

Aus dem Institut für Tropenmedizin
der Universität Tübingen
Direktor : Professor Dr. J. Knobloch

**Vorkommen von *Entamoeba histolytica* und
Entamoeba dispar in der Südosttürkei :
eine epidemiologische Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Stefan Wolfgang Schindler
aus Waldbröl

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Knobloch

2. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Knobloch und Frau Dr. Brigitte Walderich am Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen entstanden und wurde finanziell im Rahmen des Avicenna-Projektes von der Europäischen Union unterstützt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Knobloch für die Vergabe des Themas und für seine Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Brigitte Walderich bedanken für die persönliche Betreuung, ihre ständige Erreichbarkeit und ihre Bereitschaft, alle Fragen im theoretisch-praktischen sowie im organisatorischen Bereich zu lösen. Ihre vielfältigen Anregungen der Planung, Durchführung und Ausarbeitung der Studie und ihre praktische Unterstützung im Labor waren mir eine große Hilfe.

Für die Betreuung bei der Arbeit in der Türkei bedanke ich mich bei Herrn Dr. Kadri Gül sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Mikrobiologischen Institutes der Universität Diyarbakir. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Vedat Göral und allen Helfern in Diyarbakir, die bei dieser Studie mitgewirkt haben. Mein besonderer Dank gilt auch den Bewohnern der drei Dörfer Hydreyaz, Kozan, und Bagpunar für ihre ausgesprochen herzliche Gastfreundschaft und die Bereitschaft an der Studie teilzunehmen.

Herrn Dr. J. P. Ackers und Mitarbeitern aus dem Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, möchte ich mich erkenntlich zeigen für die kolorimetrische PCR-Analyse meiner in der Türkei gesammelten Stuhlproben. Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern des Instituts für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen für ihre praktische Unterstützung, wie auch Herrn Prof. Dr. K. Dietz und Herrn Dr. Martin Eichner vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die persönliche Anleitung zur statistischen Auswertung meiner Daten.

Weiterhin danke ich Herrn Rabe vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg und Herrn Prof. D. Mirelman des Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, für die Überlassung eines Referenzstammes von *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar*.

Meinen Eltern bin ich für die finanzielle Unterstützung und sonstige Hilfe sehr dankbar.

Meiner Mutter

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis:

| | Seite |
|---|-------|
| 1. <u>Einleitung</u> | 1 |
| 1.1 Amöbiasis: ein Forschungsüberblick | 1 |
| 1.2 <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> : zur Morphologie, Übertragung, Pathogenität und Verbreitung | 3 |
| 1.2.1 Morphologie von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 3 |
| 1.2.2 Übertragung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 4 |
| 1.2.3 Pathogenität von <i>Entamoeba histolytica</i> | 5 |
| 1.2.4 Verbreitung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 5 |
| 1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis | 6 |
| 1.3.1 Klinik der Amöbiasis | 6 |
| 1.3.2 Diagnostik der Amöbiasis | 8 |
| 1.3.3 Therapie der Amöbiasis | 10 |
| 1.4 Methoden zur Differenzierung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 11 |
| 1.4.1 Hexokinase-Isoenzymauftrennung mittels Gelelektrophorese | 11 |
| 1.4.2 Differenzierung mittels Polymerase-Kettenreaktion | 11 |
| 1.4.3 Amplifizierung der DNA aus Stuhlproben mittels kolorimetrischer Polymerase-Kettenreaktion | 13 |
| 1.4.4 Immunologische Nachweismethoden | 13 |
| 1.5 Epidemiologische Studien zur Verbreitung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 15 |
| 1.6 Seroepidemiologische Studien zur Verbreitung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 18 |
| 1.7 Fragestellung | 21 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2. | <u>Material und Methoden</u> | 22 |
| 2.1 | Material | 22 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 22 |
| 2.1.2 | Enzyme | 24 |
| 2.1.3 | Nucleotide Primer und DNA-Sonden | 24 |
| 2.1.4 | Antibiotika | 25 |
| 2.1.5 | Mikroorganismen | 25 |
| 2.1.6 | Puffer und Lösungen | 26 |
| 2.2 | Methoden | 27 |
| 2.2.1 | Studienaufbau | 27 |
| 2.2.2 | Fragebögen | 28 |
| 2.2.3 | Auswahl und Aufbereitung der Stuhlproben | 28 |
| 2.2.4 | Auswahl der Blutproben | 29 |
| 2.2.5 | Anzucht der Referenzstämme von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> und Referenzproben für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und ELISA | 29 |
| 2.2.6 | Kulturbedingungen und Medien für <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 29 |
| 2.2.6.1 | Medien und Lösungen zur Kultivierung von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> nach ROBINSON | 30 |
| 2.2.6.2 | Anzucht von <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> im ROBINSON-Medium | 32 |
| 2.2.7 | Probenvorbereitung für Hexokinase-Isoenzymauftrennung und Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 32 |
| 2.2.7.1 | Zellaufschluss und Probenvorbereitung für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung | 33 |
| 2.2.7.2 | DNA-Gewinnung für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 33 |
| 2.2.8 | Hexokinase-Isoenzymauftrennung mittels Stärkegelelektrophorese | 33 |
| 2.2.9 | Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 35 |
| 2.2.9.1 | Enzym-Ansatz für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 36 |
| 2.2.9.2 | Amplifizieren der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion | 37 |
| 2.2.9.3 | Agarosegelelektrophorese | 38 |
| 2.2.10 | Kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben | 38 |
| 2.2.10.1 | Gewinnung der DNA aus Stuhlproben | 39 |
| 2.2.10.2 | Amplifizieren der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion | 39 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2.10.3 | Photometrische Bestimmung des PCR-Ergebnisses mit Hilfe eines ELISAs | 40 |
| 2.2.11 | Antikörpernachweis mittels ELISA | 41 |
| 2.2.12 | Statistische Auswertung | 42 |
| <u>3.</u> | <u>Ergebnisse</u> | 43 |
| 3.1 | Ergebnisse der Fragebögen | 43 |
| 3.1.1 | Auswertung der personenbezogenen Daten | 43 |
| 3.1.2 | Ergebnisse aus ökonomischen und sozialen Daten | 45 |
| 3.1.3 | Ergebnisse aus Trinkwasserversorgung, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten | 48 |
| 3.2 | Stuhlproben | 49 |
| 3.2.1 | Ergebnisse aus mikroskopischer Untersuchung | 49 |
| 3.2.2 | Ergebnisse der Anzucht | 51 |
| 3.3 | Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion | 52 |
| 3.3.1 | Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung | 52 |
| 3.3.2 | Ergebnisse der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 53 |
| 3.3.3 | Ergebnisse der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben | 53 |
| 3.3.4 | Gesamtergebnis aus der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion | 54 |
| 3.4 | Ergebnisse aus der Antikörperbestimmung | 55 |
| 3.5 | Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden | 57 |
| 3.5.1 | Vergleich der stuhlmikroskopischen Untersuchung von <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i> , <i>Entamoeba coli</i> , <i>Entamoeba hartmanni</i> und <i>Jodamoeba</i> <i>bütschlii</i> | 57 |
| 3.5.2 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion | 58 |
| 3.5.3 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit der Serumuntersuchung | 61 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5.4 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus den Fragebögen und den serologischen Ergebnissen | 63 |
| 3.5.4.1 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den personenbezogenen Daten | 63 |
| 3.5.4.2 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den ökonomischen und sozialen Daten | 65 |
| 3.5.4.3 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus Trinkwasser-, Brauchwasser-versorgung und Hygieneverhalten | 67 |
| 3.5.4.4 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den serologischen Daten | 69 |
| 3.5.5 | Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchung mit den Fragebögen | 71 |
| 3.5.6 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit der untersuchten Bevölkerung in Hydurelyaz, Kozan und Bagpınar (Erstellung eines Risikoprofiles) | 74 |
| 3.5.6.1 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den personenbezogenen Daten | 75 |
| 3.5.6.2 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den ökonomischen und sozialen Daten | 76 |
| 3.5.6.3 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus Trinkwasser-, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten | 78 |
| 3.5.6.4 | Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus serologischen Ergebnissen | 79 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|-----|
| <u>4.</u> | <u>Diskussion</u> | 81 |
| 4.1 | Korrekturfaktoren für die Ergebnisse | 81 |
| 4.1.1 | MIF-C-Methode und erforderliche Korrektur der Ergebnisse | 81 |
| 4.1.2 | Anzüchtungsrate der Kulturen nach ROBINSON und erforderliche Korrektur der Ergebnisse | 85 |
| 4.2 | Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung | 88 |
| 4.3 | Ergebnisse der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion | 89 |
| 4.4 | Ergebnisse der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben | 91 |
| 4.5 | Korrigierte Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion | 92 |
| 4.6 | Vergleich der korrigierten Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Ergebnissen weltweit und in der Türkei | 93 |
| 4.7 | Serologische Ergebnisse | 94 |
| 4.8 | Risikofaktoren für die untersuchten Personen | 97 |
| 4.8.1 | Personenbezogene Risikofaktoren | 97 |
| 4.8.2 | Ökonomische und soziale Risikofaktoren | 100 |
| 4.8.3 | Risikofaktoren bezüglich des Trinkwassers, des Brauchwassers und des Hygieneverhaltens | 101 |
| 4.9 | Schlussfolgerungen | 104 |
| <u>5.</u> | <u>Zusammenfassung</u> | 106 |
| <u>6.</u> | <u>Anhangstabelle und Abbildungen</u> | 108 |
| 6.1 | Anhangstabelle | 108 |
| 6.2 | Abbildung: Personenbezogener Fragebogen | 116 |
| 6.3 | Abbildung: Haushaltsbezogener Fragebogen | 117 |
| 6.4 | Abbildung: Protokoll zur Mikroskopie, Kultur und Blutuntersuchung | 118 |
| <u>7.</u> | <u>Literaturverzeichnis</u> | 119 |
| <u>8.</u> | <u>Lebenslauf</u> | 134 |

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Amöbiasis: ein Forschungsüberblick

Die Amöbiasis ist eine weltweit verbreitete Krankheit, die durch das Protozoon *Entamoeba histolytica* verursacht wird. Hauptverbreitungsgebiete der Amöbiasis sind die tropischen und subtropischen Länder. In der Medizin spielten schon seit geraumer Zeit Fieber und Dysenterie eine große Rolle. Hippokrates berichtete als erster von einer ulzerativen Erkrankung des Darmes (KAPFERER, 1930). Einen Zusammenhang zwischen den im menschlichen Stuhl gefundenen Amöbentrophozoiten und den pathologischen Veränderungen des Darmes wurde jedoch erstmals von LÖSCH im Jahre 1875 anhand eines an Amöbenruhr erkrankten Patienten aus St. Petersburg beschrieben (LÖSCH, 1875). Obgleich LÖSCH sowohl der Nachweis von Erythrozyten in diesen Trophozoiten als auch die Infektion eines Hundes mit denselben Trophozoiten gelang, war es nicht möglich, die klinischen Zeichen einer Amöbenruhr durch Infektion eines Menschen zu erreichen. Dies führte ihn zu der Überzeugung, dass nicht ursächlich die Amöben für diese Krankheitssymptome verantwortlich seien. KOCH wies 1883 Amöben in Leberabszessen nach (KOCH, 1887). Im Jahre 1891 zeigten COUNCILMAN & LAFLEUR den klinisch-pathologischen Zusammenhang zwischen *Entamoeba histolytica* mit Dysenterie und Leberabszessen (COUNCILMAN und LAFLEUR, 1891). QUINCKE und ROOS beschrieben 1893 die Zystenform von *Entamoeba histolytica*. (QUINCKE & ROOS, 1893). SCHAUDINN führte 1903 die Bezeichnung *Entamoeba histolytica* für die krankheitserregenden Amöben und *Entamoeba coli* für die nicht krankheitserregenden Amöben ein (SCHAUDINN, 1903).

BRUMPT schlug 1925 die Bezeichnung *Entamoeba dispar* für eine apathogene Spezies vor, die sich zwar morphologisch nicht von der krankheitserregenden Spezies *Entamoeba histolytica* unterscheiden ließ, aber keine Erythrozyten zu phagozytieren schien. BRUMPT setzte darum die apathogene Spezies von der pathogenen Spezies ab, die er dann „*Entamoeba dysenteriae*“ nannte (BRUMPT, 1925). Obwohl SIMIC durch human- und tierexperimentelle Studien die von BRUMPT beschriebene Existenz zweier morphologisch identischer Spezies zu bestätigen vermochte (SIMIC 1931a; SIMIC 1931b; SIMIC 1931c), erhielt BRUMPTs Vorschlag wenig Zustimmung.

Nachdem in einer Studie eine Differenzierung von asymptomatischen und symptomatischen Personen mittels Isoenzymmusterbestimmung gelang (SARGEAUNT et al., 1978a), ist die von BRUMPT aufgestellte Hypothese eine heute allgemein anerkannte Meinung. Man unterscheidet somit zwei Spezies, eine pathogene, nämlich *Entamoeba histolytica*, und eine apathogene, *Entamoeba dispar*, deren Darmlumenformen morphologisch identisch sind (SARGEAUNT et al., 1978a; TANNICH et al., 1989; GARFINKEL et al., 1989; KRETSCHMER, 1990; CLARK & DIAMOND, 1991b; SPICE & ACKERS, 1992; BRUCKNER, 1992; DIAMOND & CLARK, 1993; HORSTMANN, 1994; RAVDIN, 1995; KNOBLOCH et al., 1996).

WALKER und SELLARDS führten kontrollierte Studien an philippinischen Häftlingen mit *Entamoeba histolytica* durch und stellten fest, dass die Übertragung höchstwahrscheinlich durch Zysten und nicht durch Trophozoiten zustande gekommen war. Dabei vermuteten sie, dass die asymptomatischen Träger wahrscheinlich das Erregerreservoir darstellten und somit für die Übertragung von *Entamoeba histolytica* verantwortlich waren. Ferner postulierten sie individuelle Unterschiede im Erkrankungsrisiko sowie Unterschiede in der Virulenz der Erreger (WALKER & SELLARDS, 1913).

Erste Versuche einer Kultivierung von *Entamoeba histolytica* wurden von MUSGRAVE und CLEGG mit Bakterien auf Blutagarplatten unternommen (MUSGRAVE & CLEGG, 1905). Jedoch erst unter Verwendung von Lockes Lösung, Eiern und entweder Albumin oder Serum war eine Routinekultivierung möglich (BOECK & DRBOHLAV, 1925). Weitere Verbesserungen wurden 1946 unabhängig von BALAMUTH und JONES, und 1968 von ROBINSON erzielt, so dass seitdem eine effektive, kostengünstige und routinemäßige Kultivierung von Amöben zur Verfügung steht (BALAMUTH, 1946; JONES, 1946; ROBINSON, 1968).

Ein großer Fortschritt bedeutete außerdem die axenische Kultivierung von Amöben, d. h. die Kultivierung ohne andere Mikroorganismen (DIAMOND, 1961; DIAMOND, 1968), und die verbesserte xenische Kultivierung mit dem TYS-GM-9-Medium (DIAMOND, 1982). Dadurch konnte auch die Herstellung von Forschungs- und Testmaterial, wie z. B. Antigene für ELISA-Tests, wesentlich vereinfacht und verbessert werden.

1.2 *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*: zur Morphologie, Übertragung, Pathogenität und Verbreitung

1.2.1 Morphologie von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Bei der Spezies *Entamoeba histolytica* handelt es sich um die pathogene Ruhrämöbe, die durch breiigen Durchfall, schwere Dysenterie, bis hin zur Darmperforation, Peritonitis und Abszessbildung symptomatisch werden kann. Die Spezies *Entamoeba dispar* lebt ausschließlich als harmloser Kommensale im Darm und verursacht keine krankhaften Veränderungen (DIAMOND & CLARK, 1993; HORSTMANN, 1994; KNOBLOCH et al., 1996). Zum Nachteil der klinischen Diagnostik lassen sich die Darmlumenformen dieser zwei Amöbenarten jedoch bei lichtmikroskopischer Betrachtung nicht unterscheiden.

Bei *Entamoeba histolytica* können drei Stadien der Entwicklung unterschieden werden: Zysten, Minutaform und Magnaform. Bei *Entamoeba dispar* lassen sich lediglich Zysten und Minutaform unterscheiden (siehe Abbildung 1.1). Die Zysten von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* besitzen, abhängig von ihrer Reife, gewöhnlich ein, zwei oder vier Kerne und feingekörntes Zytoplasma mit Glykogen-Vakuolen. Die reifen vierkernigen Zysten von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*, sind ca. 10 bis 20 µm groß und besitzen feines, gleichmäßig verteiltes peripheres Kernchromatin und gewöhnlich einen zentral gelegenen Nukleolus. Zysten von *Entamoeba coli* hingegen besitzen gewöhnlich zwei bis acht Kerne und weisen gröberes, weniger gleichmäßig verteiltes peripheres Kernchromatin und einen eher exzentrisch gelegenen Nukleolus auf. Charakteristisch für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* sind außerdem sogenannte Chromidialkörper mit abgerundeten Enden, die aus kondensierten Ribosomen bestehen und im Plasma der Trophozoiten sowie vor allem in den unreiferen Stadien der Zysten vorkommen (BRUCKNER, 1992). Auch das Zytoplasma von *Entamoeba histolytica*- und *Entamoeba dispar*-Trophozoiten, welches viele kleine Vakuolen enthält, erscheint fein granuliert (BRUCKNER, 1992). Die Magnaform (20-60 µm) und die Minutaform (10-20 µm) bilden bruchsackartige („fingerartige“) Pseudopodien, mit denen sie sich amöboid fortbewegen können (GUERRANT, 1986). Die Magnaform, die die invasive Form darstellt, ist aufgrund ihrer phagozytierten Erythrozyten (siehe Abbildung 1.1) von der Minutaform zu unterscheiden.

Abbildungen 1.1: Stadien der Entwicklung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

1. Zyste mit typischem Chromidialkörper
2. Magnaform mit phagozytierten Erythrozyten
3. Minutaform
4. Magnaform mit phagozytierten Erythrozyten

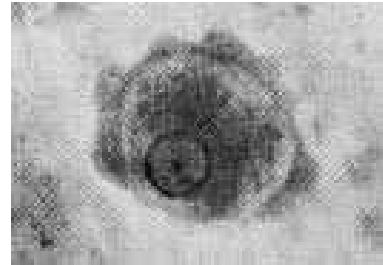
1.



2.



3.



4.



1.2.2 Übertragung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Zysten von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* sind in einer feuchten Umgebung mehrere Wochen bis Monate lebensfähig (NOBLE & NOBLE, 1976; BRUCKNER, 1992) und werden entweder über fäkalienerunreinigtes Wasser und verunreinigte Speisen übertragen oder

aber über Fliegen, die Zysten von Kot aufnehmen und auf Nahrungsmitteln ablegen (GUERRANT, 1986, PIEKARSKI, 1987).

1.2.3 Pathogenität von *Entamoeba histolytica*

Durch noch nicht genügend bekannte Prozesse entwickelt sich gelegentlich die Minutaform von *Entamoeba histolytica* zur Magnaform. Dyspeptische Störungen und Subazidität, wie sie bei der physiologischen Belastung in den Tropen häufig sind, scheinen diesen Umwandlungsprozess zu begünstigen (FLEISCHER & TANNICH, 2000).

1.2.4 Verbreitung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Da die Unterscheidung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in der klinischen Diagnostik erst Anfang bis Mitte der neunziger Jahre umgesetzt wurde, sind alle früheren Wertangaben sowie Schätzungen der an *Entamoeba histolytica* infizierten Menschen nur mit Vorsicht und nach genauer Betrachtung zu benutzen. Allerdings kann mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, dass die Angaben über die hier besprochenen Amöbeninfektionen bis Ende der achtziger Jahre nur zu etwa 10 % *Entamoeba histolytica* nach der heutigen Nomenklatur betreffen.

Für das Jahr 1981 schätzte WALSH die Zahl der weltweit mit *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* Infizierten auf ca. 480 Millionen (WALSH, 1986), von denen die meisten in tropischen und subtropischen Ländern mit mangelhaftem Gesundheitswesen lebten. Weiterhin gibt WALSH einen Wert von 34 bis 50 Millionen für die Menschen an, die weltweit klinische Symptome einer *Entamoeba histolytica*-Infektion aufweisen (WALSH, 1986). In einer neueren Arbeit aus dem Jahre 2000, die sich ebenfalls auf WALSH bezieht und darum nicht als eine Neueinschätzung betrachtet werden darf, wird allerdings ein Wert von ungefähr 50 Millionen für die Anzahl der an *Entamoeba histolytica* infizierten Menschen angeführt (QUE & REED, 2000). Von den Menschen mit klinischen Symptomen einer Amöbeninfektion entwickeln nur ca. 10 % bzw. 2 bis 20 % im Laufe der Zeit

eine invasive Amöbiasis (BRUCKNER, 1992; RAVDIN, 1995) und von diesen sterben jährlich wiederum 40.000 bis 110.000 (WALSH, 1986; GUERRANT, 1986; QUE & REED, 2000).

1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis

Klinische Symptome werden nur von *Entamoeba histolytica* verursacht. *Entamoeba dispar* gilt heute als ein harmloser im Darm lebender Kommensale, der keine Symptome hervorrufen kann und daher auch nicht therapiert werden muss.

1.3.1 Klinik der Amöbiasis

An erster Stelle sind die intestinalen Manifestationen zu nennen. In der Regel kennzeichnen sich diese durch eine gemäßigte Symptomatik mit Bauchschmerzen und ein bis zwei Wochen andauernde wässrig-breiige Durchfälle. Ein schwererer Verlauf geht mit „schleimig-blutig-himbeergeleeartigen“ Durchfällen einher. Bei einem Drittel der Fälle tritt Fieber auf (ADAMS & MACLEOD, 1977a; RAVDIN, 1995; REED, 1992). Die bei mangelernährten oder immunsupprimierten Personen und bei Kindern unter zwei Jahren vorkommende fulminante Kolitis tritt ganz plötzlich auf mit profusen blutigen Stühlen und diffusen abdominalen Schmerzen, und ist mit Fieber vergesellschaftet. Die fulminante Kolitis führt bei Kindern bis zu 75 % der Fälle zu einer Kolonperforation (REED, 1992). Sie hat insgesamt eine Letalität von über 50 % (RAVDIN, 1995).

Die bei intestinaler Amöbiasis auftretenden Bauchschmerzen reichen von Druckgefühl, leicht ziehenden Schmerzen und Koliken vor der Defäkation bis hin zu Tenesmen und Schmerzen, die in zwei Drittel der Fälle in den Rücken einstrahlen (KNOBLOCH et al., 1996; RAVDIN, 1995; REED, 1992).

Komplikationen der intestinalen Amöbiasis sind in ein bis vier Prozent der Fälle die gefährliche Darmperforation mit Peritonitis, ein toxisches Megakolon und gelegentlich eine spezifische Appendizitis (GUERRANT, 1986). In ungefähr ein Prozent der Fälle wird ein granulomatöser Tumor, das sogenannte Amöbom, beobachtet (REED, 1992; KNOBLOCH et al., 1996).

An zweiter Stelle sind die extraintestinalen Manifestationen zu nennen. Dabei ist der „Amöbenleberabszess“, eigentlich eine Kolliquationsnekrose, am häufigsten. Dieser enthält im

Zentrum gewöhnlich keine Amöben und besteht typischerweise aus opakem, rot bis dunkelbraunem, nekrotischem Material (ADAMS & MACLEOD, 1977b). Trophozoiten sind nur am Rande des Abzesses zu finden.

Die Patienten mit Leberabszess haben eine akute Symptomatik mit oft weniger als zehn Tagen andauernden Oberbauchschmerzen im rechten oberen Quadranten (KATZENSTEIN et al., 1982). Die Schmerzen können in die Schulter und den Rücken einstrahlen, und es lässt sich fast immer ein Thoraxkompressionsschmerz nachweisen. Außerdem tritt intermittierendes oder remittierendes Fieber auf, und eine Abwehrspannung kann ebenfalls nachweisbar sein. Epigastrische Schmerzen im Zusammenhang mit linksseitigem Leberabszess bereiten differenzialdiagnostische Probleme (KNOBLOCH et al., 1996). Chronische Krankheitsverläufe mit geringem Krankheitsgefühl sind selten (KNOBLOCH et al., 1996) und subakute Verläufe zeigen in weniger als 50 % der Fälle Fieber (REED, 1992). Bei ca. 50 % der Personen mit extraintestinaler Amöbiasis und bei ca. zwei Drittel der Personen mit Leberabszess ist keine intestinale Amöbiasis in der Anamnese feststellbar (ADAMS & MACLEOD, 1977b; IRUSEN et al., 1992). Nur ein Drittel der Personen gibt gleichzeitig eine Diarrhö an (REED, 1992). Die Leber ist bei akutem Verlauf in ca. einem Drittel der Fälle vergrößert und schmerzhaft (REED, 1992; KATZENSTEIN et al., 1982). Die Serumwerte für Transaminasen sind meist nur geringfügig erhöht. Die Beteiligung der cholestaseanzeigenden Enzyme hängt von der Lokalisation des Abszesses und dem daraus resultierenden Druck auf die Gallenwege ab (KNOBLOCH et al., 1996; REED, 1992), dabei ist ein Ikterus ungewöhnlich (ADAMS & MACLEOD, 1977b; RAVDIN, 1995).

Komplikationen eines Leberabszesses sind in 20 bis 35 % der Fälle die pleuropulmonale Amöbiasis mit Perforation in den Pleuraraum, Pleuraempyem, Lungenabszess und hepatobronchiale Fistel. In 2 bis 7,5 % der Fälle kommt eine Perforation in die Bauchhöhle vor (REED, 1992). Als schwerste Komplikation tritt in 1,5 % der Fälle die Perforation in das Perikard auf (ADAMS & MACLEOD, 1977b). Selten kommt es zur hämatogenen Absiedlung von Trophozoiten in das Gehirn, die Milz, die Nieren, die Haut oder die Gelenke (THAN-SAW et al., 1992).

1.3.2 Diagnostik der Amöbiasis

Die Diagnostik einer Infektion mit *Entamoeba histolytica* sollte durch den mikroskopischen Nachweis von Trophozoiten mit phagozytierten Erythrozyten nach Möglichkeit mit noch warmen Stuhl durchgeführt werden. Dabei sollten bei ausbleibendem Nachweis immer mehrere Proben untersucht werden. Dies erlaubt die sofortige Diagnose der Amöbenkolitis und gilt als Goldstandardmethode. Ist eine sofortige Stuhluntersuchung nicht möglich, sollte der Stuhl gekühlt (RAVDIN, 1995) oder mit alkoholischer Kupfersulfatlösung oder Formaldehydlösung fixiert werden (HOREN, 1981). Als Ausschlussdiagnose und zur Therapiekontrolle sollten mindestens drei Stuhlproben an verschiedenen Tagen z. B. mit der Merthiolat-Jodid-Formaldehyd-Konzentrierungs-Methode (MIF-C-Methode) untersucht werden (SAPERO & LAWLESS, 1953; ALDEEN et al., 1993). Der Nachweis mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Isoenzymauftrennung mittels Gelelektrophorese sind bei erfolgreicher Stuhlkulturanzucht hilfreich, jedoch aufgrund des zeitlichen Aufwandes und verschiedener Probleme bei der Kultivierung der Amöben langwierig (RAVDIN, 1995). Ein Testverfahren zum routinemäßigen Nachweis von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* ist mit der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) gegeben. Inzwischen haben sich auch unterschiedliche Stuhl-ELISA-Kits etabliert, die mit Hilfe verschiedener Antikörper gegen ein *Entamoeba histolytica* spezifisches Oberflächenglykoprotein eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit erreichen. Darüber hinaus stellen diese Kits ein schnelles Diagnostikverfahren dar.

Durch die oben beschriebenen nicht-invasiven Nachweismethoden können endoskopisch-biopsische Methoden vermieden werden (KNOBLOCH et al., 1996). Spielt sich jedoch der Krankheitsprozess im Colon ascendens ab, so gelingt der Nachweis nicht immer, wobei dann eine vorsichtig durchgeführte Rektosigmoido-Koloskopie mit Randbiopsie des oftmals charakteristischen Ulkus oder der Schleimhaut mit nachfolgender mikroskopischer Untersuchung diagnostisch sein kann (RAVDIN, 1995).

Die Diagnose des Amöbenleberabszesses beruht auf bildgebenden Verfahren und dem simultanen Nachweis spezifischer Serumantikörper (KNOBLOCH et al., 1996). Der Nachweis von Serumantikörpern gegen *Entamoeba histolytica* ist für Personen aus nicht endemischen Gebieten in 85-95 % der Fälle positiv bei invasiver intestinaler Amöbiasis und extraintestinaler Amöbiasis (RAVDIN et al., 1990; RAVDIN, 1995). Es ist jedoch auch möglich, dass ein ausschließlicher Darmlumenbefall mit *Entamoeba histolytica* zur Bildung spezifischer

Serumantikörper führt (KNOBLOCH et al., 1996). Als schnelle und risikoarme Standardmethode bei der Diagnose von Leberabszessen ist die Ultraschallmethode verfügbar. Dies gilt sowohl für den differenzialdiagnostischen Ausschluss (Gallensteine, andere Obstruktionen etc.) als auch für den Nachweis, der sich typischerweise als ein klar begrenztes, inhomogenes, rund ovaläres, echoarmes Areal mit dorsaler Schallverstärkung darstellt (RAVDIN, 1995). Der Abszess kann aber auch, insbesondere in den frühen Stadien, echoreich erscheinen (STRECKER et al., 1991; AHMED et al., 1992). Zu Beginn der Erkrankung, wenn die Reflexunterschiede zwischen Nekrose und gesundem Leberparenchym noch gering sind, kann eine Computertomographie empfindlicher als die Sonographie sein (KNOBLOCH et al., 1996). Auch ein rupturierter Abszess oder anatomische Gegebenheiten können Schwierigkeiten bereiten, einen Abszess sonographisch darzustellen. In solchen Fällen ist eine Computertomographie oder eine Magnetresonanztomographie erforderlich (RAVDIN, 1995). Die Punktion eines Abszesses zum direkten Nachweis von Amöben ist nicht indiziert, da diese im Punktat nur selten gefunden werden, und weil sie randständig im noch gesunden Lebergewebe parasitieren (KNOBLOCH et al., 1996).

Für die epidemiologischen Studien sind die Verfahren wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Isoenzymauftrennung mittels Gelelektrophorese zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* zu zeit- und kostenaufwendig und haben deshalb die benötigte Datenerhebung bislang erschwert. Mit neu erprobten Methoden wie die oben erwähnten Stuhl-ELISA-Kits können ohne zeitaufwendiges Kultivieren von Amöben epidemiologische Studien angelegt werden. Der Einsatz von Stuhl-ELISA-Kits zur Bestimmung von *Entamoeba histolytica* in endemischen Gebieten der Erde ist 1997 von der Weltgesundheitsorganisation als Empfehlung ausgesprochen worden.

Zur Differenzialdiagnose einer Amöbiasis wäre Folgendes zu erwähnen: Die akute intestinale Amöbiasis muss von einer bakteriellen Kolitis abgegrenzt werden. Eine häufig durch Bakterientoxine verursachte Reisediarrhö darf dann nicht weiter angenommen werden, wenn diese nicht innerhalb einiger Tage sistiert (KNOBLOCH et al., 1996). Bei blutig-schleimigen Durchfällen ist die wichtigste Differenzialdiagnose die Shigellose. Weitere bakterielle Durchfallerkrankungen wie Salmonellosen, *Campylobacter*-Infektionen und seltener auch die enteritische Yersiniose sowie virale Durchfallerkrankungen, sind von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen u. a. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa abzugrenzen. Der Amöbenleberabszess ist besonders von einem bakteriellen Abszess zu differenzieren, der durch eine Infektion

mit Anaerobiern, Staphylokokken oder *Enterobacteriaceae* bedingt sein kann. Das Amöbom ist vorwiegend von einer Kolonneoplasie abzugrenzen (KNOBLOCH et al., 1996).

1.3.3 Therapie der Amöbiasis

Ein Darmlumenbefall mit Zysten und Minutaformen ohne Serumantikörper gegen *Entamoeba histolytica* ist ohne aktuellen Krankheitswert und muss nicht behandelt werden (KNOBLOCH et al., 1996). Werden aber gleichzeitig Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* gefunden, so darf ein Befall mit *Entamoeba histolytica* angenommen werden, und eine Therapie ist indiziert. Werden jedoch keine Serumantikörper gegen *Entamoeba histolytica* gefunden, und kann eine Differenzierung der im Stuhl gefundenen Amöben nicht vorgenommen werden, so ist wegen der Möglichkeit einer asymptomatischen Infektion mit *Entamoeba histolytica* eine medikamentöse Therapie angebracht (GATHIRAM & JACKSON, 1987).

Der Darmlumenbefall wird mit Diloxanidfuroat über 10 Tage oral in der Dosierung von 3 x 500 mg /Tag, (Kinder: 20 mg/kg/Tag) behandelt (KNOBLOCH et al., 1996).

Für die intestinale und extraintestinale Amöbiasis sind 10 Tage mit Metronidazol oral in der Dosierung von 3 x 10 mg/kg/Tag zu verabreichen. Metronidazol kann auch intravenös in der gleichen Dosierung gegeben werden (KNOBLOCH et al., 1996). Alternativ können auch andere Nitroimidazole wie Tinidazol oder Nimorazol gewählt werden. Beim Leberabszess ist Chloroquin wirksam und kann in schweren Fällen zusätzlich gegeben werden (KNOBLOCH et al., 1996).

Im Anschluss an jede Therapie sollte eine Nachbehandlung mit Diloxanidfuroat vorgenommen werden, um die im Darmlumen noch eventuell vorhandene Zysten von *Entamoeba histolytica* zu eliminieren (IRUSEN et al., 1992; REED, 1992).

Eine Kontrolluntersuchung des Stuhles zur Verifizierung des Therapieerfolges bei intestinaler Amöbiasis ist nicht vor 6 Wochen nach Abschluss der Behandlung durchzuführen (KNOBLOCH et al., 1996).

Sollte der Leberabszess nicht auf eine medikamentöse Therapie ansprechen oder ein hohes Risiko einer Abszessperforation mit Beteiligung anderer Organe bestehen, ist eine Drainage oder eine Aspiration des Abszesses erforderlich (RAVDIN, 1995; KNOBLOCH et al., 1996). Bestehen bei einem Amöbom funktionell wirksame Stenosen nach medikamentöser Therapie oder besteht weiterhin der Verdacht auf einen Dickdarmtumor anderer Ätiologie, so ist ein chirurgisches Vorgehen indiziert (KNOBLOCH et al., 1996). Bei einem toxischen Megakolon muss gegebenenfalls das ganze Kolon entfernt werden (RAVDIN, 1995).

1.4 Methoden zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

1.4.1 Hexokinase-Isoenzymauftrennung mittels Gelelektrophorese

Unterschiede zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* lassen sich vor allem mit zwei Isoenzymen nachweisen, der Phosphoglucomutase und der Hexokinase. Ein anderes Enzym, die Glucose-Phosphat-Isomerase, zeigt lediglich Unterschiede in der geographischen Verbreitung von *Entamoeba histolytica*- und *Entamoeba dispar*-Isolaten an (SARGEAUNT et al., 1978a; BRUCKNER, 1992). Die genannten Enzyme zeigen in der Elektroforese verschiedene Banden, die wiederum unterschiedliche Muster bilden, sogenannte Zymodeme. Es sind derzeit 23 Zymodeme bekannt, von denen neun *Entamoeba histolytica* und zwölf *Entamoeba dispar* zuzuordnen sind. Zwei Zymodeme sind noch nicht sicher einzuordnen, eins davon scheint aber *Entamoeba histolytica* (Zymodem 13) und eins *Entamoeba dispar* (Zymodem 21) zu entsprechen (BRUCKNER, 1992). Das am besten zur Differenzierung geeignete Enzym ist nach BRACHA die Hexokinase (BRACHA et al., 1987), die in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand.

