Manuela und Erhard für die Ermöglichung des Studiums und der dauerhaften Unterstützung innerhalb der Arbeit. Das Beste kommt bekanntlich ja zum Schluss, so möchte ich meinem Freund Janek für das Korrekturlesen danken und all meinen Freunden, welche mich immer mental unterstützt haben und neben der vielen Zeit am Schreibtisch auch für genug Abwechslung gesorgt haben.

10. Thesenblatt

1. Eine höhere Prävalenz ist in den Proben von den ghanaischen Kindern zu erwarten, welche ungefähr die von Vinnemeier et al. (2016) beschriebene Prävalenz erreichen kann.
2. Für Arbeiter, welche in tropischen Einsatzgebieten befristet eingesetzt werden, besteht ein allenfalls moderates Besiedlungsrisiko mit *T. whipplei*, weshalb die Prävalenz geringfügig höher als 1-4% liegt.
3. Die drei PCR Systeme unterscheiden sich in Ihrer Sensitivität und Spezifität.
4. Alle PCR Systeme können *T. whipplei* nachweisen und sind für Punktprävalenz- und für Surveillancestudien einsetzbar und ihre Ergebnisse nach Einsatz mathematischer Korrekturverfahren vergleichbar.