1.4.2 Differenzierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Bereits Ende der achtziger Jahre wurden die ersten molekularbiologischen Methoden entwickelt, um einen vereinfachten und schnelleren Nachweis von *Entamoeba histolytica* zu erzielen. Durch Klonierung wurde eine 145-bp-DNA-Sonde gewonnen, welche spezifisch an

eine hochrepetitive, Adenin-Thymin-reiche, leicht degenerierte DNA-Sequenz von *Entamoeba histolytica* bindet (SAMUELSON et al., 1989). Die Sonde differenziert nicht zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*. Sie bindet nicht an DNA anderer Amöben wie *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba invadens* und *Entamoeba histolytica* Laredo bzw. heutzutage *Entamoeba moshkovskii* Laredo. Eine weitere ebenfalls durch Klonierung selektionierte 133-bp-DNA-Sonde band an DNA aus *Entamoeba dispar* (GARFINKEL et al., 1989). Die erwähnten DNA-Sonden wurden einige Jahre später reproduzierbar in klinischen und epidemiologischen Studien eingesetzt (ROMERO et al., 1992; ACUÑA.SOTO et al., 1993).

Die genetische Unterscheidung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* wurde durch die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) möglich. *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* weisen nämlich spezifische Unterschiede in der DNA-Sequenz auf, die für die ribosomale RNA kodiert. Somit konnte durch die r-PCR gezeigt werden, dass die Fragmente der rRNA codierenden DNA-Region, die durch verschiedene Restriktionsverdau entstanden sind, sogenannte Riboprints, zwar für 18 „pathogene“ Stämme identisch sind, sich aber von den entsprechenden Fragmenten 13 „apathogener“ Stämme unterscheiden. Dabei wurde ein Oligonucleotid (Primer) entwickelt, der hoch sensitiv und spezifisch für *Entamoeba histolytica* ist (CLARK & DIAMOND 1991a; CLARK & DIAMOND 1991b). Auch zur Identifizierung anderer Amöbenarten konnte diese Methode zur Anwendung kommen (CLARK & DIAMOND 1992). In der vorliegenden Arbeit fand diese erprobte Methode aufgrund der schnellen, praktikablen Durchführbarkeit Anwendung.

Erwähnt sei ein Verfahren, bei dem genomische cDNA-Unterschiede zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* für einen pathogenen Stamm cEH-P1 (HM-1: IMSS) und einen apathogenen Stamm cEH-NP1 (SAW 1734), aber ebenso für andere Spezies, klar beschrieben und analysiert werden konnten (TANNICH et al., 1989). Dabei konnten identische 5' und 3'-Oligonucleotid-Sequenzen für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* gefunden werden, die aber innerhalb eines 482-bp-Fragmentes unterschiedliche Basensequenzen für bestimmte Restriktionsendonucleasen aufwiesen (TANNICH & BURCHARD, 1991).

Ebenso gelang es, ohne Hybridisierung oder Restriktionsenzymverdau der DNA mittels zwei spezifischer Primerpaare, p11 und p12 für *Entamoeba histolytica* und p13 und p14 für *Entamoeba dispar*, ein 100-bp-Produkt des 30-kDa-Antigens für *Entamoeba histolytica* und ein 101-bp-Produkt für *Entamoeba dispar* zu amplifizieren und elektrophoretisch darzustellen (TACHIBANA et al., 1991).

1.4.3 Amplifizierung der DNA aus Stuhlproben mittels kolorimetrischer Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis der Amöben-DNA im Stuhl wurde in der vorliegenden Arbeit die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) nach BRITTEN verwendet (BRITTEN et al., 1997). Diese Methode setzt die in Abschnitt 1.4.2. genannten spezifischen Oligonucleotide mit 133 bp und 145 bp als Primer ein und lässt sich gut innerhalb eines Arbeitstages durchführen.

AGUIRRE und Mitarbeiter entwickelten eine andere Stuhl-PCR-Methode, an die sich ein ELISA-Verfahren zur Sichtbarmachung des Ergebnisses anschloss (AGUIRRE et al., 1995).

Von ZINDROU und Mitarbeitern wurde ein Eh6F / Eh6R Oligonucleotidpaar hergestellt, das spezifisch am HLY-Gen von *Entamoeba histolytica* bindet. Die bisher durchgeführten Tests mit dieser PCR-Methode zeigen, dass mittels dieses antiparallelen Primerpaares sowohl RNA von *Entamoeba histolytica* im Stuhl, wie auch im Leberabszess spezifisch nachgewiesen werden kann. Im Vergleich zu der in Abschnitt 1.4.2 zitierten PCR-Methode, die von dem Primerpaar p11 und p12 gebrauch macht, und einer anderen PCR-Methode, die ein für *Entamoeba histolytica* spezifisches Primerpaar (EHP1 und EHP2) anwendet, zeigte die von ZINDROU und Mitarbeitern entwickelte Methode mit den Primern Eh6F / Eh6R weit sensitivere Ergebnisse (ZINDROU et al., 2001).

1.4.4 Immunologische Nachweismethoden

Vorweg sei bemerkt, dass die Weltgesundheitsorganisation die Empfehlung aussprach, Stuhl-ELISA-Kits zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in endemischen Gebieten der Erde einzusetzen (WHO, 1997).

Nach dem von ENGVALL und PERLMANN beschriebenen Prinzip eines enzymgekoppelten Immunnachweises (ELISA d. h. „enzyme-linked immunosorbent assay“) wurde in dieser Arbeit Rohantigen SAW 1734 zur Bestimmung von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern und Rohantigen HM-1: IMMS zur Bestimmung von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern im Serum

verwendet (ENGVALL & PERLMANN, 1972). Dieser Test gilt als sehr sensitiv und ist in der Lage, die Immunantwort des Organismus über einen längeren Zeitraum hinweg aufzuzeichnen und damit die Durchseuchung der Population festzustellen (KNOBLOCH & MANNWEILER, 1983).

In den letzten Jahren wurden einige Antigennachweis-Verfahren entwickelt, die *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* aus Stuhlmaterial nachweisen können. Darunter sei hier der „fecal antigen capture ELISA“ (FAC-ELISA) erwähnt, der *Entamoeba histolytica* spezifisch nachweist. Im Vergleich zur Stuhlmikroskopie und dem Isoenzymnachweis betrug für *Entamoeba histolytica* die errechnete Sensitivität 87 % und die Spezifität 100 % (GONZALES-RUIZ et al., 1994a).

Eine andere Forschungsgruppe stellte sechs monoklonale Antikörper jeweils gegen ein bestimmtes Epitop der 170 kDa Untereinheit des Galaktose-Adhesins von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* her. Zwei dieser Antikörper erwiesen sich als spezies-unspezifisch, vier vermochten dagegen spezifisch *Entamoeba histolytica* zu identifizieren. Mittels ELISA kamen diese Antikörper dann in zwei Stuhl-Antigen-Tests zur Anwendung, die nun von TechLab, Blacksburg, VA, USA als Diagnostik-Kits vertrieben werden. Der spezifische Stuhl-Antigen-Kit zeigte im Vergleich zur mikroskopischen Kontrolle und dem Isoenzymnachweis eine Spezifität von 97 % und eine Sensitivität von 100 %, allerdings in einer weiteren Studie desselben Labors nur noch eine Sensitivität von 80 % (HAQUE et al., 1995). Auch andere Studien vermochten die hohe Sensitivität und Spezifität beider Tests zu bestätigen. So die Studie von PILLAI und Mitarbeitern, die zudem noch andere ELISA-Tests miteinander verglich. Der unspezifische TechLab-Kit zeigte dabei mit dem ProSpecT-Test, (Alexon-Trend, Ramsey, MN, USA) eine Übereinstimmung von 92,9 % (PILLAI et al., 1999). Wie Nachkontrollen mit spezifischen Stuhl-ELISA-Tests zeigten, verfehlte dieser TechLab-Kit leider, im Gegensatz zum ProSpecT test, bei 7,1 % der untersuchten Patienten die korrekte Diagnose. Die Ergebnisse des spezifischen TechLab-Kits stimmten allerdings mit denen des Merlin Optimum S Tests (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Deutschland) vollkommen überein.

1.5 Epidemiologische Studien zur Verbreitung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

In Tabelle 1.1 sind epidemiologische Studien aufgelistet, die Querschnitte von unterschiedlichen Anteilen der Bevölkerung wiedergeben. Tabelle 1.2 stellt dagegen Studien dar, die nur bestimmte selektionierte Bevölkerungsanteile erfassen, und damit sind die in dieser Tabelle angeführten Studien nicht ohne weiteres untereinander vergleichbar, und noch weniger mit denen aus Tabelle 1.1.

Wird anhand der Daten in Tabelle 1.1 für die mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* Infizierten bzw. Kontaminierten ein Durchschnittswert der zwischen 1985 und 2000 untersuchten Personen (9295) errechnet, so erhält man eine Prävalenz von 3,5 % für *Entamoeba histolytica* und 8,7 % für *Entamoeba dispar*. Bemerkenswert ist bei einigen Studien die Anzahl der Doppelinfektionen. Aus Mexiko wird berichtet, dass 14 von 201 Personen (7 %) doppelt infiziert waren (ACUÑA-SOTO et al., 1993). In einer anderen Studie, aus Mexiko, waren es die Hälfte der 84 Untersuchten (ROMERO et al., 1992). Eine weitere Studie ebenfalls aus Mexiko ergab, dass drei von insgesamt 1730 Personen (0,2 %) doppelt infiziert waren (MARTÍNEZ-GARCIA et al., 1990). In einer Studie aus Bangladesch waren 3 von 680 Personen (0,4 %) doppelt infiziert (HAQUE et al., 1999). Eine andere aus Bangladesch stammende Studie (HAQUE et al., 1998) zeigte, dass 12 der 98 Personen (12 %) doppelt infiziert waren; in China waren es eine Person von 42 Personen (3,6 %; GUO et al., 1995). Eine Studie untersuchte Proben von tropenmedizinischen Ambulanzen aus Deutschland und von Dörfern aus Togo. Darin zeigte sich, dass 3 Personen von 246 Personen (1 %) doppelt infiziert waren (PICKEL, 1994). Aus den dargestellten Studien mit Doppelinfektionen lässt sich somit kein gehäuftes Vorkommen derselben für bestimmte Regionen der Welt herauslesen.

Weitere epidemiologische Studien können der Tabelle 1.1 entnommen werden, so Studien aus Brasilien (PÓVOA et al., 2000), Ägypten (ABD-ALLA et al., 2000), Äthiopien (GATTI et al., 1998), Bangladesch (HAQUE et al., 1997a; HAQUE et al., 1999), Brasilien (ACA et al., 1993; ACA et al., 1994 ; BRAGA et al., 1996), Philippinen (RIVERA et al., 1996), nördliche Philippinen (RIVERA et al., 1998), Seychellen (SARGEAUNT, 1992) und Südafrika (GATHIRAM & JACKSON, 1985; JACKSON et al., 1985).

Zu den Studien aus selektionierten Bevölkerungsanteilen der Tabelle 1.2 lässt sich Folgendes bemerken: Eine Studie aus Dhaka zeigte, dass von 98 Patienten mit Diarrhö 54,1 % mit

Entamoeba histolytica infiziert waren (HAQUE et al., 1998), während in einer Studie über das Lufthansapersonal mit 6856 Untersuchten nur von 0,06 % Infizierten berichtet wurde (WEBER et al., 1990). Eines der Gründe für diese Prozentzahlen dürfte sicherlich der im Durchschnitt weit höhere Hygienestandard des Lufthansapersonals gegenüber den der Patienten aus Dhaka sein. In den anderen Studien liegen die Prozentzahlen für die Prävalenzen für *Entamoeba histolytica* dazwischen.

Tabelle1.1: Epidemiologische Studien zur Verbreitung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

| Land | Untersuchte Bevölkerung | Anzahl | <i>Entamoeba histolytica</i> -Infizierte | | <i>Entamoeba dispar</i> -Kontaminierte | | Methode | Veröffentlichung |
|-----------------------|---|--------|--|---------|--|---------|---|-----------------------|
| | | | Anzahl | Prozent | Anzahl | Prozent | | |
| Brasilien | Personen der Stadt Belém, der Region Pará | 438 | 127 | 29,0 % | – | – | Stuhl-ELISA-Kit (TechLab) | PÓVOA et al., 2000 |
| Ägypten | Dorfbevölkerung, Kafer Daoud bei Menufia | 182 | 39 | 21,4 % | 44 | 24,2 % | Stuhl-ELISA-Kits (TechLab) | ABD-ALLA et al., 2000 |
| Bangladesch | Kinder zwischen 2 und 5 Jahren aus Slums, Dhaka | 680 | 32 | 4,7 % | 86 | 12,6 % | Stuhl-ELISA-Kits (TechLab) | HAQUE et al., 1999 |
| Nördliche Philippinen | Personen in 14 Gemeinden | 1872 | 18 | 0,96 % | 137 | 7,3 % | r-PCR | RIVERA et al., 1998 |
| Äthiopien | Wonji Shewa Sugar Stadtgebiet | 123 | 2 | 1,6 % | 27 | 22 % | Isoenzymanalyse | GATTI et al., 1998 |
| Bangladesch | Dorfkinder aus der Gegend von Mirzapur Upazila | 987 | 8 | 0,8 % | 21 | 2,1 % | Isoenzymanalyse | HAQUE et al., 1997a |
| | | | 10 | 1,0 % | 69 | 7,0 % | Stuhl-ELISA-Kits (TechLab) | |
| Brasilien | Slumbewohner in Gonçalves Dias, Fortaleza | 155 | 4 | 2,6 % | 10 | 6,5 % | Stuhl-ELISA zur Bestimmung von Gal/Gal-Nac Lektin | BRAGA et al., 1996 |
| Philippinen | Zufällig ausgewählte Personen | 72 | 0 | 0 % | 19 | 26,4 % | k-PCR | RIVERA et al., 1996 |
| China | Ländliche Bevölkerung, Shandong | 40 | 4 | 10 % | 4 | 10 % | k-PCR | GUO et al., 1995 |
| Brasilien | Ländl. und städt. Bevölkerung von Pernambuco | 663 | 0 | 0 % | 108 | 16,3 % | Isoenzymanalyse | ACA et al., 1994 |
| Brasilien | Kinder zw. 1 und 15 Jahren | 155 | 0 | 0 % | 4 | 2,5 % | Isoenzymanalyse | ACA et al., 1993 |

Fortsetzung der Tabelle 1.1

| Land | Untersuchte Bevölkerung | Anzahl | <i>Entamoeba histolytica</i> -Infizierte | | <i>Entamoeba dispar</i> -Kontaminierte | | Methode | Veröffentlichung |
|------------|-----------------------------------|--------|--|---------|--|---------|-----------------|------------------------------|
| | | | Anzahl | Prozent | Anzahl | Prozent | | |
| Mexiko | Bewohner einer ländl. Gegend | 201 | 23 | 11,4 % | 15 | 7,5 % | k-PCR | ACUÑA.SOTO et al., 1993 |
| Seychellen | Landbevölkerung | 313 | 8 | 2,6 % | 40 | 12,8 % | Isoenzymanalyse | SARGEAUNT, 1992 |
| Mexiko | Ländliche Bevölkerung im Hochland | 1730 | 33 | 1,9 % | 70 | 4 % | Isoenzymanalyse | MARTÍNEZ-GARZIA et al., 1990 |
| Südafrika | Dorfbewohner bei Durban | 1381 | 14 | 1 % | 125 | 9 % | Isoenzymanalyse | GATHIRAM & JACKSON, 1985 |
| Südafrika | Dorfbewohner bei Durban | 303 | 17 | 5,6 % | 33 | 10,9 % | Isoenzymanalyse | JACKSON et al., 1985 |

- Stuhl-ELISA-Kit (TechLab) vgl. Abschnitt 1.4.4
- Gal/GalNAc Galaktose / N-Acetyl-D-Galaktosamin
- k-PCR kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion
- r-PCR Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 1.2: Studien zur Verbreitung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* aus selektionierten Bevölkerungsteilen

| Land | Untersuchte Bevölkerung | Anzahl | <i>Entamoeba histolytica</i> -Infizierte | | <i>Entamoeba dispar</i> -Kontaminierte | | Methode | Veröffentlichung |
|-------------|--|--------|--|---------|--|---------|---------------------------------|---------------------|
| | | | Anzahl | Prozent | Anzahl | Prozent | | |
| Bangladesch | Patienten mit Diarrhö in Dhaka | 98 | 53 | 54,1 % | 28 | 28,6 % | Isoenzymanalyse und PCR-Methode | HAQUE et al., 1998 |
| Bangladesch | Kinder mit Diarrhö im Krankenhaus | 1049 | 13 | 1,2 % | 3 | 0,3 % | Isoenzymanalyse | HAQUE et al., 1997a |
| | | | 44 | 4,2 % | 68 | 6,5 % | Stuhl-ELISA-Kit (TechLab) | |
| Japan | Geistig Behinderte einer Einrichtung in Shizuoka | 50 | 5 | 10 % | 0 | 0 % | r-PCR | SAHARA et al., 1996 |
| Italien | Männliche geistig Behinderte einer Anstalt | 77 | 11 | 14,3 % | 0 | 0 % | Isoenzymanalyse | GATTI et al., 1995b |

Fortsetzung der Tabelle 1.2

| Land | Untersuchte Bevölkerung | Anzahl | <i>Entamoeba histolytica</i> -Infizierte | | <i>Entamoeba dispar</i> -Kontaminierte | | Methode | Veröffentlichung |
|----------------------|---|--------|--|---------|--|---------|--|---------------------|
| | | | Anzahl | Prozent | Anzahl | Prozent | | |
| Deutschland und Togo | 181 Proben aus tropenmedizin. Ambulanzen, 65 Patienten aus Togo | 246 | 29 | 11,8 % | 57 | 23,2 % | r-PCR, Isoenzymanalyse, Komplementlysetest | PICKEL, 1994 |
| Mexiko | Krankenhauspatienten (Kinder) mit Diarrhö in Mexiko City | 84 | 42 | 50,0 % | 50 | 60,0 % | k-PCR | ROMERO et al., 1992 |
| Indien | Krankenhauspatienten aus New Dehli | 678 | 5 | 0,7 % | 43 | 6,3 % | Isoenzymanalyse | BAVEJA et al., 1990 |
| Deutschland | Personal der Lufthansa | 6856 | 4 | 0,06 % | 81 | 1,2 % | Isoenzymanalyse | WEBER et al., 1990 |

Stuhl-ELISA-Kit (TechLab) vgl. Abschnitt 1.4.4

r-PCR Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

1.6 Seroepidemiologische Studien zur Verbreitung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Entamoeba histolytica-Antikörper können über Monate und Jahre im Blut des Menschen persistieren (KNOBLOCH & MANNWEILER, 1983) und deren Nachweis im Blut zeugt damit von einem Kontakt mit *Entamoeba histolytica*. Einige Studien der Seroprävalenz von *Entamoeba histolytica* sind in der Tabelle 1.3 wiedergegeben. Es ist aber zu beachten, dass allgemein die hierfür gemessenen Werte mit der Art des verwendeten Antigens, dem Typ des serologischen Tests, dem „Cut-off-Point“, dem Bestimmungszeitpunkt, der Endemizität und anderen Störgrößen eng zusammenhängen (KNOBLOCH & MANNWEILER, 1983; KNOBLOCH & DELGADO, 1985). In einer Mammutstudie aus Mexiko mit einer Gesamtzahl von 67668 untersuchten Personen wurden unterschiedliche Gebiete und Bevölkerungsschichten sehr genau erfasst (CABALLERO-SALCEDO et al., 1994). Auffallend war in dieser Studie die

signifikant unterschiedliche Geschlechtsverteilung bei dem Serumantikörpernachweis gegen *Entamoeba histolytica*. So wurde bei dem weiblichen Geschlecht eine Rate von 9,34 % und bei dem männlichen Geschlecht eine Rate von 7,09 % ermittelt. Die Altersgruppe der 5- bis 9-Jährigen hatte mit 11,02 % die höchste Seroprävalenz, die mit dem Alter stetig abnahm, bis auf 6,02 % bei den über 50-Jährigen. Eine frühere Studie stellte ebenso die höchste Infektionsrate von 16,4 % bei 214 Schulkindern fest (MANULA et al., 1986). Für die ländliche und städtische Gesamtbevölkerung lag der Serumantikörperwert hingegen nur bei 13,5 % von 800 untersuchten Personen. In einer weiteren Studie (CHACÍN-BONILLA & BONPART, 1981) fand sich die höchste Infektionsrate mit 8,7 % bei den 12- bis 24-Jährigen. Sie nahm jedoch mit zunehmendem Alter ab. Auch in einer anderen Studie zeigte sich die höchste Infektionsrate bei den 6- bis 14-Jährigen und zwar mit 40 % (BRAGA et al., 1996). Studien aus Bangladesch und Brasilien zeigten für Slumbewohner hohe Seroprävalenzen für *Entamoeba histolytica*, nämlich 32,7 % für Bangladesch (HAQUE et al., 1999) und 24,7 % bzw. 19,7 % für Brasilien (BRAGA et al., 1996; BRAGA et al., 1998). In Südamerika, genau genommen Surinam, fand sich unter den Eingeborenen der Hindustani eine Seroprävalenz von nur 2 %, aber unter den „Ameroindianer“ eine Seroprävalenz von 33,9 % (BOS et al., 1980). In einer ländlichen Bevölkerung in Mexiko ergab sich eine Seroprävalenz von 7,3 %. Eine türkische Studie verglich 225 Personen ohne gastrointestinales Beschwerden mit 157 Personen mit gastrointestinales Beschwerden und Trophozoiten im Stuhl und errechnete für die erste Gruppe eine Seroprävalenz von 1,8 % für *Entamoeba histolytica*. Bei der zweiten Gruppe zeigte sich jedoch eine Seroprävalenz von 6,4 % (BALCI et al., 1993).

Zusammenfassend erkennt man, dass weltweit die mittels ELISA-Nachweis festgestellten Seroprävalenzen für *Entamoeba histolytica* im Durchschnitt höher liegen als die durch alle anderen Methoden ermittelten. Hiermit gemeint sind die Polymerase-Kettenreaktion, der Isoenzymnachweis, die kolorimetrische-PCR-Analyse und der Stuhl-Antigennachweis (siehe Tabellen 1.1, 1.2 und 1.3).

Tabelle 1.3: Serologische Studien, die Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* nachwiesen.

| Land | Untersuchte Bevölkerung | Zahl der Untersuchten | Anti- <i>Entamoeba histolytica</i> -Antikörper-Träger | Methode | Veröffentlichung |
|-------------|---|-----------------------|---|--|---|
| Mexiko | Stadt- und Landbevölkerung aus 217 Gemeinden von Puebla | 2140 | 8,6 % | IHA | DEL-CARMEN-SANCHEZ-GUILLEN et al., 2000 |
| | | | 6,4 % | IHA / ELISA | |
| Bangladesch | Zwei bis fünfjährige Kinder aus Slums, Dhaka | 232 | 32,7 % | ELISA für - Gal/GalNAc-Lektin Antikörper | HAQUE et al., 1999 |
| Brasilien | Slumbewohner im Nordosten von Brasilien | 401 | 19,7 % | ELISA für - Gal/GalNAc-Lektin Antikörper | BRAGA et al., 1998 |
| Brasilien | Slumbewohner in Gonçalves Dias, in Fortaleza | 335 | 24,7 % | ELISA für (Gal/GalNAc) Lektin Antikörper | BRAGA et al., 1996 |
| Mexiko | Mexiko City und Land Mexiko in verschiedenen Bevölkerungsgruppen | 67668 | 8,41 % | IHA | CABALLERO-SALCEDO et al., 1994 |
| Türkei | Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden u. Trophozoiten im Stuhl | 157 | 6,4 % | IHA | BALCI et al., 1993 |
| | Personen ohne Symptome | 225 | 1,8 % | | |
| Nicaragua | 6 bis 15 Jährige in Leon | 562 | 48 % | ELISA IHA | TELLEZ-SIERRA et al., 1992 |
| Mexiko | Ländliche Bevölkerung im Hochland | 1886 | 7,3 % | IHA CEIP | MARTÍNEZ-GARZIA et al., 1990 |
| Indien | Unterschiedliche Gruppen in Hyderabad (Stadt) | 800 | 13,5 % | IHA | MANJULA & HABIBULAH, 1986 |
| Bangladesch | Familien in der Umgebung von Matlab | 200 | ca. 65 % | IFA | HOSSAIN et al., 1983 |
| Venezuela | Blutspender und Patienten eines Krankenhauses von Maracaibo | 848 | 4,4 bis 6,5 % | IHA | CHACÍN-BONILLA & BONPART, 1981 |
| Südamerika | Gebiete in Surinam, 9 verschiedene Bevölkerungsgruppen | 912 | 2 bis 33,9 % | ELISA | BOS et al., 1980 |

ELISA : Enzym-Immuntest (enzyme-linked immunosorbent assay)
 CIEP : Gegenstrom-Immunelektrophorese (counterimmunoelectrophoresis)
 GDP : Gel-Diffusionspräzipitation
 Gal/GalNAc : Galaktose / N-Acetyl-D-Galaktosamin
 IFA : Indirekte Immunfluoreszenz (indirect immunofluorescent antibody test)
 IHA : Indirekte Hämagglutination

1.7 Fragestellung

Als Folgestudie einer anderen Promotionsarbeit (JETTER, 1998) sollten in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in Stuhlproben einer unselektierten Landbevölkerung Anatoliens (Süd-Ost-Türkei) bestimmt werden, und zwar anhand dreier unabhängiger Nachweismethoden: der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR). Als Maß für die Durchseuchung der Bevölkerung sollte gleichzeitig im Serum der untersuchten Personen eine Bestimmung der Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Daten zur Person, zur ökonomischen und sozialen Lage, zur Trinkwasser- und Brauchwassersituation und zum Hygieneverhalten der Probanden erhoben werden. Diese Daten sollten mit den Ergebnissen der oben genannten Methoden verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz (ATP) | Sigma, München |
| Agar-Agar (Pulver) | Merck, Darmstadt |
| ϵ -Aminocaprinsäure | Sigma, München |
| Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Ampuwa | Fresenius, Bad Homburg |
| Anti-Digoxigenin, Meerrettichperoxidase markiert | Boehringer, Mannheim |
| Anti-Fluoreszein, Meerrettichperoxidase markiert | Boehringer, Mannheim |
| Avidin | Sigma, München |
| Bactopepton | Difco-Nordwald-KG, Detroit, USA |
| Biotin | Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| Bromthymolblau | Merck, Darmstadt |
| Citronensäure-Monohydrat (C ₃ H ₄ OH (COOH) ₃ · H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Tetramethylbenzidin | Sigma, Poole, Großbritannien |
| Diatomeenerde (Kieselguhr) | Sigma, Poole Großbritannien |
| Diethanolamin | Sigma, München |
| Dimethylthiazol-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) | Sigma, München |
| Dithiothreitol | Sigma, München |
| DNA-Molekulargewichtsmarker VI | Boehringer, Mannheim |
| Eisessig | Merck, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma, München |
| Ethidiumbromid | Sigma, München |

| | |
|---|---------------------------------|
| Ficoll, Type 400 | Pharmacia, Uppsala Schweden |
| Glucose-Monohydrat | Merck, Darmstadt |
| Guanidiniumthiocyanat | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Konjugat aus Anti-human-IgG-Kaninchen-Antikörper und Alkalischer Phosphatase | Daco, Glostrup, Dänemark |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂ · 6H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Maleinsäure | Merck, Darmstadt |
| Milchpulver | Fink, Herrenberg |
| Milchsäure (C ₂ H ₄ OH COOH) | Merck, Darmstadt |
| Mineralöl | Sigma, München |
| Dinatriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Merck, Darmstadt |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid (NaN ₃) | Merck, Darmstadt |
| Natronlauge, 40 % (NaOH aq.) | Merck, Darmstadt |
| NEEO-Rotigarose | Roth, Karlsruhe |
| Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) | Merck, Darmstadt |
| Octylglucosid | Sigma, München |
| Phthalat | Sigma, München |
| Paranitrophenylphosphat | Sigma, München |
| Phenazinmetasulfat (PMS) | Sigma, München |
| Reisstärke | Merck, Darmstadt |
| Rinderserum | Sebak, Aidenbach |
| Salzsäure, 32% (HCl aq.) | Merck, Darmstadt |
| Stärke für Elektrophorese | Serva, Heidelberg |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) | Sigma, München |
| Polyoxyethylen(20)-sorbitan Monolaureat (Tween 20) | Sigma, München |
| Wasserstoffperoxid, 30 % | Sigma, Poole, Großbritannien |

2.1.2 Enzyme

| | Hersteller |
|--|---|
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) | Merck, Darmstadt |
| Tfl-DNA-Polymerase (aus <i>Thermus flavus</i> , thermostabil) | Epicentre Technologies, Madison, USA |
| Taq-DNA-Polymerase (aus <i>Thermus aquaticus</i> , thermostabil) | Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA |

2.1.3 Nucleotide, Primer und DNA-Sonden

| | Hersteller |
|---|--|
| Desoxynucleotidtriphosphat Set | Boehringer, Mannheim |
| Primer für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR): | MWG-Biotech, Ebersberg |
| pP-S 24 | 5'—GGC CAA TTC ATT CAA TGA ATT GAG—3' |
| pP-aS 25 | 5'—CTC AGA TCT AGA AAC AAT GCT TCT C—3' |
| apP-S 19 | 5'—GT GCC CAA TTT ATG TAA GT—3' |
| apP-aS 23 | 5'—GGA TTT ATA AAC AAT GTT TCT TC—3' |
| Primer für die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR): | R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK |
| pP-S 22 | 5'—Biotin-TCA AAA TGG TCG TCG TCT AGG C—3' |
| pP-aS 25 | 5'—CAG TTA GAA ATT ATT GTA CTT TGT A—3' |
| apP-S 25 | 5'—TCG GAT CCT CCA AAA AAT AAA GTT T—3' |
| apP-aS 25 | 5'—Biotin-ACA GAA CGA TAT TGG ATA CCT AGT A—3' |

DNA-Sonden für die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion:

DNA-Sonde spezifisch für *Entamoeba histolytica*:

5'—Digoxigenin-CCC GAG GTT CTT AGG AAA TGG A—3'

DNA-Sonde spezifisch für *Entamoeba dispar*:

5'—Fluoreszein-AAT GAG GTT GTA GCA GAG CCC C—3'

2.1.4 Antibiotika

| | Hersteller |
|--------------|----------------------|
| Penicillin | Grünenthal, Stolberg |
| Streptomycin | Sigma, München |

2.1.5 Mikroorganismen

| | Hersteller |
|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie Abteilung II, Tübingen |
| <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1: IMSS (Referenzstamm) | Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg |
| <i>Entamoeba dispar</i> SAW 1734 (Referenzstamm) | Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel |

2.1.6 Puffer und Lösungen

a) Amplifizierungspuffer:

0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 mM MgCl_2 in 1 M Tris-HCl (pH 9)

b) Blockpuffer:

5% Milchpulver in PBS, pH 7,2

c) Carbonatpuffer (pH 9,6-9,8):

Stammlösung I (pH 8,0): 50 mM NaHCO_3 , 3 mM NaN_3

Stammlösung II (pH 11,2): 50 mM Na_2CO_3 , 3 mM NaN_3

Gebrauchslösung (pH 9,6-9,8): Stammlösung I + Stammlösung II im gleichen Verhältnis

d) Isoenzymcocktail-Konzentrat:

0,2 M Dithiothreitol, 0,2 M ϵ -Aminocapronsäure, 0,2 M EDTA in H_2O bidest., eingestellt auf pH 8

e) Gel-Lade-Puffer für das DNA-Gel:

0,25 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll (Typ 400) in H_2O bidest.

f) Laufmarker für das Isoenzymgel:

1 % Bromphenolblau

g) Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4):

200 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 25 mM KCl , 15 mM KH_2PO_4 in H_2O bidest., autoklaviert

h) Phosphatpuffer (PBS, pH 7,2):

140 mM NaCl , 5,5 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl , 1,5 mM KH_2PO_4 , 3 mM NaN_3 in H_2O bidest., autoklaviert

i) Substratpuffer (pH 9,8):

1 M Diethanolamin, 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

- j) TAE (50x konzentriert, pH 8,0):
2 M Tris-Acetat und 0,05 M EDTA in H₂O bidest., autoklaviert

- k) Tris-EDTA (pH 8,0):
10 mM Tris, 1 mM EDTA

- l) Tris-Maleinsäurepuffer (pH 7,4):
0,1 M Tris, 0,1 M Maleinsäure, 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ in H₂O bidest.

- m) Verdünnungspuffer:
1% Milchpulver in PBS, pH 7,2

- n) Waschlösung (0,01 %)
0,01 % Tween 20 in Leitungswasser

2.2 Methoden

2.2.1 Studienaufbau

Diese im Rahmen des Avicenna-Programmes von der Europäischen Union geförderte Studie wurde Anfang September 1996 begonnen, nachdem das positive Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen eingeholt worden war. Die Befragung der Personen und das Einsammeln der Proben – Stuhl und Blut – war Mitte Oktober 1996 abgeschlossen. Die Bereitstellung und Aufbereitung der Proben im Labor der Universität Diyarbakir ermöglichten Dr. Kadri Gül und Dr. Vedat Göral sowie Mitarbeiter der Universität Diyarbakir. Die Personen, die in diese Studie aufgenommen wurden, stammten aus der Süd-Ost-Türkei aus folgend genannten Dörfern:

1. HIDIRELYAZ (Diyarbakir)
2. KOZAN (Diyarbakir)
3. BAGPINAR (Diyarbakir)

Das Dorf Hydirelyaz mit ungefähr 250 Einwohner lag im Tigris-Tal ca. 15 km flussabwärts von Diyarbakir entfernt. Die 17 untersuchten Haushalte waren im gesamten Dorfbereich verteilt. Kozan mit ungefähr 600 Einwohnern lag im Tigris-Tal ca. 5 km von Diyarbakir flussabwärts. Aus Kozan wurden aus allen Teilen insgesamt 23 Haushalte untersucht. Das dritte Dorf, Bagpınar mit annähernd 800 Einwohnern, lag ca. 20 km östlich von Diyarbakir. Aus diesem wurden 25 Haushalte aus dem ganzen Dorfgebiet untersucht.

Die Wasserentsorgung für alle drei Dörfer erfolgte über Schächte und Gruben.

2.2.2 Fragebögen

Die personen- und haushaltsbezogenen Fragebögen sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung Seite 116/ 117). Die Fragen wurden von Mitarbeitern der Universität von Diyarbakir mündlich auf türkisch und / oder kurdisch gestellt.

2.2.3 Auswahl und Aufbereitung der Stuhlproben

Nachdem die Stuhlproben aus den Dörfern eingesammelt waren, wurden sie nach dem MIF-C-Verfahren (SAPERO & LAWLESS, 1953) zur mikroskopischen Untersuchung auf Protozoen-Zysten und -Trophozoiten angereichert. Von allen Patienten, deren Stuhlproben entweder Zysten von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* oder Trophozoiten (Magna- oder Minutaformen) aufwiesen, wurde eine Kultur nach ROBINSON (ROBINSON, 1968) angelegt (siehe Protokoll, Seite 118). Um auszuschließen, dass *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mit anderen Amöben verwechselt oder gar übersehen wurde, wurden ebenfalls alle Stuhlproben angezchtet, deren Präparate mehr als 5 Zysten anderer Darmprotozoen aufwiesen, ganz unabhängig davon, ob von *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii*. Es wurden immer zwei Ausstrichpräparate von einer Stuhlprobe angefertigt.

2.2.4 Auswahl der Blutproben

Gleichzeitig mit dem Ausfüllen der Fragebögen wurde den Personen mit einem Stich in die Fingerbeere wenige Tropfen Blut in einem 1,5 ml- Eppendorf-Reaktionsgefäß entnommen. Das zwischen 5 und 10 Min. bei 300 x g abzentrifugierte Serum wurde bei ca. -20 °C eingefroren und später auf Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* mit Hilfe eines ELISAs („enzyme-linked immunosorbent assay“) bestimmt (ENGVALL & PERLMANN, 1972). Diese Bestimmung erfolgte im Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen.

2.2.5 Anzucht der Referenzstämme von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* und Referenzproben für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und ELISA

Die Referenzproben für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und den ELISA wurden von Frau Dr. Brigitte Walderich, Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden aus den in TYI-S-33 Medium kultivierten Referenzstämmen *Entamoeba histolytica* HM-1: IMSS und *Entamoeba dispar* SAW 1734 gewonnen.

2.2.6 Kulturbedingungen und Medien für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*

Die Anzüchtung und Aufbereitung der Kulturen nach ROBINSON fand im Labor des Mikrobiologischen Institutes der Universität Diyarbakir (Türkei) statt. Sobald ausreichend viele Amöbentrophozoiten herangereift waren, konnten die Kulturen geerntet und Proben zur weiteren Differenzierung mittels Isoenzymanalyse und Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) hergestellt werden. Diese Differenzierung zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* wurde später im Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen vorgenommen.

2.2.6.1 Medien und Lösungen zur Kultivierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* nach ROBINSON

Durch Autoklavieren bei 121 °C für ca. 30 Min. wurden sterile Lösungen hergestellt. Für alle Lösungen wurde in Diyarbakir einfach und in Tübingen zweifach destilliertes Wasser verwendet.

a) Bactopectonlösung:

20 % Bactopecton, autoklaviert und bei +4 °C aufbewahrt

b) Basales Amöbenmedium (BR):

Ca. 400 ml Medium R wurde in eine 800 ml Zellkulturflasche steril abgefüllt und mit einer Impföse *Escherichia coli* DH5 α zugegeben. Die Lösung wurde ca. 12 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend bei +4 °C gelagert.

c) Erythromycin-Penicillin-Lösung:

1g Streptomycin und $10 \cdot 10^6$ IE Penicillin wurden in 20 ml PBS, pH 7,4 , aufgelöst und in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert und eingefroren.

d) Medium-R-Konzentrat:

| | |
|--------|------------------------------|
| 50 g | Natriumchlorid |
| 20 g | Citronensäure, Monohydrat |
| 5 g | Kaliumhydrogenphosphat |
| 10 g | Ammoniumsulfat |
| 5 g | Magnesiumsulfat, Heptahydrat |
| 100 ml | Milchsäure |

Der pH dieser Lösung wurde auf 7,5 eingestellt, auf 1 Liter mit destilliertem H₂O aufgefüllt und autoklaviert.

e) Medium (R):

| | |
|--------|-----------------------------|
| 100 ml | Medium-R-Konzentrat |
| 7,5 ml | Natronlauge, 40 % |
| 2,5 ml | Bromthymolblaulösung, 0,04% |

Die Lösung wurde auf pH 7,5 eingestellt und auf 1 Liter mit destilliertem H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Eine Nachkontrolle des pH-Wertes ist zu empfehlen, da sich der pH-Wert durch das Autoklavieren erniedrigen kann.

Dieses Medium wurde bei +4 °C aufbewahrt und war bis zu vier Wochen haltbar.

f) NaCl-Schrägagar:

| | |
|------|----------------|
| 20 g | Agarpulver |
| 7 g | Natriumchlorid |

Agarpulver und Natriumchlorid wurden mit destilliertem H₂O auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert. Während die Flüssigkeit noch heiß war, wurde sie in Kulturfläschchen gefüllt und erstarrte über Nacht in Schräglage. Am nächsten Morgen konnten die Kulturfläschchen dann bei Zimmertemperatur gelagert werden.

g) Phthalat-Lösung:

0,5 M Phthalat in destilliertem H₂O

Die Lösung wurde auf pH 6,3 eingestellt, autoklaviert und bei +4 °C aufbewahrt.

h) Reisstärke:

Reisstärke wurde für 3 Stunden bei 80 °C erhitzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

i) Rinderserum (S):

Das Rinderserum war sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde das Serum zweimal für 35 bis 40 Min. bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert und dann bei -20 °C aufbewahrt.

j) ROBINSON-Medium (Gebrauchsmedium):

Für ca. 100 ml Medium:

| | |
|-------|---|
| 25 ml | Basales Amöbenmedium (BR) |
| 25 ml | Rinderserum (S) |
| 5 ml | Phthalat-Lösung |
| 45 ml | autoklaviertes destilliertes H ₂ O |
| 4 ml | Bactopeptonlösung |
| 0,1ml | Erythromycin-Penicillin-Lösung |

Das ROBINSON-Medium wurde täglich frisch angesetzt.

2.2.6.2 Anzucht von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* im ROBINSON-Medium

1.Tag:

Es wurden pro Stuhlprobe immer zwei Kulturen angesetzt. Schrägagargläschen wurden zu zwei Dritteln mit ROBINSON-Medium gefüllt und ein erbsengroßes Stück Stuhlprobe jeweils mit der ausgeglühten Impföse zugesetzt und gelöst. Anschließend wurde eine Spatelspitze Reisstärke (ca. 10 mg) hinzugegeben. Die Agargläschen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.Tag:

Das Medium wurde gewechselt durch kurzes Abkippen des Überstandes und neues Auffüllen mit ROBINSON-Medium. Je nach Verbrauch der Reisstärke wurde dem Medium erneut Reisstärke zugegeben. Es wurde für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Folgende Tage:

Das Sediment des Kulturmediums wurde unter dem Mikroskop auf *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Trophozoiten untersucht. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde bestimmt. Hatte dieser einen Wert von sechs oder kleiner, musste das Medium gewechselt werden. An jedem weiteren Tag wurde das Medium auf *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Trophozoiten untersucht und je nach pH-Wert sofort oder spätestens alle zwei Tage gewechselt. Waren die Amöbenkulturen ausreichend angewachsen, wurden sie geerntet.

War keine eindeutige Vermehrung der Amöben zu erkennen, wurde von der entsprechenden Stuhlprobe eine neue Kultur angelegt.

2.2.7 Probenvorbereitung für Hexokinase-Isoenzymauftrennung und Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Die abgeernteten Amöbenkulturen aus Stuhlproben wurden zweimal mit PBS, pH 7,4, gewaschen. Abzentrifugiert wurde bei +4 °C während 5 Min. bei 300 x g. Anschließend wurde das Sediment der Proben in 250 µl PBS, pH 7,4, aufgenommen.

2.2.7.1 Zellaufschluss und Probenvorbereitung für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung

Die gewaschenen Proben wurden 3 Min. bei 300 x g zentrifugiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen wurden die Zellen aufgeschlossen. In Tübingen wurden diese Proben mit flüssigem Stickstoff behandelt, also bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. In Diyarbakir wurde das Einfrieren, allerdings mangels flüssigem Stickstoff, nur bei ca. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefrierfach der Klasse ** vorgenommen. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation von 10 Min. bei 4500 x g. Der Überstand wurde mit einem 1:200 verdünnten Isoenzymcocktail in gleichen Volumina versetzt und im Gefrierfach bei ca. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.7.2 DNA-Gewinnung für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) erfolgte der Zellaufschluss der gewaschenen Proben (siehe Abschnitt 2.2.7) zwar wie in Abschnitt 2.2.7.1 beschrieben durch dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen, jedoch wurde nach der sich anschließenden zehnmütigen Zentrifugation bei 4500 x g nicht der Überstand sondern das Pellet weiterverwendet. Dieses wurde in 500 μl PBS, pH 7,4, aufgenommen und dann im Wasserbad für ca. 10 Min. gekocht.

2.2.8 Hexokinase-Isoenzymauftrennung mittels Stärkegelelektrophorese

1) Herstellung des Elektrophoresegels:

5g Gelelektrophorese-Stärke wurden in 60 ml 1:10 verdünntem Tris-Maleinsäurepuffer, unter Erwärmen und ständigem Rühren gelöst. Sodann unverzüglich auf einer Gelplatte ausgegossen und im Kühlschrank zum Erstarren gebracht. Mit einer Pipette wurden vor dem Auftragen der Proben Vertiefungen von ca. 2 mm Durchmesser in das Gel gesaugt.

2) Auftragen der Proben:

Die Gelplatte wurde in eine horizontale, vorgekühlte Gelelektrophoresekammer (LKB Multiphor II) gelegt. In die Vertiefungen bzw. Probestaschen wurden jeweils 10 bis 20 µl Probe pipettiert. Referenzproben der HM-1: IMSS- und SAW 1734-Stämme wurden mitaufgetragen. Seitlich zur Markierung der Lauffront wurden zusätzlich 5 µl einer 1% Bromphenolblaulösung aufgetragen.

3) Laufpuffer und Laufbedingungen:

Die Proben liefen bei 190 V, 30 mA und 8 °C für ca. zweieinhalb Stunden. Als Laufpuffer wurde 0,1 M Tris-Maleinsäurepuffer verwendet.

Die Hexokinase von *Entamoeba histolytica*-Isolaten weist mehr positive Ladungen auf als die Hexokinase von *Entamoeba dispar*-Isolaten, und läuft in einer Stärkegelelektrophorese deshalb schneller. Eine Unterscheidung zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* ist somit möglich (BRACHA et al., 1987).

4) Entwicklung des Gels:

Entwicklerlösung für Hexokinase-Isoenzymgel:

Lösung I: 100mg Glucose
 12mg ATP
 12mg NADPH
 10mg Magnesiumchlorid
 1mg MTT

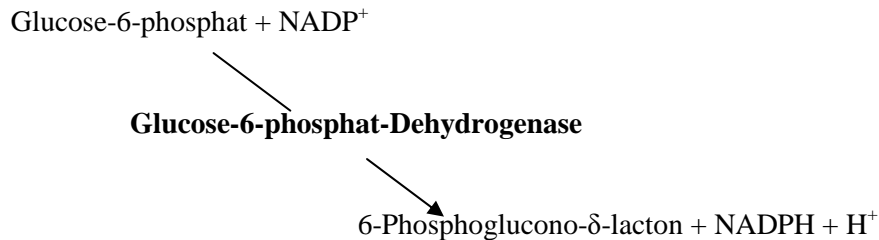
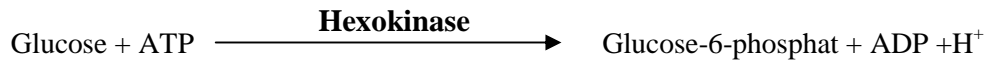
in 25 ml 1:10 verdünntem Tris-Maleinsäurepuffer

Lösung II: 400 mg Agarpulver

in 25 ml 1:10 verdünnten Tris-Maleinsäurepuffer

Beide Lösungen wurden zueinandergegeben und erhitzt bis sich eine klare Lösung bildete. Nun wurde diese Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt und ihr 5 mg PMS und 2 mg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) hinzugegeben.

In noch flüssigem Zustand wurde diese Lösung zügig auf dem Elektrophoresegel verteilt. Bei 37 °C wurde das Gel über Nacht inkubiert. Es fanden folgende Reaktionen statt:



Das entstandene 6-Phosphoglucono- δ -lacton reagierte mit PMS und MTT über NADPH + H⁺ zu einem blauen Azofarbstoff.

5) Dokumentation:

Anschließend wurde das Ergebnis abgelesen und dokumentiert. Für die typische, schnell laufende Doppelbande von *Entamoeba histolytica* bzw. die typische, langsam laufende Doppelbande von *Entamoeba dispar* wurden bei der Versuchsauswertung die Referenzproben HM1: IMSS bzw. SAW 1734 herangezogen.

2.2.9 Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) konnte *Entamoeba histolytica* von *Entamoeba dispar* aufgrund punktueller Unterschiede in den für rRNA kodierenden DNA-Abschnitten differenziert werden. Dazu wurde die chromosomale, doppelsträngige DNA durch Zellaufschluss freigesetzt und durch Kochen denaturiert bzw. in Einzelstränge aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.7.2). Für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* spezifische Primer mit komplementärer Basensequenz gaben die entsprechenden Stellen für die Vervielfältigung der bekannten DNA-Sequenz an (Anlagerung). Damit war für die DNA-Polymerase der jeweilige Startpunkt zur Vervollständigung des Komplementärstranges gegeben (Synthese). Die so produzierten Amplifikate konnten dann elektrophoretisch aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht werden (CLARK & DIAMOND, 1991a; CLARK & DIAMOND, 1991b).

2.2.9.1 Enzym-Ansatz für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Der Enzym-Ansatz für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) war wie folgend:

1) Enzym:

Tfl-DNA-Polymerase (thermostabil)

2) Primer für die rRNA kodierenden DNA-Abschnitte:

Bei *Entamoeba histolytica* wurde für den *sense* DNA-Abschnitt als DNA-Primer ein spezifisches 24-bp-Oligonucleotid (pP-S 24) verwendet, für den *antisense* DNA-Abschnitt ein 25-bp-Oligonucleotid (pP-aS 25). Bei *Entamoeba dispar* wurde für die DNA-Abschnitte entsprechend ein 19-bp- bzw. 23-bp-Oligonucleotid (apP-S 19 bzw. apP-aS 23) benutzt.

3) Desoxynucleotidtriphosphate (DNTPs):

Die Nucleotide für die r-PCR wurden im Reaktionsgemisch in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

4) Amplifizierungspuffer:

0,4 M Ammoniumsulfat
30 mM Magnesiumchlorid, Heptahydrat
in 1 M Tris-HCL (pH 9)

Es wurde jeweils ein Ansatz mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* spezifischen Primern angesetzt. Die Enzym-Ansätze wurden folgendermaßen zusammenpipettiert:

Ansatz für *Entamoeba histolytica*:Ansatz für *Entamoeba dispar*:

| | | |
|-----------------------------------|---------|---------|
| H ₂ O bidest. (Ampuwa) | 37,5 µl | 37,5 µl |
| Amplifizierungspuffer | 5,5 µl | 5,5 µl |
| Tfl-DNA-Polymerase | 1,0 µl | 1,0 µl |
| DNTPs : | 1,0 µl | 1,0 µl |
| Primer: pP-S 24 | 1,0 µl | - |
| Primer: pP-aS 25 | 1,0 µl | - |
| Primer: apP-S 19 | - | 1,0 µl |
| Primer: apP aS 23 | - | 1,0 µl |
| Patientenprobe | 5,0 µl | 5,0 µl |

Dem Reaktionsgemisch wurden 20 µl Mineralöl aufpipettiert, um ein Verdampfen bzw. Konzentrieren der Ansätze während der Amplifizierungsreaktion zu vermeiden.

2.2.9.2 Amplifizieren der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Amplifiziert wurde in einem automatischen Thermocycler (Autogene II Grant, München) nach folgendem Programm:

Vorbehandlung:

Denaturierung des Doppelstranges: 94 °C für 5 Minuten

35 Zyklen:

Anlagerung der Primer: 50 °C für 2 Minuten

Synthese des Komplementärstranges: 72 °C für 1,5 Minuten

Denaturierung des Doppelstranges: 94 °C für 1,5 Minuten

Nachbehandlung:

Anlagerung der Primer: 50 °C für 2 Minuten

Synthese des Komplementärstranges: 72 °C für 8 Minuten

2.2.9.3 Agarosegelelektrophorese

Die durch das Amplifizieren der DNA synthetisierten DNA-Fragmente wurden auf einem 2 %igen Agarosegel (NEEO-Rotigarose) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel war mit Ethidiumbromid versetzt, und zwar 0,5 µg Ethidiumbromid / ml. Neben der Proben wurde zur Identifizierung der Laufbanden ein DNA-Molekulargewichtsmarker mitaufgetragen. TAE-Puffer diente als Lauf-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 65 V für ca. 40 Min. Danach wurden die aufgetrennten DNA-Banden bei UV-Licht betrachtet und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert werden.

2.2.10 Kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben

Alle Stuhlproben wurden eingefroren und an Dr. J. P. Ackers, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, geschickt. Diese Proben wurden mittels kolorimetrischer Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) auf *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* getestet, um die Ergebnisse mit denen der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der Hexokinase-Isoenzym-auftrennung zu vergleichen. Mit der verbesserten Arbeitsmethode nach BRITTEN konnte in einem Gramm Stuhl noch die DNA-Menge von einem Zehntel *Entamoeba histolytica*-Trophozoit bzw. ein bis zehn *Entamoeba dispar*-Trophozoiten in Abwesenheit der jeweils anderen Spezies nachgewiesen werden. Bei Anwesenheit von 10^6 Trophozoiten der jeweils anderen Spezies lag die Nachweisgrenze des in einem Gramm Stuhl enthaltenen DNA-Materials bei zehn Trophozoiten für *Entamoeba histolytica* bzw. 100 für *Entamoeba dispar* (BRITTEN et al., 1997).

2.2.10.1 Gewinnung der DNA aus Stuhlproben

Die Durchführung der Methode benötigt ungefähr einen Tag. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

1) Gewinnung der DNA aus Stuhlproben:

Ca. 1 g Stuhlprobe wurde in 3 ml PBS, pH 7,2, gelöst und filtriert. Durch dreimaliges Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff, jeweiligem Auftauen und eine Behandlung mit Guanidiniumthiocyanat wurde die DNA freigesetzt. Um die DNA von Zellfragmenten sowie restlichem Stuhlmaterial zu trennen wurde diese an Diatomeenerde adsorbiert. Zum Schluss wurde die DNA mittels Tris-EDTA-Puffer aus dem Adsorbens ausgewaschen.

2) Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit der Probe:

Die Konzentration bzw. die Verunreinigung der Probe wurde photometrisch bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Lag der OD-Quotient 260/280 zwischen 1,8 und 2, dann galt die Probe als „rein“. War der Wert des OD-Quotienten kleiner galt die Probe als verunreinigt. Eine optische Dichte von 1 entsprach einer Menge von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Probe (SAMBROOK et al., 1989).

2.2.10.2 Amplifizieren der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Als Primer für das Amplifizieren der DNA kamen ein 22-bp-Oligonucleotid (pP-S 22) als *sense* Stück und ein 25-bp-Oligonucleotid (pP-aS 25) als *antisense* Stück zur Anwendung, welche spezifisch an ein 145-bp-Oligonucleotid von *Entamoeba histolytica* banden. Als spezifische Primer für ein 133-bp-Oligonucleotid von *Entamoeba dispar* wurde ein 21-bp-Oligonucleotid (apP-S 21) als *sense* Stück und ein 22-bp-Oligonucleotid (apP-aS 22) als *antisense* Stück eingesetzt. Die spezifischen Primer für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* waren jeweils mit Biotin gekoppelt. Für jede Probe wurde ein Amplifikationsansatz mit jeweils allen vier Primern hergestellt. Als Enzym wurde die thermostabile Taq-DNA-Polymerase verwendet (SAIKI et al., 1988)

Amplifiziert wurde in einem automatischen Thermocycler nach folgendem Programm:

Vorbehandlung:

Denaturierung des Doppelstranges: 94 °C für 2 Minuten

35 Zyklen:

Denaturierung des Doppelstranges: 94 °C für 30 Sekunden

Anlagerung der Primer: 58 °C für 1 Minute

Synthese des Komplementärstranges: 72 °C für 2 Minuten

Nachbehandlung:

Synthese des Komplementärstranges: 72 °C für 10 Minuten

2.2.10.3 Photometrische Bestimmung des PCR-Ergebnisses mit Hilfe eines ELISAs

Nach dem Amplifizieren wurden zwei spezifische DNA-Sonden zu jeder Probe zugegeben, die jeweils komplementär zu den erwarteten Amplifikaten der PCR-Reaktion waren. Die für *Entamoeba histolytica* spezifische Sonde war mit Digoxigenin konjugiert, die andere Sonde, für *Entamoeba dispar* spezifisch, mit Fluoreszein.

Auf vier mit Avidin beschichteten Reaktionsgefäße wurde jeweils ein Aliquot des Amplifikats zugegeben. Nach Auswaschen der Reaktionsgefäße wurde je zwei Reaktionsgefäßen ein Aliquot Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Digoxigenin bzw. ein Aliquot Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Fluoreszein zugesetzt. Nach erneutem Waschen wurde den Proben Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin zugegeben und inkubiert. Eine Blaufärbung bedeutete ein positives Ergebnis. Diese konnte photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

2.2.11 Antikörpernachweis mittels ELISA

1) Antigengewinnung:

Das Antigenmaterial wurde aus *Entamoeba histolytica*- und *Entamoeba dispar*-Stämmen gewonnen, die in TYI-S-33-Medium gewachsenen waren (siehe 2.2.5). Die Trophoziten wurden dreimal in PBS, pH 7,2, gewaschen. Zentrifugiert wurde bei 300 x g, +4 °C für jeweils 5 Minuten. Danach wurden die Zellen in PBS, pH 7,2, aufgenommen und für 10 mal 30 Minuten einer Ultraschallbehandlung (Sonifer 250, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) ausgesetzt. Nach Zugabe von 0,8 %igem Octylglucosid wurde der Ansatz auf +4 °C heruntergekühlt und anschließend bei 10000 x g und +4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Dialyseschlauch (MWCO 1000, Roth, Karlsruhe) gefüllt. Dialysiert wurde gegen bidestilliertem H₂O unter ständigem Rühren für ca. 12 Stunden. Anschließend wurde die Proteinkonzentration in den Ansätzen mit einem Total-Protein-Test, Biorad, München, bestimmt. Die Konzentration des Antigens bei *Entamoeba histolytica* betrug 0,9 mg/ml, bei *Entamoeba dispar* 0,7 mg/ml. Die Ansätze wurden bei -70 °C aufbewahrt.

2) Antigenanlagerung:

Das Antigenmaterial wurde so in Carbonatpuffer verdünnt, dass eine Konzentration der Flachbodenplatte von 1µg/ Cup für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* erreicht wurde. Zur Anlagerung des Antigens wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flachbodenplatte wurde dreimal mit Tween 20-Waschlösung (0,01 %) gewaschen. Zwischen jedem Waschgang wurde die Platte kräftig auf Fließtüchern ausgeklopft. Dem schloss sich eine Inkubation mit Blockpuffer für eine Stunde bei 37 °C an. Schließlich wurde noch einmal mit Tween 20-Waschlösung gewaschen. Dann war es möglich, die Flachbodenplatte einzufrieren, um den Arbeitsvorgang zu unterbrechen.

3) Antigen-Antikörper-Reaktion:

Für die Antikörperbestimmung wurde das Patientenserum 1:100 mit Verdünnungspuffer versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Flachbodenplatte wieder mit Tween 20-Waschlösung gewaschen.

Neben den zu bestimmenden Patientenseren wurde zusätzlich eine Pufferkontrolle, eine Negativkontrolle mit Serum, die keine Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* aufwies und eine Positivkontrolle (Kontrolle mit dem *Entamoeba*

histolytica-Referenzstamm HM-1: IMSS bzw. *Entamoeba dispar* Referenzstamm SAW 1734) jeweils doppelt angesetzt, so dass eine Auswertung möglich war.

4) Einsetzen des Konjugates:

Das Konjugat bestehend aus Anti-human-IgG-Kaninchen-Antikörper und alkalischer Phosphatase wurde 1: 30000 mit Verdünnungspuffer versetzt (1 µl Konjugat auf 30 ml Puffer) und in die Cups der Flachbodenplatte gegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Platte wieder mit Tween 20-Waschlösung gewaschen.

5) Zuführen von Substrat und Extinktionsmessung:

Paranitrophenylphosphat wurde in einer Konzentration von 26,4 mg pro 10 ml Substratpuffer eingesetzt. Nach Zugabe der Substratlösung in die Cups der Flachbodenplatte wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert bis sich ein Ergebnis in Form einer deutlichen oder einer leichten Gelbfärbung bei den Positivkontrollen entsprechend für *Entamoeba histolytica* und für *Entamoeba dispar* abzeichnete. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem Spektrophotometer (EL 312 Microplate, Bio-Tek Instruments) gemessen.

6) Versuchsauswertung:

Wenn die Positivkontrollen für *Entamoeba histolytica* und für *Entamoeba dispar* gegen die Pufferkontrollen (Leerwert) abgeglichen wurden, erhielt man nach ca. 15 bis 25 Minuten einen Extinktionskoeffizienten zwischen 0,750 bis 0,900. Nun wurde nach erneutem Messen der Extinktion die Negativkontrollen abgeglichen und man erhielt einen Wert von 0,500 bis 0,650. Die Patientenserien konnten nun abgelesen werden. Ein Ergebnis galt als positiv, wenn der Wert größer als 0,100 war. Dieser Wert von 0,100 entsprach in der vorliegenden Arbeit 10 Antikörpereinheiten.

2.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem JMP-Programm (Version 3.2.2) am Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen. Die methodische Auswertung orientierte sich an der Fachliteratur von SACHS und LORENZ (SACHS, 1997; LORENZ, 1996).

3. Ergebnisse

Vorweg sei darauf hingewiesen, dass bei einigen wenigen Personen entweder Fragebögen und / oder Blut- und / oder Stuhlproben fehlten, und deshalb unterschiedliche Gesamtzahlen für die Personengruppen resultierten.

3.1 Ergebnisse der Fragebögen

3.1.1 Auswertung der personenbezogenen Daten

Insgesamt wurden 265 Personen mit Hilfe von Fragebögen befragt. Es wurden je zwei unterschiedliche Fragebögen benutzt, nämlich ein Fragebogen, der u. a. persönliche Daten erfasste und ein anderer, der sich auf die gegebenen Haushaltszustände bezog (siehe Seite 116/117). Von den 265 Personen waren 92 aus dem Dorf Hydurelyaz, 67 Personen aus dem Dorf Kozan und 106 Personen aus dem Dorf Bagpınar.

Da 11 Fragebögen bezüglich der Geschlechtsangabe nicht zu verwerten waren, konnte für die Statistik nur von einer Gesamtzahl von 254 Personen ausgegangen werden. Das Alter reichte von acht Monaten bis 85 Jahre, wobei der Mittelwert bei 20,8 Jahren und der Median bei 15 Jahren lag. Die Standardabweichung war 18 (*). Von den 254 Personen waren 111 männlichen Geschlechts (43,7 %) und 143 weiblichen Geschlechts (56,3 %). Tabelle 3.1 gibt die Altersverteilung in Bezug auf das Geschlecht für die untersuchte Bevölkerung wieder.

Im Dorf Hydurelyaz lag der Altersmittelwert der Untersuchten bei 20,7 Jahren ($\sigma=17,4$); im Dorf Kozan lag er bei 19,4 Jahren ($\sigma=20,3$) und im Dorf Bagpınar bei 21,7 Jahren ($\sigma=17,1$). Von den 92 Personen aus Hydurelyaz waren 42 männlichen Geschlechts (46 %) und 50 weiblichen Geschlechts (54 %). In Kozan lag der Anteil männlicher Individuen bei 39 (61 %) und weiblicher Individuen bei 25 (39 %). In Bagpınar setzte sich die Anzahl der Untersuchten aus 68 Personen weiblichen Geschlechts (69 %) und 30 männlichen Geschlechts (31 %), zusammen (siehe Tabelle 3.2).

(*) \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; μ = Median; σ = Standardabweichung

Tabelle 3.1: Geschlechtsbezogene Altersverteilung bei den Untersuchten

| Altersgruppen in Jahren | männlich | | weiblich | | gesamt | |
|----------------------------|----------|------|----------|------|---------|------|
| | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % |
| 0-5 | 20 | 18 | 20 | 14 | 40 | 16 |
| 6-10 | 22 | 20 | 28 | 20 | 50 | 20 |
| 11-15 | 21 | 19 | 18 | 13 | 39 | 15 |
| 16-20 | 14 | 13 | 20 | 14 | 34 | 13 |
| 21-25 | 7 | 6 | 13 | 9 | 20 | 8 |
| 26-30 | 6 | 5 | 9 | 6 | 15 | 6 |
| 31-35 | 5 | 5 | 4 | 3 | 9 | 4 |
| 36-40 | 8 | 7 | 6 | 4 | 14 | 6 |
| 41-45 | 1 | 1 | 5 | 4 | 6 | 2 |
| 46-50 | 0 | 0 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| 51-55 | 3 | 3 | 4 | 3 | 7 | 3 |
| >55 | 4 | 4 | 13 | 9 | 17 | 7 |
| gesamt | 111 | 100 | 143 | 100 | 254 | 100 |

Tabelle 3.2: Geschlechtsbezogene Altersverteilung bei den Untersuchten in Hydreyaz, Kozan und Bagpnar

| Alters- gruppen in Jahren | Hydreyaz | | | | Kozan | | | | Bagpnar | | | |
|------------------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | männlich | | weiblich | | männlich | | weiblich | | männlich | | weiblich | |
| | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % |
| 0-5 | 8 | 19 | 3 | 6 | 9 | 23 | 9 | 36 | 3 | 10 | 8 | 12 |
| 6-10 | 10 | 24 | 8 | 16 | 9 | 23 | 7 | 28 | 3 | 10 | 13 | 19 |
| 11-15 | 11 | 26 | 8 | 16 | 3 | 8 | 1 | 4 | 7 | 23 | 9 | 13 |
| 16-20 | 5 | 12 | 7 | 14 | 5 | 13 | 0 | 0 | 4 | 13 | 13 | 19 |
| 21-25 | 3 | 7 | 7 | 14 | 2 | 5 | 0 | 0 | 2 | 7 | 6 | 9 |
| 26-30 | 0 | 0 | 6 | 12 | 2 | 5 | 0 | 0 | 4 | 13 | 3 | 4 |
| 31-35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 4 | 13 | 4 | 6 |
| 36-40 | 0 | 0 | 2 | 4 | 7 | 18 | 2 | 8 | 1 | 3 | 2 | 3 |
| 41-45 | 0 | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3 |
| 46-50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 51-55 | 3 | 7 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| >55 | 2 | 5 | 4 | 8 | 1 | 3 | 4 | 16 | 1 | 3 | 5 | 7 |
| gesamt | 42 | 100 | 50 | 100 | 39 | 100 | 25 | 100 | 30 | 100 | 68 | 100 |

Von insgesamt 253 Personen gaben 69 Personen (27,3 %) akute gastrointestinale Symptome an. Von diesen nannten acht Personen (12 %) eine „Diarrhö“, 57 Personen (83 %) „Bauchschmerzen“ und acht Personen (12 %) Symptome, die trotz eingehender Fragen der Untersucher nicht einer genau definierbaren gastrointestinalen Symptomatik zuzuordnen waren. Aus den Mehrfachnennungen folgt, dass von den bereits aufgezählten Untersuchten zwei (3 %) „Diarrhö“ und „Bauchschmerzen“ und zwei andere (3 %) „Bauchschmerzen“ und weitere nicht genau definierbare Symptome hatten. Von den acht Personen mit „Diarrhö“ nannten drei eine „schleimige Diarrhö“, vier erwähnten „Fieber“, zwei „Bauchschmerzen“ und zwei gaben an, dass sich ihre „Diarrhö“ durch einen plötzlichen Beginn manifestiert hätte. Bei zwei dieser acht Fälle bestand die „Diarrhö“ mit Sicherheit weniger als zehn Tage, bei zwei anderen länger als zehn Tage. Von den 57 Personen, die an „Bauchschmerzen“ litten, nannten 32 (46 %) auch „Fieber“, und zwei (3 %) wussten von sich, dass sie Parasitenträger seien, konnten jedoch die Art bzw. Arten nicht präzisieren. Über die 253 Untersuchten sei noch zu berichten, dass bei zwei Personen Salmonellen nachgewiesen wurde. Eine von diesen beiden hatte „Fieber“. Weitere acht Personen von den 253 hatten nur „Fieber“, und zwei Personen waren Parasitenträger konnten jedoch die Art bzw. Arten nicht präzisieren. Keiner der untersuchten Personen war Blutbeimengungen oder Blutauflagerungen im Stuhl aufgefallen.

Auffallend bei der Analyse der Symptomangaben der untersuchten Dorfbewohner war die Häufung der akuten gastrointestinalen Symptome in Hydurelyaz und Bagpnar im Verhältnis zu Kozan. Von den in Hydurelyaz untersuchten 92 Personen zeigten 35 Personen akute gastrointestinale Symptome. In Bagpnar zeigten 31 von 98 Personen diese Symptome, und in Kozan waren es nur 3 von 63 Personen.

Von den 253 Untersuchten gaben 40 Personen (15,8 %) an, dass sie an systemischen Krankheiten („anderen Krankheitssymptomen“) leiden. „Bluthochdruck“ wurde dreimal, „Diabetes mellitus“, „Bronchitis“ sowie „Kopfschmerz“ wurden zweimal, „Arthrose“, „rheumatoide Arthritis“, „Nierensteinleiden“, „Nierenschmerzen“, „Hämorrhoiden“, „Anosmie“ und „Cholelithiasis /Nierenzysten“ wurden jeweils einmal genannt. Weitere 24 Personen (9,5 %) erwähnten systemisch erkrankt zu sein, verschwiegen aber, um welche Krankheiten es sich dabei handelte. Keiner der Untersuchten nahm regelmäßig Medikamente ein.

3.1.2 Ergebnisse aus ökonomischen und sozialen Daten

Aus 253 Fragebögen konnten Auswertungen für ökonomische und soziale Daten erhoben

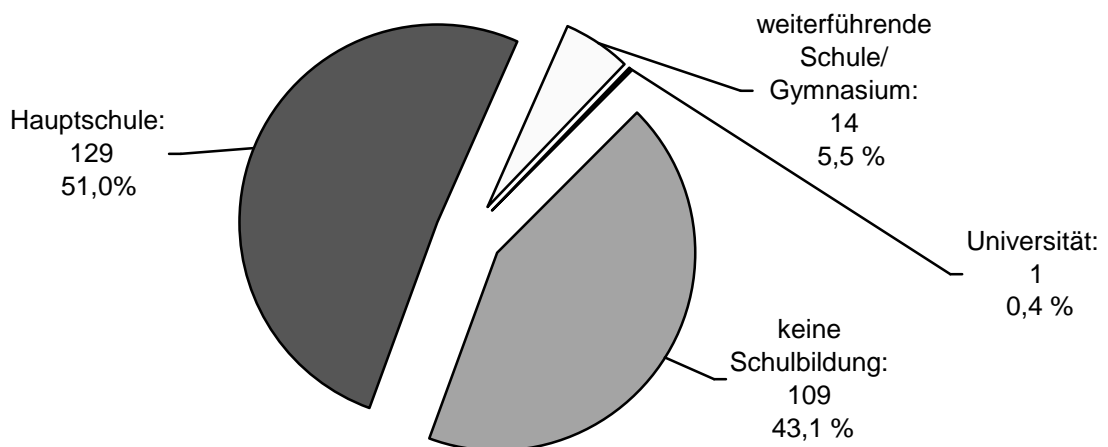
werden. Unter den 121 Erwerbstätigen waren 65 Hausfrauen (53,7 %), 26 Bauern (21,5 %), 7 Arbeiter (5,8 %), ein Angestellter (0,8 %) und 12 „sonstige“ nicht näher bezeichnete Erwerbstätige (9,9 %). Von den Erwerbsfähigen waren 10 Personen (8,3 %) arbeitslos.

Das monatliche Einkommen eines Haushaltes betrug im Durchschnitt 9,9 Millionen Türkische Lira (TL). Das monatliche Durchschnittseinkommen lag in Hydurelyaz bei 20,5 Mio. TL, in Kozan bei 10,2 Mio. TL und in Bagpunar bei 1,2 Mio. TL. Das niedrigste Einkommen pro Kopf hatte ein 20-Personen-Haushalt in Bagpunar (0 Mio. TL), das höchste ein acht Personen Haushalt in Hydurelyaz (30 Mio. TL). Im September 1996 war eine Mio. TL ungefähr 10 DM.

Von den insgesamt 62 ausgewerteten Haushalten, wobei Haushalt und Familie als gleichbedeutend zu sehen ist, lag die Größe bei einer bis 28 Personen. Ein Haushalt hatte im Durchschnitt zehn Mitglieder. Allerdings wurden im Mittel nur vier Personen pro Haushalt untersucht. Für die einzelnen Dörfer lagen die Zahlen bezüglich der Haushaltsgröße wie folgend: Hydurelyaz: 4 bis 16 Personen ($x = 8,8$) * ; Kozan: 5 bis 28 Personen ($x = 13,0$); Bagpunar: 1 bis 12 Personen ($x = 6,6$).

Die Erhebungsdaten bezüglich der Schulbildung sind in Abbildung 3.1 in absoluten Zahlen und in Prozent angegeben. Dabei wird zwischen „keine Schulbildung“, „Hauptschule“, „weiterführende Schule / Gymnasium“ und „Universität“ unterschieden. In Abbildung 3.2 sind diese Daten in Bezug auf jedes der drei untersuchten Dörfer bzw. Hydurelyaz, Kozan und Bagpunar wiedergegeben. Bemerkenswert ist der große Anteil an Personen, die keine Schulbildung genossen hatten.

Abbildung 3.1: Schulbildung in absoluter Zahl der Personen und relativer Häufigkeit



(*) x = arithmetischer Mittelwert

Abbildung 3.2: Schulbildung in absoluter Zahl der Personen und relativer Häufigkeit für Hydrelyaz

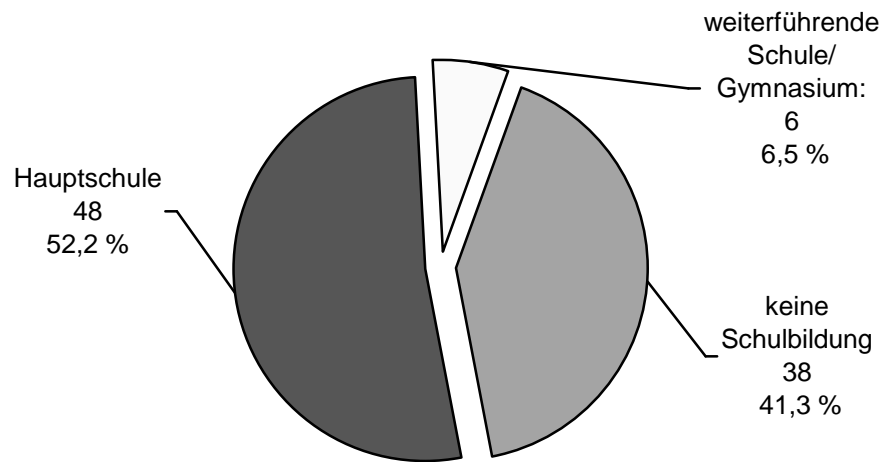


Abbildung 3.3: Schulbildung in absoluter Zahl der Personen und relativer Häufigkeit für Kozan

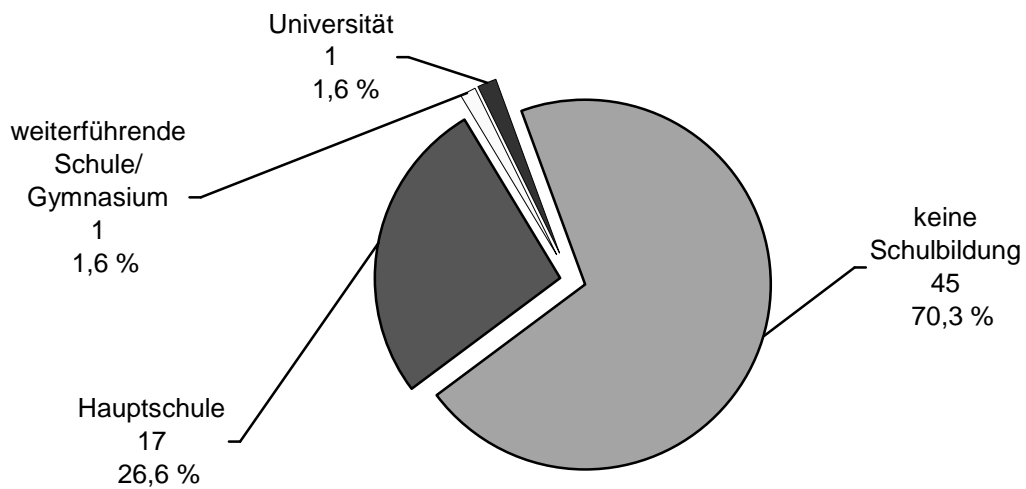
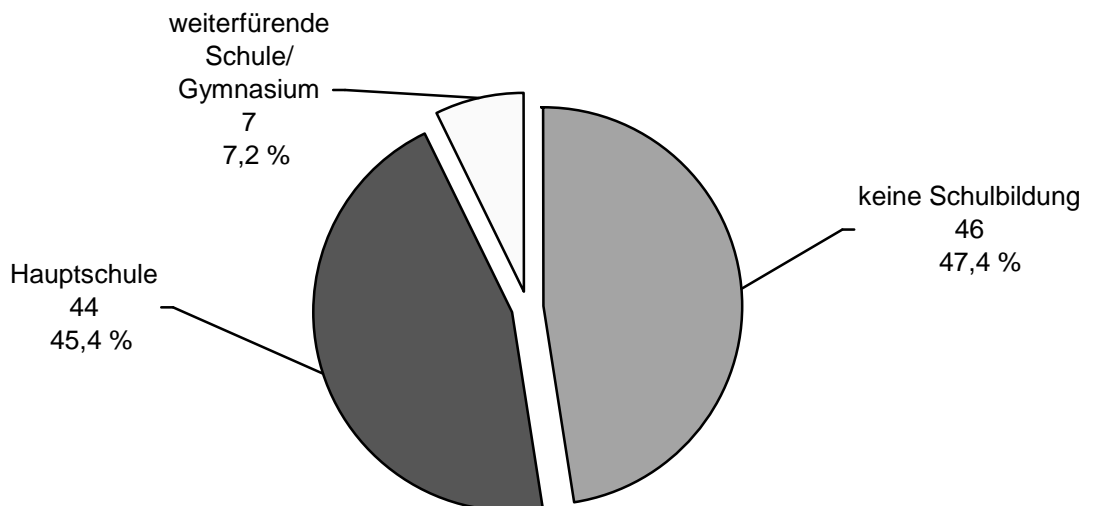


Abbildung 3.4: Schulbildung in absoluter Zahl der Personen und relativer Häufigkeit für Bagpunar



3.1.3 Ergebnisse aus Trinkwasserversorgung, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten

Die Daten über die Herkunft von Trinkwasser und Brauchwasser ergaben sich aus der Auswertung der haushaltsbezogenen Fragebögen für 257 Personen. Bezüglich des Hygieneverhalten konnten lediglich 253 Fragebögen verwertet werden.

Was die Trinkwasserversorgung betrifft ist Folgendes für die drei Dörfer zu sagen. In Hydreyaz und Kozan hatten zusammengerechnet 152 Personen eine eigene Trinkquelle (Brunnen), sieben Personen nicht. Diese sieben Personen teilten sich mit Mitgliedern von anderen Haushalten eine Trinkquelle. Die Trinkwasserversorgung Bagpunars erfolgte aus einer einzigen Quelle, wobei das hochgepumpte Wasser für 58 Personen direkt ins Haus geleitet wurde, und für weitere 40 Personen durch gemeinschaftlich genutzte Leitungen zur Verfügung stand. Durch diese Besonderheit lässt es sich nicht behaupten, dass irgendeiner der Einwohner eine eigene Trinkwasserquelle besaß. Die Einwohner dieses Dorfes nutzten eben eine einzige gemeinsame Quelle.

Alle Haushalte gaben an, ihr Obst und Gemüse vor dem Verzehr zu waschen und keinen rohen Fisch oder rohes Fleisch zu essen.

Das Brauchwasser zur Bewässerung der Anbaufelder wurde über Kanäle und Leitungen vom Oberlauf des Tigris den Dörfern Hydreyaz und Kozan zugeleitet. Bagpunar bezog sein Wasser ausschließlich aus der oben erwähnten einzigen Quelle, also waren dort Trink- und Brauchwasser identisch.

Auf die Frage: „Waschen Sie sich nach dem Defäzieren die Hände?“, antworteten 223 Personen (88,1 %) mit „ja“, 30 Personen (11,9 %) mit „nein“. Für Hydreyaz waren das: 72 „ja“ und 19 „nein“, für Kozan: 53 „ja“ und 11 „nein“ und für Bagpunar: 98 „ja“ und 0 „nein“. Stichprobenartige Untersuchungen zu den Händewaschvorrichtungen der einzelnen Haushalte zeigten aber, dass diese oft umständlich zu bedienen und ein gutes Stück weit weg von der Defäkationsstelle gelegen waren, oder sogar völlig fehlten. Alle Haushalte hatten eine eigene Toilette bzw. Defäkationsstelle.

3.2 Stuhlproben

3.2.1 Ergebnisse aus mikroskopischer Untersuchung

Es wurden 265 Stuhlproben gesammelt und im MIF-C-Verfahren (SAPERO & LAWLESS, 1953) auf Amöben untersucht. Nur bei 15 Proben (5,7 %) wurden unter dem Mikroskop eindeutig Zysten von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* und in zwei Fällen auch Minuta-Formen von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* gefunden. Magna-Formen wurden keine gefunden. Bei anderen 102 Proben wurden Zysten von *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* und *Jodamoeba bütschlii* gefunden (siehe Tabellen 3.3 und 3.4). In 76 Proben (28,7 %) wurden mehr als fünf, in 26 Proben (9,8 %) fünf oder weniger Zysten pro untersuchtem Stuhlpräparat gefunden, ganz unabhängig davon, ob von *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii* (siehe Tabelle 3.3). Die absoluten und relativen Häufigkeiten der ausgewerteten Darmprotozoen-Spezies in der Stuhlmikroskopie sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Stuhlmikroskopie für Hydurelyaz, Kozan, Bagpunar und gesamt

| Proben | Hydurelyaz | Kozan | Bagpunar | gesamt |
|---|-------------|-------------|-------------|--------------|
| infiziert bzw. kontaminiert mit <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i> , darunter auch andere Darmprotozoen * | 6 (6,5 %) | 3 (4,5 %) | 6 (5,7 %) | 15 (5,7 %) |
| kontaminiert mit anderen Darmprotozoen * : | | | | |
| T als 5 Zysten pro Präparat | 3 (3,3 %) | 8 (11,9 %) | 15 (14,2 %) | 26 (9,8 %) |
| > als 5 Zysten pro Präparat | 21 (22,8 %) | 11 (16,4 %) | 44 (41,5 %) | 76 (28,7 %) |
| insgesamt | 24 | 19 | 59 | 102 |
| ohne Darmprotozoen * und keine <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i> | 62 (67,4 %) | 45 (67,2 %) | 41 (38,7 %) | 148 (55,9 %) |
| Gesamtzahl | 92 (100 %) | 67 (100 %) | 106 (100 %) | 265 (100 %) |

* *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Jodamoeba bütschlii*

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Stuhlmikroskopie für Hydurelyaz, Kozaan, Bagpunar und gesamt hinsichtlich anderer Darmprotozoen-Spezies

| Spezies | Anzahl der Proben | | | |
|--|-------------------|--------|----------|--------|
| | Hydurelyaz | Kozaan | Bagpunar | gesamt |
| <i>Entamoeba coli</i> | 20 | 15 | 42 | 77 |
| <i>Entamoeba hartmanni</i> | 0 | 1 | 2 | 3 |
| <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 2 | 0 | 2 | 4 |
| <i>Entamoeba coli</i> und <i>Entamoeba hartmanni</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Entamoeba coli</i> und <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 2 | 3 | 12 | 17 |
| <i>Entamoeba hartmanni</i> und <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| gesamt | 24 | 19 | 59 | 102 |

Da laut Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.3) nicht nur alle Stuhlproben angezüchtet werden sollten, in denen *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mikroskopisch vorgefunden wurde, sondern auch die Proben mit mehr als 5 Zysten anderer Darmprotozoen bzw. *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* und *Jodamoeba bütschlii*, wurden von den 265 Proben 91 (34,3 %) für die Kulturanzüchtung nach ROBINSON verwendet. Diese Anzahl von 91 Proben ergab sich aus den 15 Proben, die mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* kontaminiert waren, und weiteren 76 Proben, die mehr als 5 Zysten pro Präparat von *Entamoeba coli* und / oder *Entamoeba hartmanni* und / oder *Jodamoeba bütschlii* aufwiesen (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Gesamtanzahl der Proben für die Kulturanzucht nach ROBINSON

| Proben | Hydrelyaz | Kozan | Bagpınar | gesamt |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| infiziert bzw. kontaminiert mit <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i> , darunter auch andere Darmprotozoen * | 6 (6,5 %) | 3 (4,5 %) | 6 (5,7 %) | 15 (5,7 %) |
| kontaminiert mit anderen Darmprotozoen * : > als 5 Zysten pro Präparat | 21 (22,8 %) | 11 (16,4 %) | 44 (41,5 %) | 76 (28,7 %) |
| Gesamtproben für Anzucht: | 27 (29,3 %) | 14 (20,9 %) | 50 (47,2 %) | 91 (34,3 %) |

* *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Jodamoeba bütschlii*

3.2.2 Ergebnisse der Anzucht

Von 91 Stuhlproben war die Anzucht bei 53 Stuhlproben (58 %) möglich. Eine ausreichende Vermehrung der Amöben zur Testdurchführung für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion gelang bei 42 Stuhlproben (46 %). Die Ergebnisse der Kultivierung sind für die drei Dörfer Hydrelyaz, Kozan und Bagpınar in der Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6 Anwuchsraten, dargestellt für Hydrelyaz, Kozan und Bagpınar

| | Hydrelyaz | Kozan | Bagpınar | gesamt |
|---|-----------|-------|----------|--------|
| Anzahl gelungener Anzuchtungen | 15 | 10 | 28 | 53 |
| Proben für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und r-PCR | 9 | 9 | 24 | 42 |

r-PCR Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

3.3 Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion

3.3.1 Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung

Für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung konnten 42 Proben aufbereitet werden (siehe Tabelle 3.6). In zwei dieser Proben (5 %) wurde das für *Entamoeba histolytica* typische Bandenmuster nachgewiesen. Weitere 24 Proben (57 %) zeigten das für *Entamoeba dispar* typische Bandenmuster. Eine Probe (2 %) wies mit zwei Doppelbanden auf eine Doppelinfektion mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* hin. Weitere 15 Proben (36 %) waren negativ.

Die Verteilung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* auf Hydurelyaz, Kozan und Bagpunar ergab folgende Ergebnisse:

| | | |
|---|------------------------------|-------------|
| Hydurelyaz (9 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 8 Personen |
| | negativ | 1 Person |
| Kozan (9 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 1 Person |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 3 Personen |
| | negativ | 5 Personen |
| Bagpunar (24 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 1 Person |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 13 Personen |
| | Doppelinfektion | 1 Person |
| | negativ | 9 Personen |

3.3.2 Ergebnisse der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Insgesamt wurden 42 aufbereitete Proben der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) zugeführt (siehe Tabelle 3.6). Davon zeigte eine Probe (2 %) das *Entamoeba histolytica*-Bandenmuster, 25 Proben (60 %) das *Entamoeba dispar*-Bandenmuster und 16 Proben (38 %) ein negatives Ergebnis.

Die Verteilung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* auf Hydrellyaz, Kozan und Bagpınar ergab folgende Ergebnisse:

| | | |
|---|------------------------------|------------|
| Hydrellyaz (9 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 8 Personen |
| | negativ | 1 Person |

| | | |
|------------------------------------|------------------------------|------------|
| Kozan (9 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 7 Personen |
| | negativ | 2 Personen |

| | | |
|--|------------------------------|-------------|
| Bagpınar (24 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 1 Person |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 10 Personen |
| | negativ | 13 Personen |

3.3.3 Ergebnisse der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben

Zur Unterscheidung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* durch die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion blieb in 47 Proben ausreichend Stuhlmaterial übrig. In den 47 Proben wurde null mal *Entamoeba histolytica*, sieben mal *Entamoeba dispar* und 40 mal ein negatives Ergebnis nachgewiesen (siehe Tabelle 6.1).

Die Verteilung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* auf Hydreylyaz, Kozan und Bagpunar ergab folgende Ergebnisse:

| | | |
|--|------------------------------|-------------|
| Hydreylyaz (20 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 2 Personen |
| | negativ | 18 Personen |
| Kozan (13 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 3 Personen |
| | negativ | 10 Personen |
| Bagpunar (14 untersuchte Stuhlproben): | <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 Personen |
| | <i>Entamoeba dispar</i> | 2 Personen |
| | negativ | 12 Personen |

3.3.4 Gesamtergebnis aus der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion

Die Anwendung verschiedener Differenzierungsmethoden (Hexokinase-Isoenzymauftrennung, Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion) ergab für etliche Proben nicht übereinstimmende Ergebnisse, was die Infektion mit *Entamoeba histolytica* bzw. die Kontamination mit *Entamoeba dispar* betrifft. Da jedoch die Festlegung eines Endresultates für diese Studie erst recht für die klinische Anwendung erforderlich war, wurde folgende Richtlinie festgelegt:

- Eine Probe galt als mit *Entamoeba histolytica* infiziert bzw. mit *Entamoeba dispar* kontaminiert, wenn mindestens eine der drei Methoden ein positives Ergebnis lieferte, gleichgültig ob die anderen zwei Methoden ein negatives Ergebnis lieferten oder gar nicht angewandt wurden.

- Wurde mit Hilfe der drei Methoden, unabhängig ob mit derselben oder unterschiedlicher Methoden, *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in derselben Probe nachgewiesen, so galt dies als eine Doppelinfektion.
- Eine Probe galt als negativ, wenn bei keiner der drei Methoden ein positives Ergebnis erzielt wurde, gleichgültig wie viele Methoden angewandt wurden.

Hieraus ergeben sich folgende Endergebnisse: drei *Entamoeba histolytica*, 35 *Entamoeba dispar*, eine Doppelinfektion und 32 negative Ergebnisse (siehe Tabelle 6.1). Aus den 265 untersuchten Stuhlproben errechnet sich für die Bevölkerung der untersuchten Region eine Prävalenz von 1,1 % für *Entamoeba histolytica* und von 13,6 % für *Entamoeba dispar*.

3.4 Ergebnisse aus der Antikörperbestimmung

Aus 251 Seren wurden Ergebnisse mit Hilfe eines ELISAs zur Bestimmung der Menge vorhandener Antikörper gegen Rohantigen von *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar* gewonnen. Die Antikörperbestimmung gegen Rohantigen von *Entamoeba dispar* war bei zwei Proben nicht möglich, sodass sich die Ergebnisse nur auf 249 Seren beziehen.

Für die Antikörperkonzentration wurde ein Grenzwert von 10 Antikörpereinheiten (AKE) festgelegt. Ein Ergebnis von 11 und mehr AKE galt als positiv.

Insgesamt wiesen 36 Personen Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* auf. Die Werte der Antikörperkonzentration lagen zwischen 11,1 und 54,2 AKE ($\bar{x} = 22,6$; $\mu = 20,3$; $\sigma = 10,6$) * . Bezogen auf die 251 untersuchten Personen errechnet sich somit eine Seroprävalenz von 14,3 % für *Entamoeba histolytica*. Antikörper gegen *Entamoeba dispar* wiesen insgesamt 114 Personen auf, wobei die Werte der Antikörpermenge von 11,9 bis 154,9 AKE reichten ($\bar{x} = 45$; $\mu = 36,6$; $\sigma = 31,7$). In Bezug auf die 249 untersuchten Personen ergibt dies eine Seroprävalenz von 45,8 % für *Entamoeba dispar*. Die entsprechenden Serumwerte der Antikörperbestimmungen sind für die drei Dörfer Hydirelyaz, Kozan, Bagpunar und insgesamt in der Tabelle 3.7 dargestellt.

(*) \bar{x} = arithmetischer Mittelwert; μ = Median; σ = Standardabweichung

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Antikörperbestimmung für die Dörfer Hydrelyaz, Kozan, Bagpınar und insgesamt

| | Hydrelyaz | | Kozan | | Bagpınar | | insgesamt | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ak gegen <i>E.h.</i> | Ak gegen <i>E.d.</i> | Ak gegen <i>E.h.</i> | Ak gegen <i>E.d.</i> | Ak gegen <i>E.h.</i> | Ak gegen <i>E.d.</i> | Ak gegen <i>E.h.</i> | Ak gegen <i>E.d.</i> |
| Personen | 9 | 22 | 8 | 36 | 19 | 56 | 36 | 114 |
| Minimum in AKE | 11,2 | 11,9 | 15,5 | 14,1 | 11,1 | 11,9 | 11,1 | 11,9 |
| Median (μ) in AKE | 14,8 | 21,2 | 19,2 | 46,5 | 21,3 | 37,5 | 20,3 | 36,6 |
| Maximum in AKE | 41,4 | 146 | 28,5 | 112,2 | 54,2 | 154,9 | 54,2 | 154,9 |
| arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) in AKE | 19,7 | 31,1 | 20,3 | 49,9 | 24,9 | 47,4 | 22,6 | 45,0 |
| Standardabweichung (σ) | 10,4 | 29,1 | 4,6 | 28,9 | 12,3 | 33,3 | 10,6 | 31,7 |
| Seroprävalenz in % der Dörfer bzw. insgesamt * | 10,0 | 24,2 | 12,5 | 59,0 | 19,6 | 57,7 | 14,3 | 45,8 |

* berechnet aus 251 Seren, die auf Antikörper gegen *Entamoeba histolytica*, bzw. 249 Seren, die auf Antikörper gegen *Entamoeba dispar* untersucht wurden

Ak gegen *E.h.* Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* davon einige mit Antikörper gegen *Entamoeba dispar* vgl. Tabelle 3.8

Ak gegen *E.d.* Antikörper gegen *Entamoeba dispar* davon einige mit Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* vgl. Tabelle 3.8

AKE Antikörpereinheiten

Von den 251 Untersuchten hatten lediglich sieben Personen (2,8 %) ausschließlich gegen *Entamoeba histolytica* Antikörper. Antikörper nur gegen *Entamoeba dispar* hatten dagegen 85 von den 249 untersuchten Personen (34,1 %). Antikörper gegen beide Spezies wiesen 29 Personen (11,6 %) der 249 Untersuchten auf. Außerdem hatten 128 Personen (51,4 %) der 249 Untersuchten weder Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* noch gegen *Entamoeba dispar* (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8 Ergebnisse der Antikörperbestimmung

| | Antikörper gegen <i>Entamoeba histolytica</i> (ausschließlich) | Antikörper gegen <i>Entamoeba dispar</i> (ausschließlich) | Antikörper gegen <i>Entamoeba histolytica</i> (<i>E.h.</i>) und <i>Entamoeba dispar</i> (<i>E.d.</i>) | | Antikörper gegen <i>Entamoeba histolytica</i> (insgesamt) | Antikörper gegen <i>Entamoeba dispar</i> (insgesamt) | keine Anti- körper |
|--|---|--|---|-----------------|--|---|--------------------------|
| | | | (<i>E.h.</i>) | (<i>E.d.</i>) | | | |
| Personen | 7 | 85 | 29 | | 36 | 114 | 128 |
| Minimum in AKE | 11,2 | 11,9 | 11,1 | 15,0 | 11,1 | 11,9 | |
| Median (μ) in AKE | 13,8 | 29,3 | 21,4 | 71,7 | 20,3 | 36,6 | |
| Maximum in AKE | 25,2 | 93,1 | 54,2 | 154,9 | 54,2 | 154,9 | |
| Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) in AKE | 15,4 | 34,9 | 24,3 | 75,2 | 22,6 | 45 | |
| Standardab- weichung (σ) | 5 | 20,4 | 10,9 | 39,3 | 10,6 | 31,7 | |
| in % aller untersuchten Personen * | 2,8 | 34,1 | 11,6 | | 14,3 | 45,8 | 51,4 |

* berechnet aus 251 untersuchten Seren auf Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* bzw. 249 untersuchten Seren auf Antikörper gegen *Entamoeba dispar*

3.5 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden

3.5.1 Vergleich der stuhlmikroskopischen Untersuchung von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* und *Jodamoeba bütschlii*

In den 15 Proben, in welchen *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* eindeutig in der Stuhlmikroskopie nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.2.1), fand sich regelmäßig

Entamoeba coli, *Entamoeba hartmanni* und *Jodamoeba bütschlii* hingegen wurden in den genannten 15 Proben jeweils nur einmal beobachtet, siehe Tabelle 3.9.

Tabelle 3.9: Stuhlmikroskopischer Nachweis von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* im Vergleich zu anderen Darmprotzoen-Spezies bezogen auf Hydrellyaz, Kozan, Bagpunar und gesamt

| Stuhlproben | <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i> | | | |
|--|--|-------|----------|--------|
| | Hydrellyaz | Kozan | Bagpunar | gesamt |
| <i>Entamoeba coli</i> | 5 | 3 | 5 | 13 |
| <i>Entamoeba hartmanni</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Entamoeba coli</i> und <i>Entamoeba hartmanni</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Entamoeba coli</i> und <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Entamoeba hartmanni</i> und <i>Jodamoeba bütschlii</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| gesamt | 6 | 3 | 6 | 15 |

3.5.2 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion

Die Ergebnisse der drei Differenzierungsmethoden wurden zuerst für je zwei Methoden verglichen. In einem zweiten Schritt wurden dann alle drei Methoden miteinander verglichen, wobei allerdings die Anzahl der vergleichbaren Proben viel geringer war.

In der Tabelle 3.10 wird der paarweise Vergleich der drei Methoden wiedergegeben. Dabei wird die Übereinstimmung der vergleichbaren Proben absolut und in Prozent dargestellt. Für den

Vergleich der Hexokinase-Isoenzymauftrennung mit der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion konnten 42 Proben herangezogen werden, für den Vergleich der Hexokinase-Isoenzymauftrennung bzw. der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion mit der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion jedoch jeweils nur 19 Proben. Als Beispiel sei der Vergleich zwischen den *Entamoeba dispar*-Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion erwähnt. Mit den beiden genannten Methoden wurden aus 42 Proben 32 positiv auf *Entamoeba dispar* getestet. Allerdings waren von den 32 positiven Proben nur 17 übereinstimmend. Dies ergibt eine Übereinstimmung von 17 in 32, also von 53 %.

Tabelle 3.10 Übereinstimmung von je zwei Differenzierungsmethoden hinsichtlich ihrer Ergebnisse

| Ergebnisse | Übereinstimmung | | | | | |
|--|------------------|------|------------------|------|---------------|------|
| | Isoenzym / r-PCR | | Isoenzym / k-PCR | | r-PCR / k-PCR | |
| | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 0 / 3 | 0 | 0 / 2 | 0 | 0 / 1 | 0 |
| <i>Entamoeba dispar</i> | 17 / 32 | 53 | 3 / 11 | 27 | 4 / 13 | 31 |
| <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | 1 / 0 | 0 | 1 / 0 | 0 | | |
| negativ | 7 / 24 | 29 | 5 / 16 | 31 | 5 / 15 | 33 |

Isoenzym Hexokinase-Isoenzymauftrennung
r-PCR Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion
k-PCR kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion

Für den gleichzeitigen Vergleich der drei Differenzierungsmethoden untereinander konnten lediglich 19 Proben herangezogen werden, da von den getesteten Stuhlproben nur 19 identisch waren. Die vergleichbaren Ergebnisse sind in der Tabelle 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.11 Übereinstimmung der drei Differenzierungsmethoden hinsichtlich ihrer Ergebnisse

| Gruppierung der Proben | | | | Anzahl der Proben | Übereinstimmung | |
|---|---|--|--|-------------------------|-----------------|------|
| Protozoen-Spezies | Hexokinase- Isoenzym- auftrennung | Riboprinting- Polymerase- Kettenreaktion | kolorimetrische Polymerase- Kettenreaktion | | absolut | in % |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | <i>E.h.</i> | neg | neg | 2 | 0 / 3 | 0 % |
| | <i>E.h.+E.d.</i> | <i>E.h.</i> | neg | 1 | | |
| <i>Entamoeba dispar</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | 3 | 3 / 15 | 20 % |
| | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | neg | 5 | | |
| | <i>E.d.</i> | neg | neg | 2 | | |
| | neg | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | 1 | | |
| | neg | <i>E.d.</i> | neg | 4 | | |
| <i>Entamoeba histolytica</i> und <i>Entamoeba dispar</i> | <i>E.h.+E.d.</i> | <i>E.h.</i> | neg | 1 | 0 / 1 | 0 % |
| negative | neg | neg | neg | 1 | 1 / 16 | 6 % |
| | neg | <i>E.d.</i> | neg | 4 | | |
| | neg | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | 1 | | |
| | <i>E.h.</i> | neg | neg | 2 | | |
| | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | neg | 5 | | |
| | <i>E.d.</i> | neg | neg | 2 | | |
| | <i>E.h.+E.d.</i> | <i>E.h.</i> | neg | 1 | | |

E.h. *Entamoeba histolytica*

E.d. *Entamoeba dispar*

neg negativ

Nimmt man die Ergebnisse der r-PCR-Methode als Referenz und errechnet für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung die Sensitivität und Spezifität für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, so erhält man 69 % Sensitivität und 44 % Spezifität. Wird jedoch die Hexokinase-Isoenzymauftrennung als Referenz-Methode genommen, errechnet sich eine Sensitivität von 67 % und Spezifität von 47 % für die r-PCR-Methode. Unter Referenznahme der Hexokinase-Isoenzymauftrennung bzw. der r-PCR-Methode errechnet sich eine Sensitivität von 23 % bzw. 28 % und eine Spezifität von 83 % bzw. 100 % für die k-PCR-Methode.

3.5.3 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit der Serumuntersuchung

Für die nachfolgenden Vergleiche konnten die Ergebnisse von 235 Personen übernommen werden.

Um die Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Ergebnissen der Serumuntersuchung besser vergleichen zu können, wurden alle Ergebnisse in der Tabelle 6.1 zusammengefasst (siehe auch Abschnitt 3.3.4). Außerdem werden in Tabelle 3.12 noch die Zahlen der Personen mit Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica* und / oder *Entamoeba dispar* angegeben, deren Proben auch mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion untersucht wurden.

Von sieben Personen, die ausschließlich Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* aufwiesen, wurde mit Hilfe der drei oben genannten Differenzierungsmethoden einmal *Entamoeba dispar* vorgefunden. Von 79 Personen, die ausschließlich Antikörper gegen *Entamoeba dispar* gebildet hatten, war in Stuhlproben von 12 Personen *Entamoeba dispar* nachweisbar. Unter 29 Personen, welche Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* aufwiesen, fanden sich durch die oben genannten Differenzierungsmethoden zwei Personen mit *Entamoeba histolytica*, 13 mit *Entamoeba dispar* und eine mit einer Doppelinfektion. Unter 120 Personen, welche keine Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* zeigten, fand sich *Entamoeba dispar* in den Stuhlproben von neun Personen. In Tabelle 3.12 sind Personen mit

Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* im Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion wiedergegeben.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Antikörperbestimmung der Personen in Bezug auf die Ergebnisse der Differenzierungsmethoden (Hexokinase-Isoenzymaufreinigung, Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion)

| | Ergebnisse der r-PCR, Isoenzymbestimmung und k-PCR | | | | nicht untersucht | gesamt |
|---|---|-------------|---|---------|---------------------|--------|
| | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | Doppelinfektion: <i>E.h.</i> und <i>E.d.</i> | negativ | | |
| Antikörper gegen <i>E.h.</i> ausschließlich | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 7 |
| Antikörper gegen <i>E.d.</i> ausschließlich | 0 | 12 | 0 | 13 | 54 | 79 |
| Antikörper gegen <i>E.h.</i> und <i>E.d.</i> | 2 | 13 | 1 | 2 | 11 | 29 |
| keine Antikörper | 0 | 9 | 0 | 13 | 98 | 120 |
| gesamt | 2 | 35 | 1 | 30 | 167 | 235 |

r-PCR Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

k-PCR kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion

E.h. *Entamoeba histolytica*

E.d. *Entamoeba dispar*

3.5.4 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus den Fragebögen und den serologischen Ergebnissen

Für die Ergebnisse der personenbezogenen Daten wie auch der Daten zur ökonomischen und sozialen Situation, zur Trinkwasser- sowie Brauchwasserversorgung, zum Hygieneverhalten und zur Serologie der Probanden sind in allen nachfolgenden Tabellen die Konfidenzintervalle (KI) der Odds Ratio (OR) auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $\alpha = 0,05$ (5 %-Niveau) angegeben. Signifikante Ergebnisse sind mit dem Symbol * versehen. In einigen Fällen konnten aus statistischen Gründen u. a. wegen zu geringer Fallzahlen (LORENZ, 1996) keine Konfidenzintervalle und keine zuverlässigen p-Werte berechnet werden. Hierfür wurde der Fisher exakte Vierfeldertest angewendet, und die entsprechenden Tabellenzeilen mit dem Symbol ° gekennzeichnet. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden auch in diesem Fall mit dem Symbol * markiert.

3.5.4.1 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den personenbezogenen Daten

Unter „Infizierte“ sind in allen nachfolgenden Tabellen Personen zu verstehen, bei denen der Nachweis von *Entamoeba histolytica* und / oder *Entamoeba dispar* mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) oder der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) gelang (siehe Abschnitt 3.3.4). Für den Vergleich wurden die Ergebnisse der personenbezogenen Daten und der Hexokinase-Isoenzymauftrennung sowie r-PCR und k-PCR nochmals in der Tabelle 3.13 wiedergegeben.

Tabelle 3.13: Personenbezogene Daten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle

| Parameter | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Infizierte aller übrigen Gruppen pro Gesamtzahl der Personen aller anderen Gruppen | | Odds-Ratio (Konfidenzintervall) | Fishers exakter Vierfelder-test |
|--------------------------------------|----------|---|--------|--|--------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | absolut | in % | absolut | in % | | |
| Altersgruppe | 0-10 | 12 / 83 | 14,5 % | 26 / 156 | 16,7 % | 0,845 (0,390-1,744) | |
| | 11-20 | 17 / 69 | 24,6 % | 21 / 170 | 12,4 % | 2,319 * (1,127-4,732) | |
| | 21-30 | 5 / 35 | 14,3 % | 33 / 204 | 16,2 % | 0,864 (0,279-2,221) | |
| | 31-40 | 3 / 22 | 13,6 % | 35 / 217 | 16,1 % | 0,821 ° | 1,000 |
| | 41-50 | 1 / 8 | 12,5 % | 37 / 231 | 16,0 % | 0,7490 ° | 1,000 |
| | >50 | 0 / 22 | 0 % | 38 / 217 | 17,5 % | 0 ° | 0,029 * |
| | gesamt | 38 / 239 | | | | | |
| Geschlecht | männlich | 15 / 103 | 14,6 % | 23 / 137 | 16,8 % | 0,845 (0,387-1,623) | |
| | weiblich | 23 / 137 | 16,8 % | 15 / 103 | 14,6 % | 1,184 (0,588-2,443) | |
| | gesamt | 38 / 240 | | | | | |
| akute gastro-intestinale Symptomatik | ja | 7 / 64 | 10,9 % | 31 / 175 | 17,7 % | 0,570 (0,215-1,278) | |
| | nein | 31 / 175 | 17,7 % | 7 / 64 | 10,9 % | 1,753 (0,768-4,534) | |
| | gesamt | 38 / 239 | | | | | |
| andere Krankheits-symptome ** | ja | 9 / 40 | 22,5 % | 29 / 199 | 14,6 % | 1,702 (0,702-3,835) | |
| | nein | 29 / 199 | 14,6 % | 9 / 40 | 22,5 % | 0,588 (0,261-1,424) | |
| | gesamt | 38 / 239 | | | | | |

* signifikante Ergebnisse auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $\alpha=0,05$ (5 %-Niveau) bzw. $p<0,05$

** vgl. Abschnitt 3.1.1

° keine Konfidenzintervalle berechenbar (vgl. Abschnitt 3.5.4), daher Anwendung des Fishers exakten Vierfeldertests

Während für 11- bis 20- Jährige ein signifikant erhöhtes Infektions- / Kontaminationsrisiko (OR=2,319, KI=1,127-4,732) zu verzeichnen war, zeigte sich bei den 41- bis 50- Jährigen (OR=0,749) und bei den über 50- Jährigen (OR=0) eine gegenläufige Tendenz. Aufgrund des Wertes der Odds Ratio und dem Ergebnis des Fishers exakten Vierfeldertests ($p < 0,05$) ist bei der letzteren Altersgruppe ein Schutz vor einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* anzunehmen. Die Gruppe der Personen mit akuter gastro-intestinaler Symptomatik war seltener mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert (OR=0,570, KI=0,215-1,278), hingegen die Gruppe der Personen mit „anderen Krankheitssymptomen“ (siehe Abschnitt 3.1.1) häufiger infiziert bzw. kontaminiert (OR=1,702, KI=0,702-3,835).

3.5.4.2 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den ökonomischen und sozialen Daten

Im Folgenden sind die Ergebnisse der ökonomischen und sozialen Daten im Vergleich zur Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) in Tabellenform wiedergegeben.

Tabelle 3.14: Ökonomische und soziale Daten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle

| Parameter | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Infizierte aller übrigen Gruppen pro Gesamtzahl der Personen aller anderen Gruppen | | Odds-Ratio (Konfidenzintervall) | Fishers exakter Vierfeldertest |
|--------------|---------------------------|---|--------|--|--------|---------------------------------|--------------------------------|
| | | absolut | in % | absolut | in % | | |
| Berufsgruppe | Bauer | 3 / 26 | 11,5 % | 35 / 213 | 16,4 % | 0,663 (0,152-2,042) | |
| | Angestellte | 0 / 1 | 0 % | 38 / 238 | 16,0 % | 0 ° | 1,000 |
| | Arbeiter | 1 / 5 | 20 % | 37 / 234 | 15,8 % | 1,331 ° | 0,583 |
| | Arbeitslose | 2 / 10 | 20 % | 36 / 229 | 15,7 % | 1,340 ° | 0,663 |
| | Hausfrau | 10 / 61 | 16,4 % | 28 / 178 | 15,7 % | 1,050 (0,458-2,251) | |
| | sonstige | 3 / 11 | 27,3 % | 35 / 228 | 15,3 % | 2,068 ° | 0,388 |
| | Schüler | 19 / 125 | 15,2 % | 19 / 114 | 16,7 % | 1,116 (0,555-2,242) | |
| | gesamt | 38 / 239 | | | | | |
| Einkommen | < als 1 MTL | 17 / 100 | 17,0 % | 20/123 | 16,3 % | 1,055 (0,549-2,141) | |
| | Yals 1 MTL | 20 / 123 | 16,3 % | 17/100 | 17,0 % | 0,948 (0,467-1,942) | |
| | gesamt | 37 / 223 | | | | | |
| Bildung | keine | 18 / 121 | 14,9 % | 20/117 | 17,1 % | 0,856 (0,425-1,716) | |
| | Hauptschule | 18 / 102 | 17,6 % | 20/136 | 14,7 % | 1,254 (0,621-2,517) | |
| | weiterführende Schule /G. | 2 / 14 | 14,3 % | 36/224 | 16,1 % | 0,875 ° | 0,865 |
| | Universität | 0 / 1 | 0 % | 38 / 237 | 16,0 % | 0 | |
| | gesamt | 38 / 238 | | | | | |

< als 1MTL Einkommen kleiner als 1 Million Türkische Lira pro Kopf eines Haushaltes im Monat

Yals 1MTL Einkommen von einer Million und mehr Türkische Lira pro Kopf und Monat

° keine Konfidenzintervalle berechenbar (vgl. Abschnitt 3.5.4), daher Anwendung des Fishers exakten Vierfeldertests

Während für Bauern ein vermindertes Risiko für eine Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bestand (OR=0,663, KI=0,152-2,042), ließ sich für die Personen „sonstiger Berufsgruppen“ (siehe Abschnitt 3.1.2) ein erhöhtes Risiko für eine Infektion bzw. Kontamination (OR=2,068) nachweisen, allerdings nicht mit dem Fisher exakten Vierfeldertest ($p > 0,5$).

3.5.4.3 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus Trinkwasser-, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus Trinkwasserversorgung, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten im Vergleich zur Hexokinase-Isoenzymauftrennung der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) in Tabellenform wiedergegeben.

Tabelle 3.15: Daten aus Trinkwasser- Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle

| Parameter | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Infizierte aller übrigen Gruppen pro Gesamtzahl der Personen aller anderen Gruppen | | Odds-Ratio | Konfidenzintervalle der Odds-Ratio ggf. Fishers exakter Vierfelder-test |
|----------------------------------|-------------------|---|--------|--|--------|------------|--|
| | | absolut | in % | absolut | in % | | |
| eigene Trinkquelle | ja | 18 / 145 | 12,4 % | 20 / 97 | 20,6 % | 0,546 | 0,269-1,096 |
| | nein | 20 / 97 | 20,6 % | 18 / 145 | 12,4 % | 1,833 | 0,912-3,710 |
| | gesamt | 38 / 242 | | | | | |
| Brauchwasser | Tigris-Wasser | 18 / 152 | 11,8 % | 20 / 97 | 20,6 % | 0,517 | 0,256-1,038 |
| | Gemeinsame Quelle | 20 / 97 | 20,6 % | 18 / 152 | 11,8 % | 1,934 | 0,964-3,907 |
| | gesamt | 38 / 249 | | | | | |
| Händewaschen nach dem Defäzieren | ja | 38 / 209 | 18,2 % | 0 / 29 | 0 % | | ° |
| | nein | 0 / 29 | 0 % | 38 / 203 | 18,2 % | 0 | 0,006 * |
| | gesamt | 38 / 238 | | | | | |

° keine Konfidenzintervalle berechenbar (vgl. Abschnitt 3.5.4)

* signifikant auf dem Wahrscheinlichkeitsniveau $p < 0,05$ mit dem Fisher exakten Vierfeldertest

Ein vermindertes Risiko für eine Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bestand für die Personen, deren Haushalt über eine eigene Trinkquelle verfügte (OR=0,546, KI=0,269-1,096), und bei den Personen, die ihr Brauchwasser aus dem Fluss Tigris bezogen (OR=0,517, KI=0,256-1,038). Ein erhöhtes Risiko für eine Infektion bzw. Kontamination bestand also für die Personen, die keine eigene Trinkquelle hatten, und die Personen, die ihr Brauchwasser aus einer gemeinsamen Quelle bezogen (vgl. Abschnitt 3.1.3).

Ein Schutz vor einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bestand für Personen, die sich nach dem Defäzieren die Hände nicht wuschen (Fishers exakter Vierfeldertest, $p < 0,05$). Wie schon in Abschnitt 3.1.3 dargestellt, machte eine stichprobenhafte Untersuchung der sanitären Verhältnisse aber deutlich, dass eine Händewaschmöglichkeit oft nicht oder nur in unzureichender Weise gegeben war.

3.5.4.4 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den serologischen Daten

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den serologischen Daten im Vergleich zur Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) in Tabellenform wiedergegeben.

Tabelle 3.16: Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*- und Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle

| Parameter | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Infizierte aller übrigen Gruppen pro Gesamtzahl der Personen aller anderen Gruppen | | Odds-Ratio | Konfidenzintervalle der Odds-Ratio |
|--|---------|---|--------|--|--------|------------|------------------------------------|
| | | absolut | in % | absolut | in % | | |
| Träger von Anti- <i>Entamoeba histolytica</i> -Antikörpern insgesamt ** | positiv | 17 / 36 | 47,2 % | 21 / 202 | 10,4 % | 7,712 * | 3,488-17,253 |
| | negativ | 21 / 202 | 10,4 % | 17 / 36 | 47,2 % | 0,129 * | 0,058-0,287 |
| | gesamt | 38 / 238 | | | | | |
| Träger von Anti- <i>Entamoeba dispar</i> -Antikörpern insgesamt *** | positiv | 28 / 109 | 25,7 % | 10 / 127 | 7,9 % | 4,044 * | 1,918-9,178 |
| | negativ | 10 / 127 | 7,9 % | 28 / 109 | 25,7 % | 0,247 * | 0,109-0,521 |
| | gesamt | 38 / 236 | | | | | |

* signifikante Ergebnisse auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $\alpha= 0,05$ (5 %-Niveau)

** davon einige Träger mit Antikörpern gegen *Entamoeba dispar* (vgl. Tabelle 3.8)

*** davon einige Träger mit Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica* (vgl. Tabelle 3.8)

Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern hatten ein signifikant hohes Risiko (OR=7,712, KI=3,488-17,253) mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu sein. Für Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern war das Risiko ebenfalls signifikant hoch (OR=4,044, KI=1,918-9,178).

3.5.5 Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchung mit den Fragebögen

Ein Vergleich von Serumuntersuchungen zu Altersgruppen, Geschlecht und akuter gastrointestinaler Symptome ist in Tabelle 3.17 wiedergegeben. Zur Bewertung der Infektionshäufigkeiten sind die Konfidenzintervalle (KI) der Odds Ratio (OR) auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $\alpha= 0,05$ (5 %-Niveau) angegeben. Signifikante Ergebnisse sind mit dem Symbol * versehen. In einigen Fällen konnten aus statistischen Gründen u. a. wegen zu geringer Fallzahlen (LORENZ, 1996) keine Konfidenzintervalle und keine zuverlässigen p-Werte berechnet werden. Die entsprechenden Tabellenzeilen wurden mit dem Symbol ° gekennzeichnet und der Fisher exakte Vierfeldertest angewendet.

Tabelle 3.17: Personenbezogene Daten im Vergleich zu Trägern von Anti-*Entamoeba histolytica*- und Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervallen

| | | Träger von Anti- <i>Entamoeba histolytica</i> -Antikörpern pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Odds-Ratio (Konfidenzintervall) | Fishers exakter Vierfelder-test | Träger von Anti- <i>Entamoeba dispar</i> -Antikörpern pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Odds-Ratio (Konfidenzintervall) | Fishers exakter Vierfelder-test |
|-----------------------------------|----------|---|----|---------------------------------|---------------------------------|--|----|---------------------------------|---------------------------------|
| | | absolut | % | | | absolut | % | | |
| Altersgruppe | 0-10 | 12 / 86 | 14 | 0,946 (0,435-1,967) | | 35 / 86 | 41 | 0,739 (0,433-1,251) | |
| | 11-20 | 12 / 73 | 16 | 1,254 (0,573-2,623) | | 43 / 72 | 60 | 2,245 * (1,289-3,958) | |
| | 21-30 | 5 / 35 | 14 | 0,989 (0,319-2,554) | | 14 / 35 | 40 | 0,768 0,364-1,577 | |
| | 31-40 | 3 / 23 | 13 | ° | 1,000 | 7 / 22 | 32 | ° | 0,188 |
| | 41-50 | 2 / 9 | 22 | ° | 0,621 | 2 / 9 | 22 | ° | 0,187 |
| | >50 | 2 / 24 | 8 | ° | 0,545 | 12 / 24 | 50 | 1,217 (0,520-2,854) | |
| | gesamt | 36 / 250 | | | | 113 / 248 | | | |
| Geschlecht | männlich | 14 / 109 | 13 | 0,797 (0,380-1,626) | | 43 / 107 | 40 | 0,681 (0,408-1,131) | |
| | weiblich | 22 / 141 | 16 | 1,255 (0,615-2,634) | | 70 / 141 | 50 | 1,467 (0,884-2,448) | |
| | gesamt | 36 / 250 | | | | 113 / 248 | | | |
| akute gastro-intestinale Symptome | ja | 10 / 68 | 15 | 1,034 (0,451-2,219) | | 22 / 68 | 32 | 0,468 * (0,257-0,833) | |
| | nein | 26 / 182 | 14 | 0,9667 (0,451-2,217) | | 91 / 180 | 50 | 2,138 * (1,202-3,894) | |
| | gesamt | 36 / 250 | | | | 113 / 248 | | | |

* signifikante Ergebnisse auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $\alpha=0,05$ (5 %-Niveau)

° keine Konfidenzintervalle berechenbar (vgl. Abschnitt 3.5.4)

Kinder im Alter von 0 bis 10 Jahren und Erwachsene im Alter von 21 bis 30 Jahren schienen seltener Antikörper gegen *Entamoeba dispar* zu bilden (OR=0,739, KI=0,433-1,251 bzw. OR=0,768, KI=0,364-1,577). Die Altersgruppe der 10- bis 21- Jährigen hingegen wies signifikant höhere Antikörpertiter gegen *Entamoeba dispar* auf (OR=2,245, KI=1,289-3,958). Bei dem männlichen Anteil der Untersuchten waren Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar* seltener nachweisbar (OR=0,797, KI=0,380-1,626 bzw. OR=0,681, KI=0,408-1,131). Personen mit akuten gastrointestinalen Symptomen waren signifikant seltener Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern (OR=0,468, KI=0,257-0,833).

Von der Serumuntersuchung sind noch folgende Ergebnisse zu erwähnen: In den Haushalten mit einem Einkommen von einer Million und mehr Türkische Lira pro Kopf und Monat fanden sich häufiger Personen, die Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern waren (OR=1,774, KI=0,832-3,978) als in Haushalten mit einem Einkommen, das geringer als eine Million Türkische Lira war (OR=0,564, KI=0,251-1,201). In Bezug auf Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern wurde allerdings das Gegenteil beobachtet. Es fanden sich signifikant weniger Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern in Haushalten mit einem Einkommen von einer Million und mehr Türkische Lira (OR=0,551, KI=0,325-0,928) als in Haushalten mit einem Einkommen unter eine Million Türkische Lira (OR=1,814, KI=1,077-3,078).

Im jeweiligen Vergleich eines der drei Dörfer zu den anderen beiden zeigte sich Folgendes: In Hydreyaz schien die Anzahl der Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern und der Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern erniedrigt bzw. signifikant erniedrigt zu sein (OR=0,551, KI=0,2135-1,191 bzw. OR=0,228, KI=0,127-0,401). In Kozan war die Antikörperbildung gegen *Entamoeba dispar* signifikant erhöht (OR=2,031, KI=1,134-3,683), ebenso in Bagpınar (OR=2,214, KI=1,322-3,739). In Kozan bestand bei der Bevölkerung eine verminderte Antikörperbildung gegen *Entamoeba histolytica* (OR=0,812, KI=0,329-1,811) und in Bagpınar ein erhöhtes Risiko für eine Antikörperbildung gegen *Entamoeba histolytica* (OR=1,963, KI=0,964-4,037).

In Bagpınar hatte kein Haushalt eine eigene Trinkquelle (vgl. Abschnitt 3.1.3). Dort hatten, im Vergleich zu den beiden anderen Dörfern, wo fast alle Haushalte eine eigene Trinkquelle besaßen, alle Mitglieder der Haushalte häufiger positive Antikörpertiter gegen *Entamoeba histolytica* (OR=1,949, KI=0,9589-4,022) bzw. signifikant häufiger positive Antikörpertiter gegen *Entamoeba dispar* (OR=2,004, KI=1,205-3,356).

Personen ohne Schulbildung waren seltener Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern und Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern (OR=0,878, KI=0,430-1,783 bzw. OR=0,796, KI=0,482-1,313) als Personen mit Schulbildung.

Das Händewaschen nach dem Defäzieren führte bei den betroffenen Personen zu einem signifikant häufigerem positiven Antikörpertiter für *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar* (OR=0,190, KI=0,010-0,937, bzw. OR=0,076, KI=0,012-0,264).

3.5.6 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit der untersuchten Bevölkerung in Hydrellyaz, Kozan und Bagpunar (Erstellung eines Risikoprofiles)

In den folgenden Tabellen sind die Daten zur Person, zur ökonomischen und sozialen Lage, zur Trinkwasser- Brauchwassersituation und zum Hygieneverhalten einschließlich der Serumwerte der Probanden für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* jeweils im Verhältnis zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR) wiedergegeben. „Infiziert“ bedeutet in allen nachfolgenden Tabellen eine Infektion mit *Entamoeba histolytica* und / oder die Kontamination mit *Entamoeba dispar*. Für eine korrekte statistische Auswertung war hier der Fisher exakte Vierfeldertest angebracht. Die errechneten Werte sind für die Verteilungen einer Vierfeldertafel ($p < 0,05$) mit dem Symbol * als signifikant markiert.

3.5.6.1 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den personenbezogenen Daten

Tabelle 3.18: Personenbezogene Daten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle für Hydrellyaz, Kozan und Bagpunar (vgl. Abschnitt 3.5.4.1)

| Parameter | | Hydrellyaz | | | Kozan | | | Bagpunar | | |
|--|----------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|
| | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test |
| | | absolut | in % | | absolut | in % | | absolut | in % | |
| Altersgruppe | 0-10 | 0 / 27 | 0 | 0,029 | 6 / 32 | 19 | 0,269 | 6 / 24 | 25 | 0,776 |
| | 11-20 | 6 / 31 | 19 | 0,087 | 1 / 8 | 13 | 1,000 | 10 / 30 | 33 | 0,106 |
| | 21-30 | 2 / 16 | 13 | 1,000 | 0 / 4 | 0 | 1,000 | 3 / 15 | 20 | 1,000 |
| | 31-40 | 1 / 2 | 50 | 0,211 | 1 / 9 | 11 | 1,000 | 1 / 11 | 9 | 0,444 |
| | 41-50 | 1 / 3 | 33 | 0,301 | | | | 0 / 5 | 0 | 0,583 |
| | >50 | 0 / 11 | 0 | 0,604 | 0 / 6 | 0 | 0,583 | 0 / 5 | 0 | 0,583 |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 59 | | | 20 / 90 | | |
| Geschlecht | männlich | 2 / 40 | 5 | 0,175 | 6 / 35 | 17 | 0,449 | 7 / 28 | 25 | 0,785 |
| | weiblich | 8 / 50 | 16 | | 2 / 25 | 8 | | 13 / 62 | 21 | |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 60 | | | 20 / 90 | | |
| akute gastro-intestinale Symptomatik | ja | 3 / 33 | 9 | 0,740 | 0 / 3 | 0 | 1,000 | 4 / 28 | 14 | 0,281 |
| | nein | 7 / 57 | 12 | | 8 / 56 | 14 | | 16 / 62 | 26 | |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 59 | | | 20 / 90 | | |
| andere ¹⁾ Krankheits-symptome | ja | 2 / 11 | 18 | 0,352 | 0 / 5 | 0 | 1,000 | 7 / 24 | 29 | 0,394 |
| | nein | 8 / 79 | 10 | | 8 / 54 | 15 | | 13 / 66 | 20 | |
| | | 10 / 90 | | | 8 / 59 | | | 20 / 90 | | |

¹⁾ vgl. Abschnitt 3.1.1

In Hydrelyaz sind Null von 27 Personen (0 %) der 0- bis 10- Jährigen mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert, was für $p < 0,05$ ein signifikantes Ergebnis bedeutet.

3.5.6.2 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den ökonomischen und sozialen Daten

Tabelle 3.19: Ökonomische und soziale Daten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle für Hydrelyaz, Kozan und Bagpunar (vgl. Abschnitt 3.5.4.2)

| Parameter | | Hydrelyaz | | | Kozan | | | Bagpunar | | |
|--------------|-------------|---|------|----------------------------------|---|------|----------------------------------|---|------|----------------------------------|
| | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vier-felder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vier-felder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vier-felder-test |
| | | absolut | in % | | absolut | in % | | absolut | in % | |
| Berufsgruppe | Bauer | 0 / 6 | 0 | 1,000 | 1 / 8 | 13 | 1,000 | 2 / 12 | 17 | 1,000 |
| | Arbeiter | | | | 1 / 5 | 20 | 0,531 | | | |
| | Angestellte | 0 / 1 | 0 | 1,000 | | | | | | |
| | Hausfrau | 7 / 30 | 23 | 0,014 * | 0 / 6 | 0 | 0,583 | 3 / 25 | 12 | 0,171 |
| | arbeitslos | 2 / 5 | 40 | 0,093 | 0 / 1 | 0 | 1,000 | 0 / 4 | 0 | 0,572 |
| | sonstige | | | | 0 / 1 | 0 | 1,000 | 3 / 10 | 30 | 0,687 |
| | Schüler | 1 / 48 | 2 | 0,005 * | 2 / 38 | 5 | 0,699 | 16 / 39 | 41 | 0,125 |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 4 / 59 | | | 24 / 90 | | |

Fortsetzung Tabelle 3.19:

| Parameter | | Hydrelyaz | | | Kozan | | | Bagpunar | | |
|------------------|---------------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|
| | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test |
| | | absolut | in % | | absolut | in % | | absolut | in % | |
| Einkommen / Kopf | <1 MTL | | | | 2 / 23 | 9 | 0,692 | 15 / 77 | 20 | 0,181 |
| | Y1 MTL | 10 / 74 | 14 | | 5 / 35 | 14 | | 5 / 14 | 36 | |
| | gesamt | 10 / 74 | | | 7 / 58 | | | 20 / 91 | | |
| Bildung | keine Schulbildung | 4 / 37 | 11 | 1,000 | 5 / 42 | 12 | 0,678 | 9 / 42 | 21 | 1,000 |
| | Hauptschule | 5 / 47 | 11 | 1,000 | 3 / 15 | 20 | 0,407 | 10 / 40 | 25 | 0,617 |
| | weiterführende Schule /G. | 1 / 6 | 17 | 0,517 | 0 / 1 | 0 | 1,000 | 1 / 7 | 14 | 1,000 |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 58 | | | 20 / 89 | | |

- * signifikante Ergebnisse auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$
- < als 1 MTL Einkommen kleiner als 1 Million Türkische Lira pro Kopf eines Haushaltes im Monat
- Yals 1 MTL Einkommen von einer Million und mehr Türkische Lira pro Kopf und Monat

Das Ergebnis mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu sein ist signifikant für Hausfrauen ($p < 0,05$) und Schüler ($p < 0,05$) in Hydrelyaz.

3.5.6.3 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus Trinkwasser-, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten

Tabelle 3.20: Daten aus Trinkwasser-, Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle für Hydurelyaz, Kozaan und Bagpunar (vgl. Abschnitt 3.5.4.3)

| Parameter | | Hydurelyaz | | | Kozaan | | | Bagpunar | | |
|----------------------------------|-------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|
| | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test |
| | | absolut | in % | | absolut | in % | | absolut | in % | |
| eigene Trinkquelle | ja | 10 / 83 | 12 | 1,000 | 8 / 62 | 13 | | | | |
| | nein | 0 / 7 | 0 | | | | | 20 / 90 | 22 | |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 62 | | | 20 / 90 | | |
| Brauchwasser | Tigris | 10 / 90 | 11 | | 8 / 62 | 13 | | | | |
| | gemeinsame Quelle | | | | | | | 20 / 97 | 21 | |
| | gesamt | 10 / 90 | | | 8 / 62 | | | 20 / 97 | | |
| Händewaschen nach dem Defäzieren | ja | 10 / 71 | 14 | 0,203 | 8 / 48 | 17 | 0,330 | 20 / 90 | 22 | |
| | nein | 0 / 18 | 0 | | 0 / 11 | 0 | | | | |
| | gesamt | 10 / 89 | | | 8 / 59 | | | 20 / 90 | | |

Bezogen auf Trinkwasser- Brauchwasserversorgung und Hygieneverhalten zeigten sich keine signifikanten Werte.

3.5.6.4 Vergleich der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Daten aus serologischen Ergebnissen

Tabelle 3.21: Serologische Daten im Vergleich zu den Ergebnissen der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der r-PCR und der k-PCR mit Angabe der Chancen-Verhältnisse (Odds-Ratio) und deren Konfidenzintervalle für Hydurelyaz, Kozan und Bagpunar (vgl. Abschnitt 3.5.4.4)

| Parameter | | Hydurelyaz | | | Kozan | | | Bagpunar | | |
|---|---------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|---|------|---------------------------------|
| | | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test | Infizierte pro Gesamtzahl der Personen der Gruppe | | Fishers exakter Vierfelder-test |
| | | absolut | in % | | absolut | in % | | absolut | in % | |
| Träger von Anti- <i>Entamoeba histolytica</i> -Antikörpern insgesamt ** | positiv | 2 / 9 | 22 | 0,270 | 5 / 8 | 63 | 0,0005 | 10 / 19 | 53 | 0,001 |
| | negativ | 8 / 79 | 10 | | 3 / 52 | 6 | | 10 / 71 | 14 | |
| | gesamt | 10 / 88 | | | 8 / 60 | | | 20 / 90 | | |
| Träger von Anti- <i>Entamoeba dispar</i> -Antikörpern insgesamt *** | positiv | 5 / 22 | 23 | 0,112 | 6 / 34 | 18 | 0,453 | 17 / 53 | 32 | 0,009 * |
| | negativ | 5 / 67 | 8 | | 2 / 23 | 19 | | 3 / 37 | 8 | |
| | gesamt | 10 / 89 | | | 8 / 57 | | | 20 / 90 | | |

* signifikante Ergebnisse auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$
 ** davon einige Träger mit Antikörpern gegen *Entamoeba dispar* (vgl. Tabelle 3.8)
 *** davon einige Träger mit Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica* (vgl. Tabelle 3.8)

Eine signifikant erhöhte Gefahr, mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu werden, war in Kozan ($p < 0,05$) und Bagpunar ($p < 0,05$) bei Personen zu erkennen, die Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* im Serum aufwiesen. Ebenso waren Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern in Bagpunar im Vergleich zu serologisch negativen Personen häufiger mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert ($p < 0,05$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in Stuhlproben einer unselektionierten Landbevölkerung Anatoliens (Süd-Ost-Türkei) bestimmt, und zwar unter Anwendung der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR). Für die beiden erstgenannten Differenzierungsmethoden war eine Kultivierung der Stuhlproben nach ROBINSON erforderlich. Gleichzeitig wurde im Serum der untersuchten Personen eine Bestimmung der Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* durchgeführt. Des Weiteren wurden Daten zur Person, zur ökonomischen und sozialen Lage, zur Trinkwasser- und Brauchwassersituation und zum Hygieneverhalten der Probanden erhoben. Diese Daten wurden mit den Ergebnissen der oben genannten Methoden verglichen.

Da die Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion durch die gewählten Arbeitsmethoden (MIF-C-Methode und Kulturanzüchtung der Proben nach ROBINSON) entscheidend beeinflusst werden und somit durch entsprechende Faktoren (siehe Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 4.1.2) korrigiert werden müssen, sei in der vorliegenden Arbeit die Diskussion bzw. Errechnung dieser Korrekturfaktoren der Diskussion der Ergebnisse vorweggenommen.

4.2 Korrekturfaktoren für die Ergebnisse

4.1.1 MIF-C-Methode und erforderliche Korrektur der Ergebnisse

Anhand der MIF-C-Methode (SAPERO & LAWLESS, 1953) werden Amöbenzysten in Stuhlproben angereichert und lichtmikroskopisch analysiert. Für das Erkennen von *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Zysten / -Trophozoiten mit Hilfe von Anreicherungsverfahren (z. B. der MIF-C-Methode) bei Untersuchung von einer Stuhlprobe pro Person werden deutlich unterschiedliche Daten in der Literatur angegeben. Im Folgenden werden Ergebnisse epidemiologischer Studien dargestellt, die Anreicherungsverfahren mit anschließender

Lichtmikroskopie-Untersuchung im Vergleich zu Differenzierungsmethoden (z. B. Hexokinase-Isoenzymauftrennung, r-PCR-Methode, k-PCR-Methode, Stuhl-Antigen-Kit) anwendeten. Dabei überwiegen deutlich die Studien, die nur eine kleine Anzahl an *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Proben mit der Lichtmikroskopie erkennen konnten. Eine Studie beschreibt ein sehr gutes Ergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung im Vergleich mit einer kolorimetrischen PCR-Methode, die einen Nachweis aus Stuhlproben erbrachte. Bei 24 von 201 untersuchten Personen fanden sich mit der Mikroskopie *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der PCR-Methode bestätigt (ACUÑA-SOTO et al., 1993). In einer Studie wurden von 50 Personen innerhalb von 35 Tagen 21 Stuhlproben pro Person untersucht, die zuvor nachweislich *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in der Stuhlmikroskopie aufwiesen. Bei der mikroskopischen Untersuchung von lediglich einer Stuhlprobe pro Person zeigte sich, dass nur bei 44 % der 50 Personen *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* entdeckt werden konnte (MATHUR & KAUR, 1973). In einer anderen Studie konnten mittels mikroskopischer Untersuchung nur etwa 25 % der *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-positiven Proben entdeckt werden (GATHIRAM & JACKSON, 1985). In jener Studie wurde von jeder der 1328 untersuchten Personen eine ROBINSON-Kultur angelegt und eine Isoenzymanalyse durchgeführt. Eine weitere Studie wies in 114 *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-positiven Proben ebenso nur 49, dies entspricht 43 %, durch die Stuhlmikroskopie nach. Vergleichsweise wurde dabei die Isoenzymanalyse eingesetzt (PETRI, 1993). Bei einer weiteren aktuellen epidemiologischen Studie mit untersuchten 680 Stuhlproben vermochte die Mikroskopie 33 *Entamoeba histolytica*- und *Entamoeba dispar*-positive Proben zu erkennen, das heißt, dass lediglich 28 % der positiven Proben erkannt wurden (HAQUE et al., 1999). In dieser Arbeit wurden zum Vergleich der Stuhlmikroskopie zwei Stuhl-Antigen-Tests (TechLab, Blacksburg, VA, USA) verwendet. Eine andere epidemiologische Studie mit 443 untersuchten Stuhlproben, in der allerdings ein anderer Stuhl-Antigen-Kit (BIOSITE Diagnostics, San Diego, Calif.) eingesetzt wurde, zeigte, dass die Mikroskopie 42 also nur 43 % der kontaminierten Proben zu erkennen vermochte (GARCIA et al., 2000). In einer Studie mit 2000 Kindern aus Bangladesh, mit und ohne Diarrhö, wurde mit der Stuhlmikroskopie in lediglich 51 Stuhlproben (27 %) *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* entdeckt, während bei weiteren 140 Proben kein *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Nachweis gelang (HAQUE et al., 1997a). Der Stuhl-Antigen-Kit von TechLab, Blacksburg, VA, USA, testete alle diese Proben jedoch als positiv. Die Stuhlmikroskopie wurde in dieser Studie daher als inadäquate Methode zur Erkennung der Amöbenkolitis bezeichnet. Auch von anderen Autoren wird geäußert, dass die Sensitivität der mikroskopischen

Untersuchung von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* unbefriedigend ist, und dies insbesondere bei niedriger Parasitendichte (BURCHARD, 1999; PETRI et al., 2001).

Nun gibt es seit Einführung von kolorimetrischer Polymerase-Kettenreaktion und Stuhl-Antigen-Tests Differenzierungsmethoden, die aus nativen Stuhlproben den Nachweis von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* erbringen können, ohne Anreicherungsverfahren (z. B. die MIF-C-Methode) in Anspruch nehmen zu müssen (vgl. Abschnitt 1.4.3 und Abschnitt 1.4.4). Diese Methoden wurden in verschiedenen epidemiologischen Studien mit lichtmikroskopischen Nachweismethoden (z. B. MIF-C-Methode) und eventuell weiteren Methoden (z. B. Isoenzymanalyse) verglichen. Dabei zeigten insbesondere neuere Studien (HAQUE et al., 1997a; HAQUE et al., 1999; GARCIA et al., 2000; siehe oben), dass durchschnittlich 69 % der an *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* kontaminierten Proben bei der Durchführung lichtmikroskopischer Untersuchungen nicht entdeckt werden konnten. Dieser Prozentsatz wurde bei alleiniger Betrachtung der MIF-C-Methode als der plausibelste der vorliegenden Arbeit zugrundegelegt. Daher müssen die Ergebnisse der MIF-C-Methode entsprechend korrigiert werden.

In der vorliegenden Studie erbrachte die MIF-C-Methode folgende Ergebnisse: 15 Stuhlproben (5,7 %), in denen eindeutig Zysten und Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nachgewiesen wurden; 76 Stuhlproben (28,7 %), in denen pro Präparat mehr als 5 Zysten der Spezies *Entamoeba coli* und / oder *Entamoeba hartmanni* und / oder *Jodamoeba bütschlii* vorkamen; 26 Proben (9,8 %), in denen pro Präparat fünf oder weniger Zysten gefunden wurden; 148 Proben (55,9 %), in welchen keine *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii* und keine *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nachgewiesen wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Wenn nun die 15 Proben, in denen mit Hilfe der MIF-C-Methode *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nachgewiesen wurde, mit dem obigen Prozentwert korrigiert werden, so ergibt sich eine Anzahl von 48 Proben.

Es wird berichtet, dass Personen mit asymptomatischer oder nicht dysenterischer Amöbenkolitis intermittierend nur kleine Mengen an Zysten ausscheiden, während Personen mit akuter Amöbenkolitis große Mengen an Zysten ausscheiden und daher leichter erkannt werden können (WALSH, 1986). Dies könnte der Grund sein, weshalb in 76 Stuhlproben (28,7 %), aus denen nach Kulturanzüchtung 26 Proben positiv auf *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* getestet wurden, keine *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in der MIF-C-Methode erkannt werden konnten (vgl. Tabelle 6.1). Eine zu geringe Zystenanzahl an *Entamoeba*

histolytica / *Entamoeba dispar*, noch dazu mit *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii* in den Präparaten überlagert, war für die Differenzierung in der vorliegenden Studie nicht ausreichend groß genug. Für eine Kultivierung der Stuhlproben nach ROBINSON hingegen war diese geringe Anzahl von Zysten anscheinend ausreichend, so dass diese gut anwachsen konnten (vgl. Abschnitt 4.1.2). Allerdings wurden weitere 26 Stuhlproben (9,8 %), die von *Entamoeba coli* und / oder von *Entamoeba hartmanni* und / oder von *Jodamoeba bütschlii* fünf oder weniger Zysten pro Präparat zeigten, nicht angezchtet. Diese Proben konnten aufgrund der geringen Menge der Zysten differenziert werden, obgleich natürlich nicht gesagt werden kann, dass nicht weitere Zysten von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in diesen Proben oder sogar in den 148 Proben mit negativen Ergebnissen der MIF-C-Methode zu finden gewesen wären (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Dass in dieser vorliegenden Studie mit der MIF-C-Methode in nur 15 Stuhlproben mikroskopisch *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nachgewiesen wurde, jedoch 35 Proben mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion als positiv differenziert werden konnten (vgl. Tabelle 6.1), könnte aber auch von einer geringen Erfahrung im Mikroskopieren herrühren. Auch andere Autoren weisen darauf hin, dass zum mikroskopischen Nachweis von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* viel Erfahrung notwendig ist (WALSH, 1986; KROGSTAD, 1988; FLEISCHER & TANNICH, 2000). Zum einen können Amöbenzysten generell mit Leukozyten, Pilzen, pflanzlichen Strukturen und Kunstprodukten verwechselt werden, so dass eine größere Probenzahl entsteht (PIEKARSKI, 1987; BRUCKNER, 1992), zum anderen können aber selbst erfahrene Mikroskopierer *Entamoeba hartmanni*- und reife oder unreife *Entamoeba coli*- mit *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Zysten verwechseln, woraus dann eine größere oder kleinere Probenzahl resultieren kann (SPENCER & MONROE, 1968).

Da sich die MIF-C-Methode zur Unterscheidung und Erkennung von Protozoenzysten als nicht sicher erwies, wurden in der vorliegenden Studie die Ergebnisse dieser Methode für den Zweck der Anzchtung differenzierter beurteilt (siehe Abschnitt 4.1.2).

4.1.2 Anzüchtungsrate der Kulturen nach ROBINSON und erforderliche Korrektur der Ergebnisse

Um alle Ergebnisse zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in den erhaltenen Stuhlproben miteinander vergleichen zu können, wäre es am besten gewesen, alle 265 Stuhlproben im ROBINSON-Medium zu kultivieren, weil eben die MIF-C-Methode, wie in Abschnitt 4.1.1 besprochen, *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nicht sicher nachweisen kann. Dies hätte jedoch einen zu hohen Arbeitsaufwand bedeutet, der zeitlich und materiell in dem vorgegebenen Rahmen nicht realisierbar war. Allerdings nur die 15 Stuhlproben (5,7 %) im ROBINSON-Medium anzuzüchten, die mittels der MIF-C-Methode eindeutig Zysten und Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* aufwiesen, hätte bedeuten können, dass eine gewisse Anzahl von Stuhlproben, die doch mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* kontaminiert waren, nicht identifiziert worden wäre. Anlass für diese Überlegung waren die in verschiedenen Studien angegebenen, deutlich höheren Prävalenzwerte für *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* (vgl. Tabelle 1.1), wie auch eine aus mikroskopischen Untersuchungen hervorgegangene Prävalenz von 32,9 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* im Umkreis von der Stadt Diyarbakir (JETTER, 1998). Deshalb lag der Gedanke nahe, auch die Stuhlproben im ROBINSON-Medium zu kultivieren, in denen durch die MIF-C-Methode *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii* nachgewiesen wurden. Da dies jedoch die Anzucht von weiteren 102 Stuhlproben bedeutet hätte, also einer immerhin noch sehr hohen Anzahl von Proben, wurde letztendlich beschlossen, neben den 15 genannten Proben weitere 76 Proben (28,7 %) im ROBINSON-Medium anzuzüchten, und zwar alle Proben, deren Präparate mehr als 5 Zysten aufwiesen, unabhängig davon, ob Zysten von *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* oder *Jodamoeba bütschlii*. Es wurden somit insgesamt 91 Stuhlproben angezüchtet (vgl. Abschnitt 2.2.3 und Abschnitt 3.2.1). Mit diesem Vorgehen wurde einerseits versucht, die eventuell aus der MIF-C-Methode hervorgegangenen Verwechslungen von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mit *Entamoeba coli* / *Entamoeba hartmanni* zu beheben; andererseits sollten die mit *Entamoeba coli* kontaminierten Proben (vgl. Tabelle 6.1), die möglicherweise nicht erkannte *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* enthielten, für eine weitere Untersuchung nicht verloren gehen.

Das erfolgreiche Kultivieren von *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Trophozoiten im ROBINSON-Medium — und damit das Differenzieren von *Entamoeba histolytica* und

Entamoeba dispar — ist gemäß der dazu vorliegenden Literaturangaben jedoch auch nicht mit Sicherheit möglich. Während ROBINSON von einer erfolgreichen Anzucht von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* aus 100 % der gegebenen Stuhlproben berichtet (ROBINSON, 1968), nennen andere Autoren gelungene Anzüchtungen in lediglich zwei Dritteln der Fälle (EDELMANN & SPINGARN, 1977), in 62 % der Fälle (GATTI et al., 1995b), in 58 % der Fälle (WEINKE et al., 1988), in 57 % der Fälle (WALDERICH et al., 1997), in 40 bis 60 % der Fälle (RAVDIN, 1994) oder in 50 % der Fälle (BRUCKNER, 1992). Ein anderer Autor berichtet, dass die Anzuchtrate auch von der Menge der Zysten in der untersuchten Stuhlprobe abhängt und dass durch mehrfaches Anlegen von Stuhlkulturen von mehreren Proben einer Person die Anzuchtrate steigt (BRAY & HARRIS, 1977).

In der vorliegenden Studie wurde von den 91 Personen jeweils eine Stuhlprobe gesammelt, aus der mindestens zwei ROBINSON-Kulturen angelegt wurden (vgl. Abschnitt 2.2.6.2). Bei der Kultivierung der Stuhlproben wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert der Kulturen nicht unter 6 sank, das Medium häufig gewechselt, nicht zuviel Stärke zugeführt und das ROBINSON-Medium immer frisch angesetzt wurde.

In der vorliegenden Studie wurde in den genannten 15 Stuhlproben eindeutig mit der MIF-C-Methode *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nachgewiesen, und im ROBINSON-Medium angezüchtet. Davon wurden 9 Proben differenziert, was einer Anzüchtungsrate von 60 % entspricht. Von den weiteren 76 angezüchteten Proben, in welchen sich von *Entamoeba coli* und / oder von *Entamoeba hartmanni* und / oder von *Jodamoeba bütschlii* zusammen mehr als 5 Zysten pro Präparat zeigten, wurden 26 Proben mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion isoliert (zwei mit *Entamoeba histolytica*, 23 mit *Entamoeba dispar* und eine, die beide Spezies aufwies, vgl. Tabelle 6.1). Für diese 76 Proben lässt sich eine Anzüchtungsrate von 34 % errechnen. Diese unterschiedlichen Anzüchtungsraten lassen sich dadurch erklären, dass im letzten Fall nur Kulturen angelegt wurden, bei denen unter Anwendung der MIF-C-Methode negative Ergebnisse erzielt wurden, was sich in der deutlich niedrigeren Anzüchtungsrate von 34 % widerspiegelt. Wären durch die MIF-C-Methode diese 26 differenzierten Proben gleich erkannt worden und würde man auch in diesem Fall eine Anzüchtungsrate von 60 % annehmen, so würden sich für die MIF-C-Methode 43 zusätzliche Proben ergeben. Diese 43 zusammen mit den oben genannten 15 *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Proben ergeben 58 Proben. Diese hypothetische Gesamtzahl von 58 der mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*

kontaminierten Stuhlproben hätte mit Hilfe des MIF-C-Verfahrens erkannt werden müssen, wenn diese Methode zuverlässig wäre.

Allerdings ist auch dieser Wert von 58 Proben mit Vorbehalt zu betrachten, da es wahrscheinlich ist, dass auch unter den zwei nicht kultivierten weiteren Probengruppen – eben die Gruppe der Proben mit weniger als 5 Zysten pro Präparat und die Gruppe mit 0 Zysten pro Präparat, vgl. Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 3.2.1 – einige *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Ergebnisse durch die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion zu erwarten gewesen wären. In diesem Fall müsste von mehr als 58 Proben mit positivem Ergebnis mittels der MIF-C-Methode ausgegangen werden. Geht man jedoch von der vorliegenden Zahl von 58 *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* positiven Proben aus, so errechnen sich 15 erkannte von 58 Proben, also 26 %. Daraus lässt sich folgern, dass 74 % der *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-positiven Proben nicht erkannt wurden. Dieser Wert ist durchaus vergleichbar mit dem in der Literatur bzw. in Abschnitt 4.1.1 zitierten Wert von 69 % nicht erkannter Proben. Für die weitere Diskussion der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion werden in Abschnitt 4.5 und Abschnitt 4.6 daher zusätzlich auf der Grundlage von 58 *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-positiven Proben korrigierte Ergebnisse angegeben.

Neben den Schwierigkeiten der Anzucht muss außerdem der Mitbewuchs von *Entamoeba coli* u. a. bedacht werden, da dieser ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse hat (vgl. Abschnitt 4.2). ROBINSON berichtet von einem Mitbewuchs von 58 % *Entamoeba coli* bei einem Anwuchs von 100 % *Entamoeba histolytica* in seinen Kulturen (ROBINSON, 1968). SARGEAUNT und Mitarbeiter berichten von sieben Proben, in welchen ausschließlich andere Amöben wie *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Dientamoeba fragilis*, und 31 Proben, in denen ausschließlich *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* anwuchsen (SARGEAUNT et al., 1982). In der vorliegenden Studie zeigten sieben Proben ein negatives Ergebnis mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, obwohl sich in diesen Proben ausreichend Trophozoiten vermehren ließen und in einer der sieben Proben *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mittels der MIF-C-Methode nachgewiesen werden konnte (vgl. Tabelle 3.10 und Tabelle 6.1). Es ist wahrscheinlich, dass in diesen sieben Proben andere Amöben-Spezies, wie z. B. *Entamoeba coli* oder *Entamoeba hartmanni*, anwuchsen, kultiviert und aufbereitet wurden (ROBINSON, 1968).

4.2 Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung

Die Hexokinase-Isoenzymauftrennung gilt als bewährte Methode zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* (SARGEAUNT & WILLIAMS, 1978b; BRACHA et al., 1987; PROCTOR et al., 1987; OSISANYA, 1991; ORTNER et al., 1997). In einer Studie wurde bei 98 Personen eine hohe Korrelation der Ergebnisse sowohl eines Stuhl-ELISA-Kits als auch einer PCR-Methode und einer Isoenzymanalyse festgestellt (HAQUE et al., 1998). Einige Autoren kritisierten an der Isoenzymanalyse, dass der Zusammenhang zwischen den Enzymen und ihrer Pathogenität nicht bewiesen sei (MIRELMAN et al., 1986a,b; TANNICH et al., 1989).

In zwei von 42 Proben (dies entspricht 5 % der Proben), die für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung aufbereitet werden konnten (siehe Tabelle 3.6), wurde das für *Entamoeba histolytica* typische Bandenmuster nachgewiesen. Weitere 24 Proben (57 %) zeigten das für *Entamoeba dispar* typische Bandenmuster. Eine Probe (2 %) wies mit zwei Doppelbanden auf eine Doppelinfektion mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* hin. Weitere 15 Proben (36 %) waren negativ (vgl. Abschnitt 3.3.1).

Die zwei Proben mit *Entamoeba histolytica* sowie die 24 Proben mit *Entamoeba dispar* waren komplikationslos zu differenzieren. Die Probe mit Zymodemen, die die charakteristischen Banden von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* zeigten, wurde als mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* kontaminierte interpretiert. Diese Interpretation entspricht der häufiger in der Literatur vorgefundenen Beschreibung von Doppelinfektionen (vgl. Abschnitt 1.5). Von den 15 Proben, die ein negatives Ergebnis der Hexokinase-Isoenzymauftrennung aufwiesen (siehe Abschnitt 3.3.1), gelang mit der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion ein *Entamoeba dispar*-Nachweis in 8 Stuhlproben. Dass in diesen 8 Proben kein *Entamoeba dispar*-Nachweis mittels der Hexokinase-Isoenzymauftrennung gelang, kann mit einer geringen *Entamoeba dispar*-Konzentration im Probenlysat und einer Verunreinigung mit *Blastocystis hominis* und *Entamoeba coli* zusammenhängen. Die übrigen 7 Proben (vgl. Tabelle 3.10 und Abschnitt 4.1.2) zeigten mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion negative Ergebnisse. Eine dieser sieben Proben wies allerdings mit der MIF-C-Methode ein *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Ergebnis auf (vgl. Tabelle 6.1, Probe Nr. 132). Sechs dieser sieben Proben sind als negativ zu werten, weil die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion diese negativen Ergebnisse der Hexokinase-

Isoenzymauftrennung bestätigte. Die Probe Nr. 132 ist trotz widersprüchlicher Ergebnisse als mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* kontaminiert zu betrachten. In den sieben ROBINSON-Kulturen dieser sieben Proben wuchsen für eine weitere Differenzierung ausreichend Amöbentrophozoiten an. Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Amöbentrophozoiten nicht um *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* handelte (vgl. Abschnitt 4.1.2).

Eine Übereinstimmung der Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion bezüglich *Entamoeba histolytica* ist in einer von drei Proben (33 %) gegeben, bezüglich *Entamoeba dispar* in 17 von 32 Proben (53 %) (vgl. Tabelle 3.10). Für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung berechnet sich eine Sensitivität von lediglich 69 % und eine Spezifität von nur 44 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, wenn die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion als Referenzmethode gilt (vgl. Abschnitt 3.5.2). Eine Erklärung für die niedrige Sensitivität von 69 % wäre folgende: Gelegentlich trat eine Überwucherung mit Pilzen und *Blastocystis hominis* auf, insbesondere, wenn die Kulturen nicht entsprechend gut angewachsen waren und *Blastocystis hominis* sich zahlreich in den Kulturen vermehren konnte. Die charakteristischen *Entamoeba histolytica*- oder *Entamoeba dispar*-Banden wären dann schwieriger zu differenzieren gewesen. Eine Erklärung der niedrigen Spezifität der Hexokinase-Isoenzymauftrennung im Vergleich zu der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion ist sehr schwierig; hier kann nur spekuliert werden. Allerdings muss ein Versuch, die niedrigen Sensitivitäten und Spezifitäten zu erklären, problematisch sein, weil keine der Methoden als Referenzmethoden angesehen werden kann.

4.3 Ergebnisse der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion

Die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion zur Differenzierung von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* gilt als sehr sensitiv und spezifisch (CLARK & DIAMOND, 1991b).

Von den 42 in dieser Studie aufbereiteten Proben, die der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (r-PCR) zugeführt wurden, zeigte eine Probe (2 %) das *Entamoeba histolytica*-Bandenmuster, 25 Proben (60 %) wiesen das *Entamoeba dispar*-Bandenmuster und 16 Proben (38 %) ein negatives Ergebnis auf (vgl. Abschnitt 3.3.2).

In der einen Stuhlprobe mit *Entamoeba histolytica* wurde mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung eine Doppelinfection nachgewiesen. Bezüglich der 25 *Entamoeba dispar*-Proben war eine Differenzierung problemlos möglich. Das negative Ergebnis von 16 Stuhlproben mittels der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion (vgl. Abschnitt 3.3.2) wurde mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung für 7 Proben bestätigt (vgl. Tabelle 3.10). Wie in Abschnitt 4.1.2 und Abschnitt 4.2 bereits erwähnt, wuchsen in den ROBINSON-Kulturen dieser Stuhlproben wahrscheinlich andere Amöbentrophoziten an. In den übrigen negativen 9 Stuhlproben wurde mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung zweimal *Entamoeba histolytica* und siebenmal *Entamoeba dispar* nachgewiesen (vgl. Tabelle 6.1). Daraus berechnet sich eine Sensitivität von nur 67 % und eine Spezifität von lediglich 47 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* für die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, wenn die Hexokinase-Isoenzymaufreinigung als Referenzmethode gilt (vgl. Abschnitt 3.5.2).

Das Ergebnis der r-PCR-Methode ist von Faktoren wie Reinheit und Menge der DNA abhängig, aber auch von dem pH-Wert und der Menge der zugeführten Reagenzien, des benötigten Magnesiumchlorids sowie der verwendeten Polymerase. Hierbei ist fraglich, ob die Gallensäuren eine inhibitorische Wirkung auf die Tfl-Polymerase ausgeübt haben könnten, wie dies bei der Taq-Polymerase beschrieben worden ist (DEUTER et al., 1995). Einige aufbereitete Proben waren auffallend braun und enthielten vermutlich viel Gallenfarbstoffe und Gallensäuren. Dies könnte dann zumindest teilweise die niedrige Sensitivität der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion im Vergleich zur Hexokinase-Isoenzymaufreinigung erklären. Die niedrige Sensitivität kann auch mit einer Überwucherung mit Pilzen und *Blastocystis hominis* erklärt werden, insbesondere in den Fällen, in denen die Kulturen nicht entsprechend gut angewachsen waren und *Blastocystis hominis* sich zahlreich in der Kultur vermehrt hatte. Eine Erklärung der niedrigen Spezifität der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion im Vergleich zu der Hexokinase-Isoenzymaufreinigung ist sehr schwierig, hier kann nur spekuliert werden. Allerdings muss ein Versuch, die niedrigen Sensitivitäten und Spezifitäten zu erklären, problematisch sein, wie bereits in Abschnitt 4.2 erwähnt, weil keine der Methoden als Referenzmethode angesehen werden kann.

4.4 Ergebnisse der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion aus Stuhlproben

Die hohe Sensitivität und Spezifität der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion ist von einigen Arbeitsgruppen beschrieben worden (BRITTEN et al., 1997; vgl. Abschnitt 2.2.10).

Es blieb für die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion zur Unterscheidung zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* nur für 47 Fälle ausreichend Probenmaterial übrig. In 7 von den 47 Proben war *Entamoeba dispar* und in keiner Probe *Entamoeba histolytica* nachweisbar. Bezogen auf die 265 Personen der drei Dörfer errechnete sich eine Prävalenz von 0 % für *Entamoeba histolytica* und von 14,9 % für *Entamoeba dispar*. Vergleicht man die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion mit der Hexokinase-Isoenzymauftrennung und der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion, so kann bezüglich eines *Entamoeba dispar*-Ergebnisses nur eine Übereinstimmung von 27 % mit der Hexokinase-Isoenzymauftrennung bzw. von 31 % mit der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.5.2). Unter der Voraussetzung, dass die Hexokinase-Isoenzymauftrennung bzw. die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion die Methoden mit den exaktesten Ergebnissen (Referenzmethoden) sind, errechnet sich eine Sensitivität von 23 % bzw. 28 % und eine Spezifität von 83 % bzw. 100 % für die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion (vgl. Abschnitt 3.5.2).

Diese niedrige Sensitivität von 23 % bzw. 28 % für die k-PCR steht im Widerspruch zu Studien, die exakte Ergebnisse mit der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion erhielten (ROMERO et al., 1992; ACUÑA-SOTO et al., 1993). Die niedrige Sensitivität könnte mit einer Beschädigung der Amöben-DNA durch DNasen erklärt werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das Problem der Kühlung der Stuhlproben gewesen sein. Eine ausreichende Kühlung war weder vor Ort — gelegentliche Stromausfälle — noch während des Transportes nach Deutschland gewährleistet. Die Proben wurden in Gefrierboxen mit Akkus bei -20 °C bei Anfang der Reise gelagert, erwärmten sich aber im Laufe der Zeit wegen der hohen Außentemperaturen.

In der Vorstudie zu der vorliegenden Studie konnte ebenfalls nur eine niedrige Sensitivität von 24 % für die kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion — dort allerdings im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung — errechnet werden; auch dort spielten technische Probleme in

ähnlicher Weise eine Rolle (JETTER, 1998). Mit der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion wurden in jener Studie 211 Stuhlproben untersucht. Es fand sich in keiner Probe *Entamoeba histolytica* und in 28 Proben *Entamoeba dispar*. Dies entspricht einer Prävalenz von 0 % für *Entamoeba histolytica* und von 13,3 % für *Entamoeba dispar*, vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, in der eine Prävalenz von 0 % für *Entamoeba histolytica* und von 14,9 % für *Entamoeba dispar* errechnet wurde.

4.5 Korrigierte Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion konnten 70 Stuhlproben differenziert werden, davon drei *Entamoeba histolytica*, 35 *Entamoeba dispar*, eine Doppelinfection und 32 negative (siehe Abschnitt 3.3.4). Aus den 265 untersuchten Stuhlproben der vorliegenden Studie errechnet sich somit für die Bevölkerung der untersuchten Region eine Prävalenz von 1,1 % für *Entamoeba histolytica* und von 13,6 % für *Entamoeba dispar*.

Nun müssen die Werte der drei Differenzierungsmethoden korrigiert werden, da aufgrund der MIF-C-Methode und der Kultivierung nach ROBINSON Proben mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nicht erkannt bzw. nicht aufbereitet werden konnten (vgl. Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 4.1.2). Es werden auf der Grundlage von 58 Stuhlproben mit positivem *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Ergebnis (vgl. Abschnitt 4.1.2) die Prävalenzen von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* erneut errechnet. Es ergeben sich nun korrigierte Prävalenzen von 1,9 % für *Entamoeba histolytica* und von 21,9 % für *Entamoeba dispar* für die untersuchte Bevölkerung.

4.6 Vergleich der korrigierten Ergebnisse der Hexokinase-Isoenzym-auftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion mit den Ergebnissen weltweit und in der Türkei

Die in Abschnitt 4.5 korrigierten Prävalenzen der vorliegenden Studie von 1,9 % für *Entamoeba histolytica* und von 21,9 % für *Entamoeba dispar* können mit den Prävalenzen anderer Studien verglichen werden. In Abschnitt 1.5 sind epidemiologische Studien aufgeführt, die die Prävalenzen von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* untersuchten, allerdings mit Hilfe unterschiedlicher Methoden (vgl. Tabelle 1.1). Aus diesen Studien errechnet sich eine durchschnittliche Prävalenz weltweit von 3,5 % für *Entamoeba histolytica*, die mit der korrigierten Prävalenz der vorliegenden Studie von 1,9 % in etwa übereinstimmt. Die durchschnittliche Prävalenz weltweit von 8,7 % für *Entamoeba dispar* ist aber mehr als zweifach niedriger als die Prävalenz der vorliegenden Studie von 21,9 % für *Entamoeba dispar*.

Die Prävalenz von 32,9 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in der weiteren Umgebung Diyarbakirs (JETTER, 1998), die aufgrund der Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung erhoben wurde, ist aber immer noch höher als die korrigierten Prävalenzen in der vorliegenden Studie (siehe oben). Ein Vergleich der Prävalenzen der vorliegenden Studie mit weiteren Studien, die vor allem in der dortigen Region der Türkei durchgeführt wurden, sei nur kurz dargestellt, weil die Ergebnisse dieser Studien aufgrund der Untersuchung von ausschließlich selektionierten Bevölkerungsanteilen schwer vergleichbar sind. Eine Studie errechnete für die Stadt Gaziantep (Süd-Türkei) eine mikroskopische Prävalenz von *Entamoeba histolytica* - / *Entamoeba dispar*-Trophozoiten von 13,1 % bzw. 11,6 % bei 802 Erwachsenen bzw. 690 Kindern mit gastrointestinalen Symptomen (BALCI et al., 1993). In dieser Studie wurde nicht nach Darmprotozoenzysten gesucht. Eine andere Studie gab eine mikroskopische Prävalenz von 10 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bei Kindern und Schülern in Diyarbakir im Alter von 0 bis 14 Jahren an (KURTPINAR et al., 1980, referiert nach COŞKUN, 1991). Ebenso gab eine andere Studie, die in der Umgebung von Diyarbakir durchgeführt worden war, eine mit Hilfe einer mikroskopischen Untersuchung errechnete Prävalenz von 7,5 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* an (KURTPINAR & METE, 1973, referiert nach BALCI et al., 1993). Außerdem sei noch erwähnt, dass ein Autor für Südostanatolien eine Prävalenz zwischen 2 und 10 % für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* angab (GOLAK, 1979, referiert nach BALCI et al., 1993). Zusammenfassend lässt sich

sagen, dass diese vier letztgenannten Studien deutlich geringere Prävalenzen für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* aufwiesen als die korrigierten Prävalenzen in der vorliegenden Studie.

4.7 Serologische Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wiesen 36 Personen (14,3 %) Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und 114 Personen (45,8 %) Antikörper gegen *Entamoeba dispar* auf. Eine Anzahl von 29 Personen (11,6 %) hatte Antikörper sowohl gegen *Entamoeba histolytica* als auch gegen *Entamoeba dispar*, sieben Personen (2,8 %) wiesen Antikörper ausschließlich gegen *Entamoeba histolytica* und 86 Personen (34,7 %) ausschließlich gegen *Entamoeba dispar* auf. Außerdem zeigten 128 Personen (51 %) weder Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* noch gegen *Entamoeba dispar* (vgl. Abschnitt 3.4).

Da Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* mehr als 10 Jahre lang im Blut nachweisbar sein können (KNOBLOCH & MANNWEILER, 1983; REED, 1992), sind die serologischen Prävalenzen von *Entamoeba histolytica* und dementsprechend auch von *Entamoeba dispar* in der vorliegenden Studie erwartungsgemäß höher als die mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesenen Prävalenzen von 1,1 % für *Entamoeba histolytica* (bzw. korrigiert 1,9 %) und von 13,6 % für *Entamoeba dispar* (bzw. korrigiert 21,9 %; vgl. Abschnitt 4.5).

Die serologische Prävalenz von *Entamoeba histolytica* betrug in der vorliegenden Arbeit 14,3 %. Dieses Ergebnis stimmt in etwa überein mit dem errechneten Durchschnittswert von ca. 9 % weltweit aufgrund der in Tabelle 1.3 aufgeführten Studien, ist aber höher als das der bislang einzigen türkischen Studie. Bei letzterer wurde eine Seroprävalenz von 1,8 % (von 225 Personen ohne gastrointestinale Beschwerden) bzw. von 6,4 % (von 157 stationären Patienten, bei denen gastrointestinale Beschwerden auftraten und Trophozoiten im Stuhl sich zeigten) berechnet (BALCI et al., 1993). In dieser türkischen Studie kam ein Hämagglutinationstest mit Roh-Antigen aus einem HK-9-Stamm-Isolat zur Anwendung. In der Vorstudie zur vorliegenden südostanatolischen Studie war in derselben Region im weiteren Umkreis der Stadt Diyarbakir eine Seroprävalenz von 33,7 % für *Entamoeba histolytica* gefunden worden (JETTER, 1998).

Aus beiden Studien geht hervor, dass die Seroprävalenzen von *Entamoeba histolytica* in dieser ländlichen Region deutlich höher sind als in der von BALCI untersuchten städtischen Region der Türkei (BALCI et al., 1993), auch wenn man die Unterschiedlichkeit der Tests berücksichtigen muss (KNOBLOCH & MANNWEILER, 1983).

Die Seroprävalenz von 45,8 % für *Entamoeba dispar* in der vorliegenden Studie weist auf eine hohe Durchseuchung mit *Entamoeba dispar* in dieser Region hin. Sie liegt um einiges höher als die in der Vorstudie ermittelte Seroprävalenz von 26,5 % (JETTER, 1998).

Für immunologische und epidemiologische Studien wurde üblicherweise Homogenisat von Trophozoiten als Antigengemisch verwendet (vgl. Tabelle 1.3). In der vorliegenden Studie wurde Roh-Antigen SAW 1734 zur Bestimmung von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern und HM-1: IMSS-Roh-Antigen zur Bestimmung von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern eingesetzt. Dabei zeigten Untersuchungen mit Western-Blots, dass zahlreiche Moleküle der Trophozoiten antigen wirksam sind, sowohl im Verlauf natürlicher Infektionen als auch experimentell. Der Versuch, spezifische Antikörper gegen isolierte Moleküle im Immunisierungsverfahren zu erzeugen und Differenzierungen zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* vorzunehmen, wurde daher von einer Reihe von Forschungsgruppen unternommen (HORSTMANN, 1994).

JACKSON und Mitarbeiter fanden in einer südafrikanischen Querschnittsstudie in Durban Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* bei 17 von 17 Personen (100 %) mit *Entamoeba histolytica*-Zymodemmmuster, aber nur bei sieben von 33 Personen (21 %) mit *Entamoeba dispar*-Zymodemmmuster (JACKSON et al., 1985). Aus diesem Befund wurde abgeleitet, dass bei „*Entamoeba dispar*-Infektionen“ keine Antikörper gebildet werden (JACKSON et al., 1985). Zur gleichen Zeit hatte OSISANYA keinen signifikanten Unterschied der Antikörpertiter von *Entamoeba histolytica* bei Personen festgestellt, in deren Stuhl *Entamoeba histolytica* oder *Entamoeba dispar* nachweisbar war (OSISANYA, 1985). Offen blieb in dieser Studie, ob die Untersuchten aus einem endemischen Gebiet stammten. Wenn dies der Fall wäre, wäre die Aussagekraft der Ergebnisse stark gemindert (KNOBLOCH et al., 1982).

Im Folgenden wurde versucht, spezifischere Membranbestandteile von *Entamoeba histolytica* nachzuweisen. So zeigte eine Studie, dass durch Verwendung von rekombinantem *Entamoeba histolytica*-Oberflächenmaterial, z. B. des 29-kDA-Proteins, die Spezifität und Sensitivität unter epidemiologischen Verhältnissen gesteigert werden konnte (FLORES et al., 1993). Besonders

unter Einsatz des rekombinanten P1-EIA-Proteins, der M-LA-Membranfraktion oder der löslichen SA-EIA-Extraktion steigerte sich die Sensitivität und Spezifität der Tests bedeutsam (LOTTER et al., 1992). Unter epidemiologischen Bedingungen zeigte sich mit Hilfe eines ELISAs und eines Latextests unter Anwendung des rekombinanten P1-EIA-Proteins bzw. der M-LA-Membranfraktion bei Personen mit invasiver Amöbiasis und anderen Erkrankungen eine Sensitivität von 86,8 % bzw. 96,1 % und eine Spezifität von 96,7 % bzw. 92,3 % (LOTTER et al., 1993; LOTTER et al., 1995). Dabei zeigten die untersuchten Personen wenige Monate nach erneuter Testung keine spezifischen P1-EIA-Antikörper mehr im Blut. Aus den Sensitivitäten und Spezifitäten wurde abgeleitet, dass eine Kreuzreaktivität zwischen *Entamoeba histolytica* und anderen Protozoen bestünde (LOTTER et al., 1995). In der vorliegenden Studie zeigten 29 Personen (11,6 %) Antikörper sowohl gegen *Entamoeba histolytica* als auch gegen *Entamoeba dispar*. Diese hohe Anzahl von Trägern mit Antikörpern gegen beide Spezies könnte darauf hinweisen, dass es eine Kreuzreaktion zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in der Antikörperbildung gibt.

Von anderer Seite gelang es, in Humansenen Anti-(Gal/GalNAc)-Lectin-Antikörper nachzuweisen, die gegen die 170-kDA-Adhärenzrezeptoruntereinheit gerichtet sind und damit die Resistenz von Entamoeben gegen menschliches Komplement aufheben. Dieser Adhärenzrezeptor besteht aus einer 170-kDa- und einer 35/31-kDa-Untereinheit, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die Polypeptide werden getrennt transkribiert und sind beide in der Amöbenmembran verankert (TANNICH et al., 1992). Trotz guter Sensitivität waren auch hier 25 % der Seren von Personen, die im Stuhl *Entamoeba dispar* aufwiesen, positiv auf Anti-Lectin-Antikörper getestet (RAVDIN et al., 1990; RAVDIN, 1994). Eine daraus abgeleitete Vermutung war, dass durch die Exposition mit *Entamoeba dispar* Antikörper gebildet werden (RAVDIN et al., 1990). Wenn auch eine Ähnlichkeit zwischen den Untereinheiten des Lectins von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* bestand, konnte doch gezeigt werden, dass die Region mit den Epitopen für die beiden Anhaftungsstellen für komplementsensibilisierende und anhaftungsverstärkende Antikörper unterscheidbar blieb (DODSON et al., 1997).

In-vitro-Experimente zeigten, dass *Entamoeba dispar* eine zytotoxische Potenz besitzt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass tierexperimentell oberflächliche Erosionen in der Kolonschleimhaut durch *Entamoeba dispar* hervorgerufen werden können (DODSON et al., 1997; ESPINOSA-CANTELLANO et al., 1998; ESPINOSA-CANTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass *Entamoeba dispar* zu einer spezifischen Bildung von Antikörpern im Wirt führt. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass in der

vorliegenden Studie 86 Personen (34,7 %) ausschließlich Antikörper gegen *Entamoeba dispar* zeigten.

In einer Studie wurde eine hochsignifikante Korrelation von *Entamoeba histolytica*-Antikörpern mit *Entamoeba histolytica* festgestellt. Ob an intestinaler oder extraintestinaler Amöbiasis erkrankte oder nur symptomlose Wirte von *Entamoeba histolytica*, alle zeigten *Entamoeba histolytica*-Antikörper (JACKSON et al., 1985). Die vorliegende Studie zeigt, dass die Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern und Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern ein signifikant hohes Risiko hatten, mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu sein (OR=7,712, KI=3,488-17,253 bzw. OR=4,044, KI=1,918-9,178; vgl. Abschnitt 3.5.4.4). Alle drei Personen, bei denen im Stuhl *Entamoeba histolytica* identifiziert worden war, wiesen serologisch Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* auf (vgl. Tabelle 6.1). Allerdings konnte in der vorliegenden Studie keine Korrelation zwischen akuter gastro-intestinaler Symptomatik und Antikörpernachweis von *Entamoeba histolytica* hergestellt werden – mit OR=1,034, KI=0,451-2,219 für eine positive Korrelation und OR=0,9667, KI=0,451-2,217 für eine negative Korrelation (vgl. Abschnitt 3.5.5).

In den meisten in Abschnitt 1.6 dargestellten seroepidemiologischen Studien zeigte sich mit Zunahme des Alters jenseits des Kleinkindes- oder Kindesalters eine Abnahme der Seroprävalenz von *Entamoeba histolytica* (BOS et al., 1980; BONILLA & BONAPART, 1981; HOSSAIN et al., 1983; MANULA et al., 1986; CABALLERO-SALCEDO et al., 1994; BRAGA et al., 1996). Auch in der vorliegenden Studie lag eine Seroprävalenzabnahme für *Entamoeba histolytica* jenseits des 20. Lebensjahres vor, erreichte aber ein zweites Maximum bei den 41- bis 50- Jährigen (vgl. Abschnitt 3.5.5).

4.8 Risikofaktoren für die untersuchten Personen

4.8.1 Personenbezogene Risikofaktoren

In der vorliegenden Studie wurde ein erhöhtes Risiko für 11- bis 20- Jährige gefunden, mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu sein (OR=2,319, KI=1,127-4,732). Nach dem 20. Lebensjahr nahm das Infektionsrisiko stetig ab. Das niedrigste Infektionsrisiko zeigte sich bei den über 50- Jährigen (OR=0; Fishers exakter Vierfeldertest

($p < 0,05$). Der Anteil der mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infizierten bzw. kontaminierten weiblichen Personen (OR=1,184, KI=0,588-2,443) lag nur geringfügig höher als der Anteil infizierter bzw. kontaminierter männlicher Personen (OR=0,845, KI=0,387-1,623). Es wurde also kein signifikantes geschlechtsspezifisches Infektionsrisiko gefunden. Personen mit akuter gastrointestinaler Symptomatik („Diarrhö“ und /oder „Bauchschmerzen“ und /oder nicht näher definierte gastrointestinale Beschwerden) zeigten erstaunlicherweise weniger häufig *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* im Stuhl (OR=0,570; KI=0,215-1,278) als Personen ohne akute gastrointestinale Symptomatik (OR=1,753; KI=0,768-4,534; vgl. Abschnitt 3.5.4.1).

Bisher gibt es einige Studien, die eine höhere *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Prävalenz im Kindesalter mit abnehmender Prävalenz bei zunehmendem Alter angaben, so Studien aus Kambodscha (CANDLER et al., 1990), Äthiopien (ERKO et al., 1995) und Bangladesch (HAQUE et al., 1997b), sowie einige Studien, die eine ansteigende Prävalenz bei zunehmendem Alter ermittelten, so aus Nigeria (OYERINDE et al., 1977), Bangladesch (HOSSAIN et al., 1983), Indonesien (BANGS et al., 1996) und Brasilien (PÓVOA et al., 2000). Es liegen aber auch Studien vor, die keinen Altersunterschied feststellten, so aus Mexiko (ACUÑA-SOTO et al., 1993) und Saudi-Arabien (OMAR et al., 1995). Außerdem wurde in zwei Studien, die die Häufigkeit von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in Abhängigkeit vom Lebensalter untersuchten, ein Kurvenverlauf mit zwei Häufigkeitsmaxima beschrieben: in Bangladesch einerseits bei Kleinkindern und andererseits bei über 40- Jährigen (WANKE et al., 1988) und in Mexiko einerseits bei 5- bis 14- Jährigen und andererseits bei über 45- Jährigen (MARTÍNEZ-GARZIA et al., 1990).

In Studien, in denen Geschlechtsunterschiede bezüglich der Verteilung von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* untersucht wurden, zeigten sich folgende Ergebnisse: Beispielsweise war in der Studie für Bangladesch im Durchschnitt eine gleiche Häufigkeitsverteilung von invasiver Amöbiasis bei insgesamt 85 weiblichen und männlichen Untersuchten festzustellen. Allerdings traten aber in Bezug auf das Lebensalter Häufungen bei weiblichen Infizierten zwischen 21 und 40 Jahren und Häufungen bei männlichen Untersuchten über 40 Jahren auf (WANKE et al., 1988). Einen größeren Anteil der mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infizierten bzw. kontaminierten weiblichen Personen zeigten Studien aus Nigeria (OYERINDE et al., 1977), Kenia (CHUNGE et al., 1991), Malaysia (RAJESWARI et al., 1994) und Bangladesch (HAQUE et al., 1997a; HAQUE et al., 1997b). Eine Studie aus Äthiopien nannte eine signifikant erhöhte Prävalenz von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bei weiblichen Personen für die Gruppe von Schülerinnen. In dieser Studie wurden

einerseits Schüler und Schülerinnen und andererseits Gemeinden ohne Schulen in allen Altersklassen untersucht (ERKO et al., 1995). Zwei Studien – aus Süd-Afrika (GATHIRAM & JACKSON, 1985) und von den nördlichen Philippinen (RIVERA et al., 1998) – wiesen bei den untersuchten weiblichen Personen lediglich eine höhere Prävalenz von *Entamoeba dispar*, nicht aber von *Entamoeba histolytica* nach. Einen größeren Anteil der mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infizierten bzw. kontaminierten männlichen Personen zeigte z. B. eine Studie in Nigeria (AGI, 1995). Keine Geschlechtsdifferenzen bezüglich einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* wiesen Studien aus Saudi-Arabien (OMAR et al., 1995), Indonesien (BANGS et al., 1996), Bangladesch (HAQUE et al., 1999) und Mexiko (RAMOS et al., 2000) nach. Insgesamt überwiegen die Studien mit erhöhtem Anteil weiblicher infizierter bzw. kontaminierter Personen, was in der vorliegenden Studie allerdings nur tendenziell bestätigt werden konnte. Die Ursachen für eine höhere Prävalenz weiblicher mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infizierter bzw. kontaminierter Personen sind unbekannt.

GUERRANT nennt drei Studien aus Mexiko und Venezuela, in denen wegen akuter Diarrhö im Krankenhaus aufgenommene Kinder untersucht wurden. *Entamoeba histolytica* konnte bei 2 bis 15 % der Kinder nachgewiesen werden (GUERRANT, 1986). Eine kleine epidemiologische chinesische Studie berichtete von einer positiven signifikanten Korrelation zwischen einer Infektion mit *Entamoeba histolytica* und dem Auftreten von Diarrhö bei insgesamt 42 Personen (GUO et al., 1995). In Indien stellten NANDA und Mitarbeiter keine Korrelation von akuten gastrointestinalen Symptomen und positiven ROBINSON-Kulturen fest. Personen mit Diarrhö hatten aber häufiger negative ROBINSON-Kulturen (NANDA et al., 1984). Eine andere Studie stellte an 2000 in Bangladesh untersuchten Kindern fest, dass es keine Korrelation von akuten gastrointestinalen Symptomen und dem Nachweis von *Entamoeba histolytica* gab, unabhängig davon, ob dieser mit stuhlmikroskopischer oder isoenzymanalytischer Methode erfolgte (HAQUE et al., 1997a). Auch eine weitere Studie aus Mexiko mit 1730 Probanden stellte keine Korrelation von Durchfallerkrankung und dem Nachweis von *Entamoeba histolytica* mittels der Hexokinase-Isoenzymauftrennung fest (MARTÍNEZ-GARZIA et al., 1990). Eine Studie, die Stuhlproben aus einem endemischen Gebiet (Togo) und Proben aus tropenmedizinischen Ambulanzen eines nichtendemischen Gebietes (Deutschland) verglich, konnte keine Korrelation zwischen dem Nachweis von *Entamoeba histolytica* sowie *Entamoeba dispar* und akuter gastrointestinaler Symptomatik feststellen (PICKEL, 1994). Die Vorstudie konnte ebenso keine Korrelation von stuhlmikroskopischem Nachweis von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mit Diarrhö herstellen (JETTER, 1998). Weil sich in der vorliegenden Studie keine

Korrelation zwischen akuter gastrointestinaler Symptomatik und *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Nachweis im Stuhl zeigte und auch kein Fall von invasiver Amöbiasis entdeckt wurde, müssen andere Ursachen wie z. B. eine bakterielle Kolitis (vgl. Abschnitt 1.3.2) für eine akute gastrointestinale Symptomatik ursächlich gewesen sein.

Erwähnt sei noch, dass eine extraintestinale Manifestation eines Leberabszesses häufiger bei Männern zu beobachten war (KATZENSTEIN et al., 1982; GUERRANT, 1986), während Kinder häufiger fulminante Verläufe einer intestinalen Kolitis zeigten (NNOCHIRI, 1965), aber weniger Leberabszesse entwickelten (MARTÍNEZ-GARCIA et al., 1986).

4.8.2 Ökonomische und soziale Risikofaktoren

Niedriger ökonomischer und sozialer Standard wurde häufig als Risikofaktor für eine Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* genannt (BRUCKNER, 1992; RAMOS et al., 2000).

In der vorliegenden Studie bestand für Bauern ein vermindertes Risiko einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* (OR=0,663, KI=0,152-2,042; vgl. Abschnitt 3.5.4.2).

Die Bauern in den drei untersuchten Dörfern, die üblicherweise ab dem 20. Lebensjahr einer geregelten Lebensweise nachgingen, nahmen ihre Mahlzeiten häufiger unter freiem Himmel ein. Ihr Arbeitsumfeld stellte vermutlich eine weniger kontagiöse Umgebung dar, als die oft z. T. in Lehmhütten eng zusammenlebenden Familienmitglieder. In diesem Zusammenhang sei auf das häufig zitierte Phänomen des „Crowding“ hingewiesen, bei dem es aufgrund der hohen Dichte vieler zusammenlebender Menschen zu einer gehäuften Infektion mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* kommt (RAVDIN, 1995). In einer Studie hatten Familien mit mehr als 4 Personen ein höheres Risiko, eine Amöbiasis zu entwickeln (CANDLER et al., 1990); ebenso hatten in einer anderen Studie Familien mit über acht Personen ein höheres Risiko (CHUNGE et al., 1991). Keine Korrelation von „Crowding“ mit *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Nachweis fand OMAR in Saudi-Arabien (OMAR, et al., 1995). In der vorliegenden Studie fand keine statistische Auswertung der Infektionsrate pro Familie (Haushalt) statt, da durchschnittlich nur vier Personen in einer Familie untersucht wurden.

4.8.3 Risikofaktoren bezüglich des Trinkwassers, des Brauchwassers und des Hygieneverhaltens

Ein vermindertes Risiko einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* bestand für Besitzer eigener Trinkquellen (OR=0,546, KI=0,256-1,096) und für Personen, die ihr Brauchwasser aus dem Tigris bezogen (OR=0,517, KI=0,256-1,038). Hingegen ließ sich ein erhöhtes Risiko nachweisen für Personen, die keine eigene Trinkquelle hatten und Personen, die ihr Brauchwasser aus einem gemeinsamen Brunnen bezogen (OR=1,833, KI=0,912-3,710; OR= 1,934, KI=0,964-3,907, vgl. Abschnitt 3.5.4.3).

Eine Studie aus einer ländlichen Gegend Saudi-Arabiens beschrieb ein zwei- bis dreifach erhöhtes *Entamoeba histolytica*- / *Entamoeba dispar*-Infektions bzw. -Kontaminationsrisiko für Personen, die ihr Trinkwasser aus Brunnen bezogen, im Vergleich zu Personen, die entsalztes Meerwasser tranken (OMAR et al., 1995). Eine positive Korrelation zwischen einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* und der Nutzung von Abwasser zur Feldbewässerung beschrieb eine Studie in Mexiko City. Für 5- bis 14- Jährige, die von Erzeugnissen der Regenwasser-Feldbewässerung lebten, wurde ein mehrfach erhöhtes Infektions- bzw. Kontaminationsrisiko nachgewiesen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gleichen Alters (CIFUENTES et al., 1994). Sogar noch über Eiswürfel in Getränken konnte man sich infizieren, wie in einer Studie festgestellt wurde. Die Personen waren Touristen, die aus endemischen Ländern zurückreisten (de LALLA et al., 1992). Interessant ist das Ergebnis einer Studie aus Kambodscha, bei der Trinkwasserproben von 51 an invasiver Amöbiasis erkrankten Personen entnommen wurden. In den Trinkbrunnen von 44 dieser 51 Personen zeigten sich lediglich Kolibakterien und keine Amöben (CANDLER et al., 1990).

In Hydirelyaz und Kozan besaßen 145 Personen (95,2 %) eine eigene Trinkquelle (Brunnen) und sieben Personen keine eigene Trinkquelle, sondern eine gemeinschaftlich genutzte Trinkquelle (vgl. Abschnitt 3.5.6.3). Die Schächte der Brunnen waren meistens nach außen hin offen und ausgestattet mit unterschiedlich hohen Brunnenrändern, die z. T. nur ca. 70 cm hoch waren. Das zum Trinken und für Speisen verwendete Wasser wurde in einem Gefäß mit Hilfe eines Seiles heraufbefördert. Es lässt sich aber bezüglich des Infektionsweges von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* via Brunnenwasser als Trinkwasser und / oder das Wasser des

Tigris als Brauchwasser oder weitere Möglichkeiten — fäkal-oraler Weg, Fliegenübertragung (PIEKARSKI, 1987) — nur spekulieren.

Die gemeinsam genutzte Quelle Bagpunars mit gemeinsamen und privaten Leitungen für Trink- und Brauchwasser der einzelnen Haushalte war nicht wie ein Brunnenschacht nach außen hin offen. Eine Kontamination dieser Quelle von außen ist daher unwahrscheinlicher als eine Kontamination über die offenen Schächte der Dörfer Hydrelyaz und Kozan. Auf der anderen Seite kann die hohe und relativ gleichmäßige Verteilung von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* und *Entamoeba coli* auf die Familien in Bagpunar als Hinweis auf die Kontamination der Quelle gedeutet werden. Es ist zu bedenken, dass diese Quelle von einer beträchtlichen Anzahl von ca. 800 Personen genutzt wurde, was einer Kontamination sicherlich entgegenkommt.

Ein Schutz vor einer Infektion mit *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar* bestand in der vorliegenden Studie für Personen, die sich nach dem Defäzieren die Hände nicht wuschen (Fishers exakter Vierfeldertest, $p < 0,05$; vgl. Abschnitt 3.5.4.3). Außerdem wies dieselbe Personengruppe signifikant höhere positive Antikörpertiter gegen *Entamoeba histolytica* bzw. *Entamoeba dispar* auf (OR=0,190, KI=0,010-0,937, bzw. OR=0,076, KI=0,012-0,264) als die Personengruppe, die sich die Hände wusch (vgl. Abschnitt 3.5.5).

In einer Studie wurde vermutet, dass *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* auf fäkal-oralem Weg übertragen wurde, da sich die Fallzahlen in Familien erhöhten, wenn die speisenzubereitende Person infiziert war (GATTI et al., 1995a). Dieser Zusammenhang konnte jedoch in einer anderen Studie nicht bestätigt werden (SPENCER et al., 1977). Eine Studie aus Israel stellte eine hohe Korrelation von individuellem Hygieneverhalten sowie kontaminierten Lebensmitteln und *Entamoeba histolytica*-Infektionen fest (HART et al., 1984).

Wie *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in Gemeinschaften übertragen wird, ist meistens nicht zu klären. Dies zeigte sich in einer großangelegten, in Texas durchgeführten Familienstudie. Dort wurde für Mitglieder der Familien, die lediglich außerhalb des Wohnraumes Latrinen hatten, eine hohe Seroprävalenz für *Entamoeba histolytica* errechnet. Diese Mitglieder zeigten ein unhygienischeres Verhalten als die Angehörigen der Familien mit „indoor toilets“, auch waren diese Latrinen im Durchschnitt in einem schlechteren sanitären Zustand als die „indoor toilets“ (SPENCER et al., 1977). Allerdings wurde in dieser Studie das individuelle Hygieneverhalten und die Hygienebedingungen nicht genau genug untersucht, um weitere

Aussagen bezüglich der Transmission machen zu können. Der Übertragungsweg von Person zu Person (fäkal-oral) wurde aber nicht nur in dieser Studie (SPENCER et al., 1977), sondern auch in einer Studie aus Kambodscha (CANDLER, et al., 1990) als wahrscheinlich erachtet. Der fäkal-orale Übertragungsweg wurde auch in weiteren Studien als häufiger Übertragungsweg angesehen (HORSTMANN, 1994; FLEISCHER & TANNICH, 2000).

In Hydrelyaz fand die Befragung, ob nach dem Defäzieren die Hände gewaschen wurden, in den Familien statt. In Kozan, besonders aber in Bagpnar, fand die Befragung v. a. in der Öffentlichkeit statt – in der Schule und auf freiem Feld. In Bagpnar wuschen sich nach den Angaben der Dorfbewohner alle Personen die Hände. Die Untersuchten Bagpnars hatten aber die höchste Infektionsrate im Vergleich zu den anderen zwei Dörfern (vgl. Tabelle 3.20). Es ist naheliegend, dass hier unrichtige Angaben gemacht wurden.

Wie schon in Abschnitt 3.1.3 dargestellt, hat eine stichprobenhafte Untersuchung der sanitären Verhältnisse deutlich gemacht, dass eine Händewaschmöglichkeit oft nicht oder unzureichend gegeben ist. Der Antwort auf die Frage: „Waschen Sie sich die Hände nach dem Defäzieren?“ kann auch aufgrund der Einschätzung der befragten einheimischen Mitarbeiter und Angehörigen der Universität von Diyarbakir nur eine geringe objektive Aussagekraft beigemessen werden. Die Annahme, dass Angaben zum Händewaschen nicht verlässlich sind, kann auch aus dem Ergebnis einer anderen türkischen Studie abgeleitet werden. Hier wurde ein Befall mit Darmparasiten bei Personen, die sich die Hände nach dem Defäzieren oder vor dem Essen wuschen, etwa gleich häufig festgestellt wie bei Personen, die sich die Hände nicht wuschen. In dieser Studie wurden 1056 Schulkinder und Eltern aus Istanbul auf Risiken für einen Befall mit Darmparasiten hin untersucht (AYHAN & TÜMERDEM, 1994). Es ist also davon auszugehen, dass vermutlich keiner der Befragten sich die Hände wusch. Wenn dennoch eine ehrliche Antwort auf diese heikle, mündlich gestellte Frage gegeben wurde, so könnte dies auf die Einsicht der Befragten in das notwendige Hygieneverhalten zur Vermeidung einer Infektion mit z. B. Darmparasiten hindeuten. Des Weiteren ist vorstellbar, dass bei Personen, die keine Gelegenheit hatten, sich nach dem Defäzieren die Hände zu waschen, aber ein umsichtiges Hygieneverhalten (HART et al., 1984) unter den gegebenen erschwerten Bedingungen zeigten, die Infektionsrate für *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* niedriger ist als bei Personen, die lediglich einer Erwartungshaltung der Interviewer zu entsprechen suchten.

4.9 Schlussfolgerungen

1) Die ermittelten Prävalenzen von 1,1 % für *Entamoeba histolytica* und von 13,6 % für *Entamoeba dispar* wurden aufgrund der Unzuverlässigkeit der MIF-C-Methodik in der vorliegenden Studie und der Anzüchtungsrate von 60 % *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in den ROBINSON-Kulturen auf 1,9 % bzw. 21,9 % korrigiert. Die korrigierte Prävalenz von 1,9 % für *Entamoeba histolytica* entspricht der weltweit in epidemiologischen Studien gewonnenen Prävalenz von durchschnittlich 3,5 %. Die korrigierte Prävalenz von 21,9 % für *Entamoeba dispar* ist deutlich höher als die in epidemiologischen Studien durchschnittlich gewonnene Prävalenz von 8,7 %.

2) Träger von Anti-*Entamoeba histolytica*-Antikörpern und Träger von Anti-*Entamoeba dispar*-Antikörpern hatten ein signifikant höheres Risiko, mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* infiziert bzw. kontaminiert zu sein.

3) In der Altersgruppe der 11- bis 20- Jährigen fand sich die höchste Prävalenz von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*. Von der Gefährdung durch *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* waren insbesondere zwei Personengruppen betroffen: einerseits Personen, die in Haushalten wohnten, in welchen sie für ihre Trinkwasser- und Brauchwasserversorgung einen gemeinschaftlichen Brunnen benutzten und andererseits überraschenderweise Personen, die sich gemäß ihren eigenen Angaben ihre Hände wuschen. Weibliche Personen waren nicht signifikant häufiger infiziert bzw. kontaminiert als männliche Personen; es konnte keine Korrelation zwischen einer akuten gastrointestinalen Symptomatik und dem Nachweis von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* festgestellt werden. Es wurde kein Fall von invasiver Amöbiasis nachgewiesen.

4) Die serologische Prävalenz von 14,3 % für *Entamoeba histolytica* war wesentlich höher als die mit der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion im Stuhl nachgewiesene Prävalenz von 1,1 %. Die serologische Prävalenz von 45,3 % für *Entamoeba dispar* deutet auf eine hohe Durchseuchung der ländlichen Bevölkerung der Süd-Ost-Türkei hin.

5) Die höchsten Seroprävalenzen für *Entamoeba histolytica* zeigten sich bei den 11- bis 20- Jährigen und den 41- bis 50- Jährigen bzw. für *Entamoeba dispar* bei den 11- bis 20- Jährigen und den über 50- Jährigen.

6) Aufgrund der hohen Anzahl von 29 Personen (11,6 %), die Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* aufwiesen, kann eine Kreuzreaktivität zwischen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* vermutet werden. Da andererseits eine große Anzahl von 86 Personen (34,7 %) Antikörper besaß, die ausschließlich mit *Entamoeba dispar*-Antigen reagierten, ist es auch möglich, dass eine Kontamination mit *Entamoeba dispar* eine spezifische Bildung von Antikörpern gegen *Entamoeba dispar* im Wirt zur Folge hat.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die Prävalenzen von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in der Süd-Ost-Türkei bestimmt. Von insgesamt 265 zufällig aus drei verschiedenen Dörfern ausgesuchten Personen wurden Stuhl- und Blutproben gesammelt. Gleichzeitig wurden mittels Fragebögen Daten sowohl zu den Probanden, zu deren ökonomischen und sozialen Verhältnissen, als auch zum Hygieneverhalten und zur Trinkwasser- und Brauchwasser-situation erhoben. In dem Labor der Mikrobiologie der Universität von Diyarbakir wurden die Stuhlproben auf *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* und andere Darmprotozoen-Spezies hin mit Hilfe der MIF-C-Methode (SAPERO & LAWLESS, 1953) mikroskopisch untersucht. Anschließend wurden 91 von diesen 265 Stuhlproben (34 %) einer Kulturanzüchtung nach ROBINSON zugeführt. In 15 von diesen 91 Proben wurde eindeutig *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* mittels der MIF-C-Methode nachgewiesen. In den übrigen 76 Proben zeigten sich von *Entamoeba coli* und / oder von *Entamoeba hartmanni* und / oder von *Jodamoeba bütschlii* zusammen mehr als 5 Zysten pro Präparat. Die aus den ROBINSON-Kulturen gewonnenen Trophozoiten wurden vor Ort für die Hexokinase-Isoenzymauftrennung und die Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion aufbereitet. Für die kolorimetrische Polymerase-Kettenreaktion wurden 47 Stuhlproben eingefroren, um sie im Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, auf *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* hin zu untersuchen. Die aufbereiteten Blutproben bzw. die daraus gewonnenen Seren wurden mit Hilfe eines Enzym-Immuntests auf Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* untersucht. Diese Analyse wurde am Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Die mit Hilfe der Hexokinase-Isoenzymauftrennung, der Riboprinting-Polymerase-Kettenreaktion und der kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion ermittelte epidemiologische Prävalenz betrug 1,1 % für *Entamoeba histolytica* und 13,6 % für *Entamoeba dispar*. Diese Werte mussten aber wegen der Unzuverlässigkeit der MIF-C-Methode in der vorliegenden Studie und wegen der Anzüchtungsrate von 60 % *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in den ROBINSON-Kulturen korrigiert werden. Es ergab sich somit eine Prävalenz von 1,9 % für *Entamoeba histolytica* bzw. von 21,9 % für *Entamoeba dispar*.

Die serologische Prävalenzen von 14,3 % für *Entamoeba histolytica* und von 45,8 % für *Entamoeba dispar* weisen auf eine hohe Durchseuchung sowohl mit *Entamoeba histolytica* als auch mit *Entamoeba dispar* hin.

Die höchsten Antikörpertiter gegen *Entamoeba histolytica* zeigten die Altersgruppen der 11- bis 20- Jährigen und der 41- bis 50- Jährigen bzw. die höchsten Antikörpertiter gegen *Entamoeba dispar* die Altersgruppen der 11- bis 20- Jährigen und der über 50- Jährigen.

In der Altersgruppe der 11- bis 20- Jährigen fand sich die höchste Prävalenz von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*. Von der Gefährdung durch *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* waren insbesondere zwei Personengruppen betroffen: einerseits Personen, die in Haushalten wohnten, in welchen sie für ihre Trinkwasser- und Brauchwasserversorgung einen gemeinschaftlichen Brunnen benutzten und andererseits überraschenderweise Personen, die sich gemäß ihren eigenen Angaben ihre Hände wuschen. Einen Schutz vor einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* zeigten insbesondere Bauern, über 50- Jährige und Mitglieder von Haushalten, die einen eigenen Brunnen besaßen, ebenso wie Personen, die ihre Hände nach dem Defäzieren nicht wuschen. Für eine Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* wurden keine signifikanten Werte bezüglich des Geschlechts gefunden und es konnte auch keine Korrelation zwischen einer Infektion bzw. Kontamination mit *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* und einer akuten gastrointestinalen Symptomatik hergestellt werden. Es wurde kein Fall von invasiver Amöbiasis nachgewiesen.

6. Anhangstabelle und Abbildungen

6.1 Anhangstabelle

Tabelle 6.1 Ergebnisse der untersuchten Personen bezüglich akuter gastrointestinaler Symptome, mikroskopischer Untersuchung der Stuhlproben, Erhebung der Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar*, sowie der Hexokinase- Isoenzymauftrennung, Riboprinting- Polymerase- Kettenreaktion (r-PCR) und kolorimetrischen Polymerase-Kettenreaktion (k-PCR). Auch das Gesamtergebnis der drei zuletzt erwähnten Methoden ist angegeben.

E.h. *Entamoeba histolytica*

E.d. *Entamoeba dispar*

E. coli *Entamoeba coli*

E. hart. *Entamoeba hartmanni*

J. bütt. *Jodamoeba bütschlii*

| Nr. | akute gastrointestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzymauftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|----------------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------|--------------------------------|-------|---------|----------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. hart.</i> | <i>J. bütt.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 1 | ja | | | | | 25,2 | 0 | | | negativ | negativ |
| 2 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 3 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 4 | ja | | | | | 3,4 | 0 | | | negativ | negativ |
| 5 | nein | | <i>E.coli</i> | | | | 20,1 | | | negativ | negativ |
| 6 | ja | | | | | 1,2 | 7,1 | | | negativ | negativ |
| 7 | ja | | | | | 13,8 | 0 | | | negativ | negativ |
| 8 | nein | | | | | 0 | 10,8 | | | negativ | negativ |
| 9 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 10 | ja | | | | | 11,9 | 0 | | | | |
| 11 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 1,5 | 11,9 | | | | |
| 12 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 13 | ja | | | | | 0 | 17,1 | | | | |
| 14 | ja | | | | | 2,8 | 0 | | | | |
| 15 | nein | | | | | 0 | 7,6 | | | | |
| 16 | nein | | | | | 9,3 | 0 | | | | |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|---------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. hart.</i> | <i>J. bü.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 17 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 18 | ja | | | | | 0 | 0 | | | negativ | negativ |
| 19 | nein | | | | | 0 | 10,6 | | | | |
| 20 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 21 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 22 | ja | | | | | 0 | 0 | | | negativ | negativ |
| 23 | ja | | | | | 0 | 8,7 | | | negativ | negativ |
| 24 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 7,8 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 25 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 26 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 1,4 | 43 | | | negativ | negativ |
| 27 | nein | | | | | 0 | 23,4 | | | negativ | negativ |
| 28 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 20,4 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 29 | ja | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 17,7 | 0 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 30 | ja | | | | | 0 | 0 | | | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 31 | nein | | | | <i>J. bü.</i> | 0 | 9,6 | | | negativ | negativ |
| 32 | nein | | | | | 0 | 9,7 | | | | |
| 33 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 34 | nein | | | | | 8,4 | 1 | | | | |
| 35 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 36 | nein | | | | | 0 | 4,8 | | | | |
| 37 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 38 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 39 | nein | | | | | 9,4 | 4 | | | | |
| 40 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 41 | nein | | | | | 4 | 0 | | | | |
| 42 | nein | | | | | 8,8 | 16,2 | | | | |
| 43 | ja | | | | | 0 | 25,5 | | | | |
| 44 | ja | | | | | 0 | 38,3 | | | | |
| 45 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 46 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 47 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 22,4 | | | negativ | negativ |
| 48 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. bü.</i> | 7,1 | 14,6 | | | negativ | negativ |
| 49 | nein | | | | <i>J. bü.</i> | 0 | 0 | | | negativ | negativ |
| 50 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 44,9 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 51 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 52 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 30 | 41,2 | | | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 53 | nein | | | | | 14,8 | 19,6 | | | | |
| 54 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 55 | nein | | | | | 0 | 13,3 | | | | |
| 56 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|---------|-------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | <i>J.büt.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 57 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 58 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 11,2 | 0 | | | | |
| 59 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0,1 | 0 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 60 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0,4 | 22 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 61 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 62 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 63 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 64 | nein | | | | | 0 | 29,2 | | | | |
| 65 | nein | | | | | 6 | 0 | | | | |
| 66 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 9,2 | | | negativ | negativ |
| 67 | nein | | | | | 1,2 | 9,2 | | | | |
| 68 | nein | | | | | 3,2 | 8 | | | | |
| 69 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 70 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 71 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 72 | nein | | | | | 0 | 18 | | | | |
| 73 | nein | | | | | 0,9 | 68,2 | | | | |
| 74 | ja | | | | | | | | | | |
| 75 | nein | | | | | 0,1 | 0 | | | | |
| 76 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 77 | nein | | | | | 0 | 2,8 | | | | |
| 78 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 79 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 80 | nein | | | | | 11,4 | 0 | | | | |
| 81 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 82 | nein | | | | | 7,5 | 0 | | | | |
| 83 | ja | | | | | 41,4 | 146 | | | | |
| 84 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 85 | ja | | | | | 0 | 8,4 | | | | |
| 86 | ja | | | | | 0,7 | 12 | | | | |
| 87 | ja | | | | | 5,1 | 0 | | | | |
| 88 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 89 | ja | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 5 | 0 | | | | |
| 90 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 16,1 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 91 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | negativ | negativ | | negativ |
| 92 | nein | | | | | 0 | 6,3 | | | | |
| 93 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 8,7 | 4,6 | negativ | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 94 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 22,5 | 50,6 | negativ | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | <i>J.büt.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 95 | nein | | | | | 0 | 56,2 | | | | |
| 96 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 97 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 8,9 | 37,5 | negativ | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 98 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 28,5 | 111,4 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 99 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 100 | nein | | | | | 0 | 40,3 | | | | |
| 101 | nein | | | | | 0 | 26,8 | | | | |
| 102 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 103 | nein | | | | | 0 | 78,7 | | | | |
| 104 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 16,2 | 15 | <i>E.h.</i> | negativ | negativ | <i>E.h.</i> |
| 105 | ja | | | | | 9,7 | 47,2 | | | | |
| 106 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 107 | nein | | | | | 0 | 17,8 | | | | |
| 108 | nein | | | | | 0 | 45,7 | | | | |
| 109 | nein | | | | | 1 | 50,8 | | | | |
| 110 | nein | | | | | 0 | 3,1 | | | | |
| 111 | nein | | | | | 0 | 3,4 | | | | |
| 112 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 15,5 | 112,2 | negativ | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 113 | nein | | | | | 0 | 1 | | | | |
| 114 | nein | | | | | 1,2 | | | | | |
| 115 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 2,7 | 68,2 | | | | |
| 116 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0 | 33,6 | | | negativ | negativ |
| 117 | nein | | | | | 1,3 | 2,7 | | | | |
| 118 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0 | 27,3 | | | | |
| 119 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0,5 | 0 | | | | |
| 120 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 1,6 | 25,9 | | | | |
| 121 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 122 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 123 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 24,8 | | | | |
| 124 | nein | | | | | | | | | | |
| 125 | nein | | | | | 16,9 | 53,1 | | | | |
| 126 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 127 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 128 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 4,3 | 92,6 | | | | |
| 129 | nein | | | | | 0 | 15,6 | | | | |
| 130 | nein | | | | | 0 | 47,3 | | | | |
| 131 | nein | | | <i>E.hart.</i> | | 16,9 | 91,6 | | | negativ | negativ |
| 132 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 18,8 | negativ | negativ | negativ | negativ |
| 133 | nein | | | | | 0 | 4,6 | | | | |
| 134 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|---------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|---------|-------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. hart.</i> | <i>J. bü.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 135 | nein | | | | | 4,6 | 0 | | | | |
| 136 | nein | | | | | 0 | 19,2 | | | | |
| 137 | nein | | | | | 0 | 9,4 | | | | |
| 138 | nein | | | | | 5,6 | 0 | | | | |
| 139 | nein | | | | | 0 | 4,1 | | | | |
| 140 | nein | | | | | 0 | 14,1 | | | | |
| 141 | nein | | | | | 0,3 | 7 | | | | |
| 142 | nein | | | | | 0 | 3,7 | | | | |
| 143 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 4,4 | 42,3 | | | | |
| 144 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E. coli</i> | | | 2,5 | 93,1 | | | negativ | negativ |
| 145 | nein | | | | | 2,2 | 92,8 | | | | |
| 146 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 26,4 | | | | |
| 147 | nein | | | | | 9,6 | | | | | |
| 148 | nein | | | | | 7,8 | | | | | |
| 149 | nein | | | | | 0 | 51,2 | | | | |
| 150 | nein | | | | | 9,4 | 0 | | | | |
| 151 | nein | | | | | 21,4 | 73,3 | | | | |
| 152 | nein | | | | | 0 | 24,2 | | | | |
| 153 | nein | | | | | 0 | 89,1 | | | | |
| 154 | nein | | | | | 5 | 0 | | | | |
| 155 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 156 | nein | | <i>E. coli</i> | | <i>J. bü.</i> | 24,1 | 49,7 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 157 | | | | | | | | | | | |
| 158 | | | <i>E. coli</i> | | | | | | | | |
| 159 | | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 31,4 | | | negativ | negativ |
| 160 | nein | | | | <i>J. bü.</i> | 0 | 46,3 | | | | |
| 161 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 162 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E. coli</i> | | | 0 | 49,3 | | | | |
| 163 | nein | | <i>E. coli</i> | | <i>J. bü.</i> | 0 | 24,6 | negativ | negativ | | negativ |
| 164 | nein | | | | | 0 | 44,8 | | | | |
| 165 | nein | | | | | 0 | 8 | | | | |
| 166 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 27,5 | | | | |
| 167 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 49,8 | | | | |
| 168 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 3,2 | 0 | | | | |
| 169 | nein | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 2,5 | | | | |
| 170 | ja | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 171 | nein | | | | | 0 | 9,1 | | | | |
| 172 | nein | | | | <i>J. bü.</i> | 0 | 14,3 | | | negativ | negativ |
| 173 | ja | | <i>E. coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 174 | ja | | | | | 1,6 | 8,1 | | | | |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|---------------|----------------|---------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|---------|-------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | <i>J.büt.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 175 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 12,9 | | | | |
| 176 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 177 | ja | | | | | 3,3 | 31 | | | | |
| 178 | nein | | | | | 0 | 24,2 | | | | |
| 179 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 180 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 21,8 | | | | |
| 181 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 42,1 | | | | |
| 182 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 76,4 | | | | |
| 183 | nein | | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | | 0 | 0 | | | | |
| 184 | nein | | | | | | | | | | |
| 185 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 186 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 33,7 | <i>E.d.</i> | negativ | | <i>E.d.</i> |
| 187 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | negativ | negativ | | negativ |
| 188 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 3,9 | | | | |
| 189 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 43 | | | | |
| 190 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 191 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 26,2 | 67 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 192 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 193 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 20,7 | negativ | negativ | | negativ |
| 194 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 10,5 | <i>E.d.</i> | negativ | negativ | <i>E.d.</i> |
| 195 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 4 | <i>E.d.</i> | negativ | | <i>E.d.</i> |
| 196 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J.büt.</i> | 0 | 32,7 | negativ | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 197 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 38,5 | 118,6 | <i>E.d.</i> | negativ | | <i>E.d.</i> |
| 198 | ja | | <i>E.coli</i> | | <i>J.büt.</i> | 0 | 9,6 | | | negativ | negativ |
| 199 | ja | | | | | 1,9 | 51,8 | | | | |
| 200 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0,7 | 18,6 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 201 | ja | | | | | 0 | 15,3 | | | | |
| 202 | ja | | | | | 0 | 9,1 | | | | |
| 203 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 204 | nein | | | | | 0 | 6,1 | | | | |
| 205 | ja | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 35,6 | 64 | <i>E.d.</i> | negativ | | <i>E.d.</i> |
| 206 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 207 | ja | | | | | 0 | 44,9 | | | | |
| 208 | | | <i>E.coli</i> | | | | | | | negativ | negativ |
| 209 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 210 | ja | | | | | 0 | 29,4 | | | | |
| 211 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 212 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 54,2 | 123,1 | | | | |
| 213 | ja | | <i>E.coli</i> | | <i>J.büt.</i> | 20,2 | 65,3 | | | | |
| 214 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J.büt.</i> | 16,1 | 28 | | | negativ | negativ |
| 215 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J.büt.</i> | 23,1 | 89 | negativ | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |

Fortsetzung Tabelle 6.1

| Nr. | akute gastro-intestinale Symptome | Mikroskopische Ergebnisse | | | | Antikörper gegen | | Hexokinase-Isoenzym-auftrennung | r-PCR | k-PCR | Resultat |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|-------------|---------------------------------|-------------|-------------|------------------|
| | | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | <i>J.büt.</i> | <i>E.h.</i> | <i>E.d.</i> | | | | |
| 216 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 21,3 | 73 | | | | |
| 217 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | negativ | negativ |
| 218 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 219 | ja | | | | | 0 | 15,2 | | | | |
| 220 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 221 | ja | | <i>E.coli</i> | | | 0,3 | 0 | | | | |
| 222 | nein | | | | | 0 | 1 | | | | |
| 223 | ja | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 0 | 36 | <i>E.d.</i> | negativ | negativ | <i>E.d.</i> |
| 224 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 225 | ja | | | | | 0 | 1,6 | | | | |
| 226 | ja | | | | | 0 | 35,7 | | | | |
| 227 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 11,9 | | | | |
| 228 | nein | | | | | 2,3 | 67,5 | | | | |
| 229 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 230 | ja | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 231 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 232 | nein | | | | | 16,9 | 1,5 | | | | |
| 233 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0 | 38,5 | negativ | negativ | | negativ |
| 234 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 20,4 | | | | |
| 235 | nein | | | | | 0 | 15,3 | | | | |
| 236 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 4,5 | 12,9 | <i>E.d.</i> | negativ | | <i>E.d.</i> |
| 237 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 12,3 | 65,8 | | | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 238 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 38,7 | 108,5 | | | | |
| 239 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 45,1 | 154,9 | negativ | <i>E.d.</i> | negativ | <i>E.d.</i> |
| 240 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 6 | 42,8 | | | | |
| 241 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 11,1 | 132,3 | <i>E.h.</i> | negativ | negativ | <i>E.h.</i> |
| 242 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | | | 20,4 | 71,7 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> |
| 243 | nein | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.coli</i> | <i>E.hart.</i> | | 26,3 | 101,1 | | | | |
| 244 | ja | | | <i>E.hart.</i> | | 12,2 | 19 | | | | |
| 245 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 18 | 77 | <i>E.h./E.d.</i> | <i>E.h.</i> | negativ | <i>E.h./E.d.</i> |
| 246 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 0 | | | | |
| 247 | nein | | | | | 25,1 | 37 | | | | |
| 248 | nein | | | <i>E.hart.</i> | | 0 | 15,6 | <i>E.d.</i> | <i>E.d.</i> | | <i>E.d.</i> |
| 249 | nein | | <i>E.coli</i> | | | 0 | 5,3 | | | | |
| 250 | nein | | | | | 0 | 0 | | | | |
| 251 | nein | | | | | 0 | 25,4 | | | | |
| 252 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0 | 0 | | | | |
| 253 | nein | | <i>E.coli</i> | | <i>J. büt.</i> | 0 | 14,4 | negativ | negativ | | negativ |

6.3 Abbildung: Haushaltsbezogener Fragebogen

QUESTIONNAIRE (for each Household)

GROUP:

Date:

1. How many person live in the same household? _____ person.

2. Income of household per month: _____

3. Drinking - water from

- | | |
|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> own well | <input type="checkbox"/> own tap |
| <input type="checkbox"/> common well | <input type="checkbox"/> common tap |
| <input type="checkbox"/> boiled water | <input type="checkbox"/> water is bought |

4. Do the person wash or peel fruits/vegetables?

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| <input type="checkbox"/> yes | <input type="checkbox"/> wash |
| | <input type="checkbox"/> peel |
| <input type="checkbox"/> no | |

5. Do the person eat raw fish or meat?

- | |
|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> yes |
| <input type="checkbox"/> no |

6. Which kind of water does the household use for making Ice cubes or washing fruits?

- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> boiled water |
| <input type="checkbox"/> unboiled water |
| <input type="checkbox"/> bought water |

7. Sanitary facilities:

- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> own toilet |
| <input type="checkbox"/> common toilet, shared between ___ person |

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abd-Alla, M. D., Wahib, A. A., Ravdin, J. I. (2000)
Comparison of Antigen-Capture ELISA to Stool-Culture Methods for the Detection of asymptomatic *Entamoeba* Species Infection in Kafer Daoud, Egypt
Am. J. Trop. Med. Hyg. 62, 579-582
- 2 Aca, I. da S., França, E. Jr., Nozaki, T., Freitas, G. B., Tateno, S. (1993)
Entamoeba histolytica zymodemes in children of Osasco, São Paulo
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 35, 581-582
- 3 Aca, I. da S., Kobayashi, S., Carvalho, L. B. Jr., Tateno, S., Takeuchi, T. (1994)
Prevalence and pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in three different regions of Pernambuco, Northeast Brazil
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 36, 519-524
- 4 Acuña-Soto, R., Samuelson, J., de Girolami, P., Zarate, L., Millan-Velasco, F., Schoolnick, G., Wirth, D. (1993)
Application of the Polymerase Chain Reaction to the Epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 48, 58-70
- 5 Adams, E. B., MacLeod, I. N. (1977a)
Invasive Amebiasis. I. Amebic Dysentery and its Complications
Medicine (Baltimore) 56, 315-323
- 6 Adams, E. B., MacLeod, I. N. (1977b)
Invasive Amebiasis. II. Amebic Liver Abscess and its Complications
Medicine (Baltimore) 56, 325-334
- 7 Agi, P. I. (1995)
Pattern of infection of intestinal parasites in Sagbama community of the Niger Delta, Nigeria
West African J. Med. 14, 39-42
- 8 Aguirre, A., Warhurst, D. C., Guhl, F., Frame, I. A. (1995)
Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hy. 89, 187-188
- 9 Ahmed, L., el-Rooby, A., Kassem, M. I., Salema, Z. A., Strickland, G. I. (1990)
Ultrasonography in the diagnosis and management of 52 patients with amebic liver abscess in Cairo
Rev. Infect. Dis. 12, 330

- 10 Aldeen, W. E., Shisenant, I., Hale, D., Matsen, I., Caroll, K., (1993)
Comparison of pooled formalin-preserved fecal specimens with three individual samples for detection of intestinal parasites
J. Clin. Microbiol. 31, 144-145
- 11 Ayhan, B., Tümerdem, Y. (1994)
İstanbul gecekondü ilkokullarında barsak parazit enfeksiyonlarının prevalansı, etkileyen faktörler ve büyümeye etkisi: epidemiyolojik bir çalışma
Mikrobiyol. Bült. 28, 366-377
- 12 Balamuth, W. (1946)
Improved egg yolk infusion for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa
Am. J. Clin. Pathol. 16, 380-384
- 13 Balci, I., Güngör, S., Berktaş, M., Sirmatel, F. (1993)
Gaziantep ve yöresinde amibiazis
Infeksiyon Dergisi 7, 95-98
- 14 Bangs, M. J., Andersen, E. M., Anthony, R. L. (1996)
Intestinal parasites of humans in a highland community of Irian Jaya, Indonesia
Ann. Trop. Med. Parasitol. 90, 49-53
- 15 Baveja, U. K., Francis, S., Kaur, M., Agarwal, S. K. (1990)
The zymodemes of *Entamoeba histolytica* in New Delhi, India
J. Diarrhoeal Dis. Res. 8, 27-30
- 16 Boeck, W. C., Drbohlav, J (1925)
The cultivation of *Endamoeba histolytica*
Am. J. Hyg. 5, 371-407
- 17 Bos, H. J., Schouten, W. J., Noordpool, H., Makbin, M., Oostburg, B. F. J. (1980)
A seroepidemiological study of amebiasis in Surimam by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 358-363
- 18 Bracha, R., Chayen, A., Rosenberg, I., Warren, L. G., Mirelman, D. (1987)
Isolation and partial characterization of the hexokinase isoenzymes from pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*
Mol. Biochem. Parasitol. 25, 203-212
- 19 Braga. L. L., Lima, A. A. M., Sears, C. L., Newman, R. D., Wuhib, T., Paive, C.A., Guerrant, R. L., Mann, B. J. (1996)
Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil
Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 693-697
- 20 Braga. L. L., Mendonca, Y., Paiva, C. A., Sales, A., Cavalcante, A. L. M., Mann, B. J. (1998)
Seropositivity for and Intestinal Colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Individuals in Northeastern Brazil
J. Clin. Microbiol. 36, 3044-3045

- 21 Bray, R. S., Harris, W. G. (1977)
The epidemiology of infection with *Entamoeba histolytica* in The Gambia, West Africa
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 401-407
- 22 Britten, D., Wilson, S. M., McNerney, R., Moody, A. H., Chiodini, P. L., Ackers, J. P. (1997)
An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces
J. Clin. Microbiol. 35, 1108-1111
- 23 Bruckner, D. A. (1992)
Amebiasis
Clin. Microbiol. Rev. 5, 356-369
- 24 Brumpt, E. (1925)
Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme
Bull. Acad. Méd. (Paris) 94, 943-952
- 25 Burchard, G. D. (1999)
Amöbiasis, 414-417
in: Kretschmer, H., Kusch, G., Scherbaum, H.: Reisemedizin: Beratung in der ärztlichen Praxis;
1. Aufl., Urban & Fischer, München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- 26 Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepulveda-Amor, J., Gutierrez, G., Ortiz-Ortiz, L. (1994)
Seroepidemiology of amebiasis in Mexico
Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 412-419
- 27 Candler, W., Phuphaisan, S., Echeverria, P., Liangthorachon, B., Bhaibulaya, M., Arthur, J., Bodhidatta, L., Buduan, R. (1990)
Amebiasis at an evacuation site on the Thai-Cambodian border
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 21, 574-579
- 28 Chacín-Bonilla, L., Bonpart, D. (1981)
A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo, Venezuela
Am. J. Trop. Med. Hyg. 30, 1201-1205
- 29 Chungue, R. N., Karumba, P. N., Nagelkerke, N., Kaleli, N., Wamwea, M., Mutiso, N., Andala, E. O., Kinoti, S. N. (1991)
Intestinal parasites in a rural community in Kenya: cross-sectional surveys with emphasis on prevalence, incidence, duration of infection, and polyparasitism
East Afr. Med. J. 68, 112-123
- 30 Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz-Palacios, G., Bennett, S., Peasey, A. (1994)
Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El valle del Mezquital, México
Salud Publica Mex. 36, 3-9

- 31 Clark, C. G., Diamond, L. S. (1991a)
The Laredo strain and other „*Entamoeba histolytica*-like“ amoebae are *Entamoeba moshkovskii*
Mol. Biochem. Parasitol. 46, 11-18
- 32 Clark, C. G., Diamond, L. S. (1991b)
Ribosomal RNA genes of „pathogenic“ and „nonpathogenic“ *Entamoeba histolytica* are distinct
Mol. Biochem. Parasitol. 49, 297-302
- 33 Clark, C. G., Diamond, L.S. (1992)
Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting
Arch. Med. Res. 23, 15-16
- 34 Coşkun, S. (1991)
İlkokul Öğrencilerinde barsak parazitlerinin araştırılması
Mikrobiyol. Bült. 25, 367-372
- 35 Costa-Cruz, J. M., Cardoso, M. L., Marques, D. E. (1995)
Intestinal parasites in school food handlers in the city of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 37, 191-196
- 36 Councilman, W. T., LaFleur, H. A. (1891)
Amoebic Dysentery
John Hopkins Hosp. Rep. 2, 395-548
- 37 Deuter, R., Pietsch, S., Hertel, S., Mueller, O. (1995)
A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR
Nucl. Acids. Res. 23, 3800-3801
- 38 Diamond, L. S. (1961)
Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*
Science 134, 336-337
- 39 Diamond, L. S. (1968)
Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*- like amebae
J. Parasitol. 54, 1047-1056
- 40 Diamond, L. S. (1982)
Amebiasis: nutritional implications
Rev. Infect. Dis. 4, 843-850
- 41 Diamond, L. S., Clark, C. G. (1993)
A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911)
separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925
J. Euk. Microbiol. 40, 340-344

- 42 Dodson, J. M., Clark, C. G., Lockhart, L. A., Leo, B. M., Schroeder, J. W., Mann, B. J. (1997)
Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*
Parasitology International 46, 225-235
- 43 Edelman, M., Spingarn, C. (1977)
Cultivation of *Entamoeba histolytica* as a diagnostic procedure: a brief review
Mt. Sinai J. Med. 43, 27
- 44 Engvall, E., Perlmann, P. (1972)
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immuglobulin in antigen-coated tubes
J. Immunol. 109, 129-135
- 45 Erko, B., Birrie, H., Tedla, S. (1995)
Amoebiasis in Ethiopia
Trop. Geogr. Med. 47, 30-32
- 46 Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., Chávez, B., Castañón, G., Argüello, C., Lázaro-Haller, A., Martínez-Palomo, A. (1998)
Entamoeba dispar: ultrastructure, surface properties, and cytopathic effect.
J. Eukaryot. Microbiol. 45, 265-272
- 47 Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. (2000)
Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease
Clin. Microbiol. Rev. 13, 318-331
- 48 Fleischer, K., Tannich, E. (2000)
Amöbiasis und andere Amöbeninfektionen, 68-85
in: Lang, W., Löscher, T.: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*
3. Auflage, Georg Thieme, Stuttgart, New York
- 49 Flores, B. M., Reed, S. L., Ravdin, J. I., Torian, B. E. (1993)
Serologic reactivity to purified recombinant and native 29-kilodalton peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*
J. Clin. Microbiol. 31, 1403-1407
- 50 Garcia, L. S., Shimizu, R. Y., Bernard, C. N. (2000)
Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* Antigens in Human Fecal Specimens Using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay
J. Clin. Microbiol. 38, 3337-3340
- 51 Garfinkel, L. I., Giladi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. (1989)
DNA-probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes
Infect. Immun. 57, 926-931

- 52 Gathiram, V., Jackson, T. F. H. G. (1985)
Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population
Lancet i, 719-721
- 53 Gathiram, V., Jackson, T. F. H. G. (1987)
A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*
South. Afr. Med. J. 72, 669-672
- 54 Gatti, S., Cevini, C., Bruno, A., Novati, S., Scaglia, M. (1995a)
Transmission of *Entamoeba histolytica* within a family complex
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89, 403-405
- 55 Gatti, S., Cevini, C., Marchi, L., Novati, S., Scaglia, M. (1995b)
Entamoeba histolytica autochthonous isolates from mentally retarded Italian patients
Parasitol. Res. 81, 148-151
- 56 Gatti, S., Mahdi, R., Bruno, A., Cevini, C., Scaglia, M. (1998)
A survey of amoebic infection in the Wonji area of central Ethiopia
Ann. Trop. Med. Parasitol. 92, 173-179
- 57 González, C. R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., García, J. A., Ramirez, A., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepúlveda, J., Gutiérrez, G., Kumate, J. (1995)
Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA
Epidemiol. Infect. 115, 535-543
- 58 González-Ruiz, A., Haque, R., Rehman, T., Aguirre, A., Hall, A., Guhl, F., Warhurst, D. C., Miles, M. A. (1994a)
Diagnosis of Amebic Dysentery by Detection of *Entamoeba histolytica* Fecal Antigen by an Invasive Strain-Specific, Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
J. Clin. Microbiol. 32, 964-970
- 59 Guerrant, R. L. (1986)
Amebiasis: Introduction, current status, and research questions
Rev. Infect. Dis. 8, 218-227
- 60 Guo, Z. Z., Zhu, H., An, Y. J. (1995)
Application of the polymerase chain reaction to the epidemiological study of amoebiasis
Chung Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih 16, 303-305
- 61 Haque, R., Neville, L. M., Hahn, P., Petri, W. A. Jr. (1995)
Rapid Diagnosis of *Entamoeba* Infection by Using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* Stool Antigen Detection Kits
J. Clin. Microbiol. 33, 2558-2561

- 62 Haque, R., Faruque, A. S., Hahn, P., Lyerly, D. M., Petri, W. A. Jr. (1997a)
Entamoeba histolytica and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh
J. Infect. Dis. 175, 734-736
- 63 Haque, R., Faruque, A. S., Petri, W. A. Jr. (1997b)
Entamoeba histolytica and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh
Arch. Med. Res. 28, (Suppl.), 317-318
- 64 Haque, R., Ali, I. K. M., Akther, S., Petri, W. A. Jr. (1998)
Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of
Entamoeba histolytica Infection
J. Clin. Microbiol. 36, 449-452
- 65 Haque, R., Ali, I. K. M., Petri, W. A. Jr. (1999)
Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool
children in Bangladesh
Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 1031-1034
- 66 Hart, J., Spirman, U., Shattach, J. (1984)
An outbreak of amoebic infection in a kibbutz population
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 346-348
- 67 Horen W. P. (1981)
Modification of Schaudinn`s fixative
J. Clin. Microbiol. 13, 204-205
- 68 Horstmann, R. D. (1994)
Entamöbiose, 53-65
in: Röllinghof, M., Rommel, M.: Immunologische und molekulare Parasitologie;
Gustav Fischer, Stuttgart, Jena
- 69 Hossain, M. M., Ljungstrom, I., Glass, R. I., Lundin, L., Stoll, B. J., Huldt, G.
(1983)
Amoebiasis and giardiasis in Bangladesh: parasitological and serological studies
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 552-554
- 70 Irusen, E. M., Jackson, T. F. H. G., Simjee, A. E. (1992)
Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *Entamoeba histolytica* in
amebic liver abscess: prevalence, response to therapy, and pathogenic potential
Clin. Infect. Dis. 14, 889-893
- 71 Jackson, T. F. H. G., Gathiram, V., Simjee, A. E. (1985)
Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba
histolytica*
Lancet i, 716-718
- 72 Jetter, A. (1998)
Entamoeba histolytica und *Entamoeba dispar* im Südosten der Türkei: Eine
epidemiologische Studie
Med. Dissertation, Universität Tübingen

- 73 Jones, W. R. (1946)
The experimental infection of rates with *Entamoeba histolytica* with a method for evaluating the antiamebic properties of new compounds
Ann. Trop. Med. Parasitol. 40, 130-140
- 74 Katzenstein, D., Rickerson, V., Braude, A. (1982)
New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego
Medicine (Baltimore) 61, 237-246
- 75 Knobloch, J., Mannweiler, E., Höfler, W., Kern, P. (1982)
Efficiency of serodiagnosis in Amebiasis. Results obtained by four different tests in 13458 Persons with varying exposure
Tropenmed. Parasitol. 33, 107-110
- 76 Knobloch, J., Mannweiler, E. (1983)
Development and persistence of antibodies of *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess: Analysis of 216 cases
Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 727-732
- 77 Knobloch, J., Delgado, E. (1985)
Immunodiagnosis of Cysticercosis: standardization of ELISA and its application to field conditions
Trop. Med. Parasitol. 36, 157-159
- 78 Knobloch, J.; Burchard, G. D., Horstmann, R. D. (1996)
Amöbiasis, 27-43
in: Knobloch, J.: Tropen- und Reisemedizin, Gustav-Fischer, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm
- 79 Koch, R. (1887)
Bericht über die Tätigkeit der zur Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission
Arbeiten a. d. k. Gesundheitsamte 3, 63-78
- 80 Kretschmer, R. R. (1990)
Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*
CRC Press, Boca, Raton
- 81 Krogstad, D. J. (1988)
Amoebiasis, 739-743
in: Laboratory diagnosis of infectious diseases
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
- 82 de Lalla, F., Rinaldi, E., Santoro, D., Nicolin, R., Tramarin, A. (1992)
Outbreak of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* infections in travellers returning from tropics
Infection 20, 78-82
- 83 Lösch, F. (1875)
Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm
Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 65, 196-211

- 84 Lorenz, R. J. (1996)
Grundbegriffe der Biometrie
4. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- 85 Lotter, H., Mannweiler, E., Schreiber, M., Tannich, E. (1992)
Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*
J. Clin. Microbiol. 30, 3163-3167
- 86 Lotter, H., Mannweiler, E., Tannich, E. (1993)
Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive amebiasis
Trop. Med. Parasitol. 44, 277-280
- 87 Lotter, H., Jackson, T. F. H. G., Tannich, E. (1995)
Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis
Trop. Med. Parasitol. 46, 180-182
- 88 Manjula, M. A. M., Habibullah, C. M. (1986)
Seroepidemiology of *E. histolytica* infection in Hyderabad
Trop. Gastroenterol. 7, 173-177
- 89 Martínez-García, M. C., Castro, J. M., Armenta, M., Muñoz, O., Gutiérrez, G. (1986)
Características del absceso hepático amibiano en un hospital rural del altiplano mexicano
Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Suppl. 1), 335-339
- 90 Martínez-García, M. C., Muñoz O., Garduño. Rodriguez, G., Sanchez-Pares, M. E., Valadez-Salazar, A., Palacios- Beristain, O-l. Calderon- Segura, M. (1990)
Pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* in a rural area of Mexico. Concordance with serology
Arch. Invest. Méd. (Méx.) 21 (Suppl. 1), 147-152
- 91 Mathur, T. N., Kauer, J. (1973)
The Frequency of Excretion of Cysts of *Entamoeba histolytica* in Known Cases of Non-dysenteric Amoebic Colitis Based on 21 Stool Examinations
Indian J. Med. Res. 61, 330-334
- 92 Mirelman, D., Bracha, R., Wexler, A., Chayen, A. (1986a)
Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization.
Infect. Immun. 54, 827-832
- 93 Mirelman, D., Bracha, R., Chayen, A., Aust, K. A., & Diamond, L. S. (1986b)
Entamoeba histolytica effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme pattern and virulence
Exp. Parasitol. 62, 142-148

- 94 Musgrave, W. E., Clegg, M. T. (1905)
Amebas: Their cultivation and etiological significans
J. Infect. Dis. 2, 334-350
- 95 Nanda, R., Baveja, U., Anand, B. S. (1984)
Entamoeba histolytica cyst passers: clinical features and outcome in untreated subjects
Lancet i, 301-303
- 96 Nnochiri, E. (1965)
Observations on childhood amoebiasis in urban family units in Nigeria
J. Trop. Med. Hyg. 68, 231-236
- 97 Noble, E. R., Noble, G. A. (1976)
The Biology of Animal Parasites
5. Aufl., Lea & Febiger, Philadelphia
- 98 Omar, M. S., Mahfouz, A. A. R., Moneim, M. A. (1995)
The relationship of water sources and other determinants to prevalence of intestinal protozoal infections in a rural community of Saudi Arabia
J. Community Health 20, 433-440
- 99 Ortner, S., Clark, C. G., Binder, M., Scheiner, O., Wiedermann, G.,
Duchêne, M. (1997)
Molecular biology of the hexokinase isoenzyme pattern that distinguishes pathogenic *Entamoeba histolytica* from nonpathogenic *Entamoeba dispar*
Mol. Biochem. Parasitol. 86, 85-94
- 100 Osisanya, J. O. S. (1985)
Antibody repose of patients harbouring different zymodemes of *Entamoeba histolytica* to homologous and heterologous antigens
J. Trop. Med. Hyg. 88, 235-241
- 101 Osisanya, J. O. S. (1991)
A study of serum antibody levels against *Entamoeba histolytica* in patients with different amoebic zymodemes
West Afr. J. Med. 10, 181-186
- 102 Oyerinde, J. P., Ogunbi, O., Alonge, A. A. (1977)
Age and sex distribution of infections with *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* in the Lagos population
Int. J. Epidemiol. 6, 231-234
- 103 Petri, W. A. Jr. (1993)
Reply
J. Infect. Dis. 168, 514-515
- 104 Petri, W. A. Jr., Singh, U., Ravdin, J. I. (2001)
Enteric Amebiasis, 321-328
in: Guerrant, R. L., Walker, D. H., Weller, P. F.: Essentials of Tropical Infectious Diseases;
Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia

- 105 Pickel, A. (1994)
Vergleich dreier Methoden zur Differenzierung von pathogenen und apathogenen *Entamoeba histolytica*
Med. Dissertation, Universität Tübingen, 1994
- 106 Piekarski, G. (1987)
Medizinische Parasitologie in Tafeln;
3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 107 Póvoa, M. M., Arruda, J. E., Silva, M. C., Bichara, C. N., Esteves, P., Gabbay, Y. B., Machado, R. L. (2000)
Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coproscópicos e imunológicos em amostra da população da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil
Cad. Saude Publica, 16, 843-846
- 108 Proctor, E. M., Wong, Q., Yang, J., Keystone, J. S. (1987)
The electrophoretic isoenzym patterns of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in two major cities in Canada
Am. J. Trop. Med. Hyg. 37, 296-301
- 109 Quincke, H., Roos, E. (1893)
Ueber Amöben-Enteritis
Berl. Klin. Wochenschr. 30, 1089-1094
- 110 Rajeswari, B., Sinniah, B., Hussein, H. (1994)
Socio-economic factors associated with intestinal parasites among children living in Gombak, Malaysia
Asia-Pacific J. Public Health 7, 21-25
- 111 Ramos, F., Valdez, E., Morán, P., González, E., Padilla, G., Gómez, A., Ramiro, M., Melendro, E. I., Muñoz, O., Clark, C. G. (2000)
Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a Highly Endemic Rural Population
Arch. Med. Res. 31, 34-35
- 112 Ravdin J. I., Jackson, T. F. H. G., Petri, W. A. Jr., Murphy, C. F., Ungar, B. L. P., Gathiram, V., Skilogiannis, J., Simjee, A. E. (1990)
Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*
J. Infect. Dis. 162, 768-772
- 113 Ravdin, J. I. (1994)
Diagnosis of invasive amoebiasis—time to end the morphology era
Gut 35, 1018-1021
- 114 Ravdin, J. I. (1995)
Amebiasis
Clin. Infect. Dis. 20, 1453-1466
- 115 Reed, S. L. (1992)
Amebiasis: An update

- Clin. Infect. Dis. 14, 385-393
- 116 Rivera, W. L., Tachibana, H., Silva-Tahat, M. R. A., Uemura, H., Kanbara, H. (1996)
Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines
Parasitol. Res. 82, 585-589
- 117 Rivera, W. L., Tachibana, H., Kanbara, H. (1998)
Field study of the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction
Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 916-921
- 118 Robinson, G. L. (1968)
The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285-294
- 119 Romero, J. L., Descoteaux, S., Reed, S., Orozco, E., Santos, J., Samuelson, J. (1992)
Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples
Arch. Med. Res. 23, 277-279
- 120 Sachs, L. (1997)
Angewandte Statistik
8. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 121 Sahara, K., Hori, W., Masuda, T., Ohata, K., Yamazaki, F., Akahane, S., Hattori, H., Yuasa, H., Hashizume, I., Tanaka, Y., Nagakura, K., Tachibana, H. (1996)
Invasive amebiasis at an institution for the mentally retarded in Shizuoka Prefecture
Kansenshogaku. Zasshi. 70, 1-6
- 122 Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Erlich, H. A. (1988)
Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes
New Engl. J. Med. 319, 537-541
- 123 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning. A laboratory manual;
2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 124 Samuelson, J., Acuña-Soto, R., Reed, S., Biagi, F., Wirth, D (1989)
DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*
J. Clin. Microbiol. 27, 671-676
- 125 Sapero, J. J., Lawless, D. K. (1953)
The „MIF“ stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa
Am. J. Trop. Med. Hyg. 2, 613-619

- 126 Sargeant, P. G., Williams, J. E., Grene, J. D. (1978a)
The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 519-521
- 127 Sargeant, P. G., Williams, J. E. (1978b)
Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 164-166
- 128 Sargeant, P. G., Williams, J. E., Jackson, T. F., Simjee, A. E. (1982)
A zymodeme study of *Entamoeba histolytica* in a group of South African schoolchildren
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 401-402
- 129 Sargeant, P. G. (1992)
A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahé, The Seychelles
Arch. Med. Res. 23, 265-267
- 130 Schaudinn, F. (1903)
Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Phizopoden. (Vorläufige Mitteilung.)
Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte 19, 547-576
- 131 Simic, T. (1931a)
Présence de l'*Entamoeba dispar* Brumpt dans le sud de la Yougoslavie (Macédoine Serbe).
Ann. Parasitol. Hum. Compar. 9, 289-302
- 132 Simic, T. (1931b)
Infection expérimentale de l'homme par *Entamoeba dispar* Brumpt.
Ann. Parasitol. Hum. Compar. 9, 385-391
- 133 Simic, T. (1931c)
Étude expérimentale complémentaire de l'*Entamoeba dispar* Brumpt, de Skopje, sur le chant.
Ann. Parasitol. Hum. Compar. 9, 497-502
- 134 Spencer, F. M. Monroe, L. S. (1968)
The Color Atlas of Intestinal Parasites
in: Spencer, F. M., Monroe, L. S.: The Color Atlas of Intestinal Parasites
3. Aufl., Charles C Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A.
- 135 Spencer, H. C., Muchnick, C., Sexton, D. J., Dodson, P., Walls, K. W. (1977)
Endemic amebiasis in an extended family
Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 628-635
- 136 Spice, W. M., Ackers, J. P. (1992)
The amoeba enigma
Parasitology Today 8, 402-406

- 137 Strecker, W., Friedrich, I. M., Kunz, R., Kombila, P., Loembe, P. M. (1991)
Diagnostic echographique de l'absces hepathique
Méd. Tropicale. 51, 459-466
- 138 Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M., Ihara, S. (1991)
Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction
J. Infect. Dis. 164, 825-826
- 139 Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J., Arnold, H. H. (1989)
Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5118-5122
- 140 Tannich, E., Burchard, G. D. (1991)
Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro
J. Clin. Microbiol. 29, 250-255
- 141 Tannich, E., Leippe, M., Horstmann, R. D. (1992)
Aktuelle Befunde zur Pathogenität von *Entamoeba histolytica*
Immun. Infekt. 29, 145-150
- 142 Tellez-Sierra, A., Cortez Ruiz, L., Aust Kettis, A., Huld, G., Jonsson, J., Schröder, H. (1992)
Amebiasis in Nicaragua: class specific serum antibody responses
Arch. Med. Res. 23, 261-264
- 143 Than-Saw, Mar-Mar-Nyein., Oo-M. M., Tin-Tin-Aye., Myint-Lwin., Win, K. M., Naing, K. M. Kaneda, Y., Tanak, T. (1992)
Isolation of *Entamoeba histolytica* from arthritic knee joint
Trop. Geogr. Med. 44, 355-358
- 144 Utzinger, J., N'Goran, E. K., Marti, H. P., Tanner, M., Lengeler, C. (1999)
Intestinal amoebiasis, giardiasis and geohelminthiasis: their association with other intestinal parasites and reported intestinal Symptoms
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93 137-141
- 145 Walderich, B., Weber, A., Knobloch, J. (1997)
Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic areas
Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 70-74
- 146 Walker, E. L., Sellards, A. W. (1913)
Experimental entamoebic dysentery
Philippine J. Sci B. Tropical Medicine 8, 253-330
- 147 Walsh, J. A. (1986)
Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality
Rev. Infect. Dis. 8, 228-238

- 148 Wanke, C., Buttler, T., Islam, M. (1988)
Epidemiologic and clinical features of invasive amebiasis in Bangladesh: a case-control comparison with other diarrheal diseases and postmortem findings
Am. J. Trop. Med. Hyg. 38, 335-341
- 149 Weber, G., Mohr, W., Fleischer, K., Sargeant, P. G. (1990)
Entamoeba histolytica infections in flight personnel of an international airline
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 803-805
- 150 Weinke, Th., Friedrich-Jänicke, B., Janitschke, K. (1988)
Bedeutung von *Entamoeba histolytica* bei Tropenrückkehrern
Dtsch. Med. Wochenschr. 113, 678-682
- 151 WHO (1997)
WHO, PAHO, UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis
Sonderdruck WHO, Genève, Suisse
- 152 Zindrou, S., Orozco, E., Linder, E., Téllez, A., Björkman, A. (2001)
Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR
Acta Trop. 78, 117-125

8. Lebenslauf

Am 27.06.1969 wurde ich, Stefan Schindler, als Sohn des Forstdirektors Dr. Christoph Schindler und der Krankenschwester und Hebamme Fr. Wanda Schindler, geb. Rivinius in Waldbröl in Nordrhein-Westfalen geboren. Nach der Einschulung 1976 besuchte ich die Waldorfschule in Pforzheim bis zum Abitur 1989.

Von August 1989 bis Oktober 1990 leistete ich meinen Zivildienst in der Krankenpflege der urologischen Station der Freien Universität Witten /Herdecke ab. Anschließend betreute ich eine Verwandte im Haushalt bis ich im Oktober 1991 das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität /Tübingen aufnahm. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich in Tübingen im August 1993, das erste Staatsexamen im August 1994. Zwei allgemein internistische Famulaturen leistete ich in Deutschland ab, in Bretten (3/93) und später in Tübingen (3/96). Weitere Famulaturen absolvierte ich in der Kinderchirurgie Kiryat Hadassah in Jerusalem /Israel (5/95) und in der Kardiologie in Dniepropetrovsk der Ukraine (9/95). Das zweite Staatsexamen legte ich im September 1997 in Tübingen ab.

Während meines praktischen Jahres lernte ich für vier Monate Kinderheilkunde bei Prof. Dr. Götze und zwei Monate Unfallchirurgie und Gefäßchirurgie bei Dr. Kinner und Dr. Schwielden in Esslingen. Es folgte das Allgemeinchirurgietertial für zwei Monate bei Dr. Hreno an der McGill Universität /Montreal in Kanada und anschließend ging ich für den letzten Teil meines praktischen Jahres zu Prof. Dr. Nicholson, Dr. Evelyn und Dr. Corben an die University of the West Indies nach Barbados um drei Monate Gastroenterologie, Kardiologie und Nephrologie zu erlernen. Im November 1998 legte ich in Esslingen mein drittes Staatsexamen ab.

Bis August 1999 widmete ich mich der Niederschrift der vorliegenden Arbeit und nahm dann im Oktober 1999 in der Kinderchirurgie am Klinikum Nürnberg-Süd eine Stelle als Arzt im Praktikum bei Fr. Dr. Leriche an. Von Dezember 2000 bis September 2001 war ich als Arzt im Praktikum und anschließend als Assistenzarzt in der Praxisklinik Dr. G. Spahn in Eisenach tätig. Von Oktober 2001 bis September widmete ich mich erneut der Überarbeitung meiner Doktorarbeit. Seit Oktober 2002 arbeite ich als Assistenzarzt in der Chirurgie des Kreiskrankenhauses Sigmaringen.