

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Vorkommen und
zur anthelminthischen Suszeptibilität
von gastrointestinalen Nematoden bei Menschen
und Schweinen in Ruanda**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kira Marie-Christine Fraundorfer
Tierärztin aus Bad Ischl

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4203

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Vorkommen und zur anthelminthischen
Suszeptibilität von gastrointestinalen Nematoden bei Menschen und Schweinen in
Ruanda**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freie Universität Berlin

vorgelegt von

Kira Marie-Christine Fraundorfer

Tierärztin

aus Bad Ischl

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4203

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter: PD Dr. Anton Aebischer
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Karsten Nöckler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, school children, animal parasitic nematodes, Ascaris suum, Trichuris suis,
faeces, fecal examination, epidemiology, albendazole, polymerase chain reaction,
DNA cloning, rwanda

Tag der Promotion: 30.07.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-058-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
2. Literatur.....	4
2.1. Der Stamm Nematoden	4
2.1.1 <i>Ascaris</i> sp.....	4
2.1.2 <i>Trichuris trichiura</i>	6
2.1.3 Hakenwürmer	6
2.2 Wirkstoffgruppe Benzimidazole.....	7
2.3 Entwicklungen in der Veterinärmedizin	8
2.4 Zu Resistenzen in der Humanmedizin.....	12
2.4.1 „Soil- transmitted helminths“	12
2.4.2 Koproskopische Methoden in der Humanmedizin	14
2.4.3 Zur Anwendung von Anthelminthika in der Humanmedizin	16
2.4.4 Hinweise auf Anthelminthika-Resistenz in der Humanmedizin.....	17
2.4.5 Molekularbiologische Hinweise auf Resistenzen bei humanen gastrointestinalen Nematoden.....	20
2.4.6 Entwicklungen in Ruanda	22
2.4.7 <i>Ascaris lumbricoides</i> versus <i>Ascaris suum</i>	24
3. Material und Methoden.....	27
3.1. Material.....	27
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Ethik	33
3.2.2 Humane Proben	33
3.2.2.1 Probensammlung.....	33
3.2.2.2 Probenkonservierung	34

3.2.2.3 Parasitologische Untersuchung der Proben	34
3.2.2.4 Statistische Auswertung der Prävalenzen, der Eizahlreduktion und der “Cure rate“	35
3.2.2.5 Prozessierung der Rückstellproben.....	35
3.2.2.6 Transport nach Deutschland	36
3.2.3 Schweineproben.....	36
3.2.3.1 Probensammlung.....	36
3.2.3.2 Probenkonservierung	36
3.2.3.3 Probenuntersuchung.....	36
3.2.3.4 Aufbereitung der Parasiteneier.....	36
3.2.3.5 Transport nach Deutschland	37
3.2.4 Molekularbiologische Analysen.....	37
3.2.4.1 DNA- Isolation.....	37
3.2.4.2 Primer Entwicklung für Polymerase-Ketten-Reaktionen der untersuchten genomischen Sequenzen des β -Tubulins	37
3.2.4.3 Polymerase-Ketten–Reaktion zur Amplifikation der untersuchten β -Tubulin Sequenzen	37
3.2.4.4 Gelelektrophorese.....	38
3.2.4.5 Aufreinigung für Klonierung.....	39
3.2.4.6 Klonierung.....	39
3.2.4.7 Aufreinigung von PCR Produkten zur direkten Sequenzierung	40
3.2.4.8 Sequenzierung.....	40
3.2.4.9 Analyse mittels BioEdit Software.....	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Parasitologische Kotuntersuchungsverfahren 2014	42
4.1.1 <i>Ascaris</i> spezies	42
4.1.2 <i>Trichuris trichiura</i>	46
4.1.3 Hakenwürmer.....	47
4.1.4 Statistischer Vergleich zwischen städtischem und ländlichem Gebiet.....	49

4.1.5 Schweineproben.....	50
4.1.6 Prävalenzvergleich interspezifisch.....	52
4.2 Parasitologische Kotuntersuchungsverfahren 2015	54
4.3.1. Identifizierung putativer „SNPs“ in den Codons 167, 198 und 200	56
4.3.2. Tabellen aller untersuchten SNPs	57
5. Diskussion.....	59
5.1 Prävalenzen.....	59
5.2 Quantitative Daten der parasitologisch untersuchten Stuhlproben	65
5.3 Wirksamkeiten von Anthelminthika.....	66
5.3.1 Untersuchungsmethoden.....	72
5.4 Molekularbiologische Untersuchungen.....	74
5.5 Zu den Ergebnissen der Schweineproben.....	75
5.6 Konklusion	76
6. Zusammenfassung.....	78
7. Summary.....	80
8. Literaturverzeichnis	82
Anhang.....	IX
Publikationen.....	XIV
Danksagung	XV
Selbstständigkeitserklärung.....	XVI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer mit Gradienten- PCR- Konditionen und angewandten Konzentrationen	28
Tabelle 2: Primer mit optimalen Annealingtemperaturen, PCR- Konditionen und Fragmentgrößen.....	30
Tabelle 3: Prävalenzen von <i>Ascaris</i> sp. vor und nach Entwurmung, Konfidenintervall.....	42
Tabelle 4: FECRs mit zugehörigen Konfidenzintervall aller Kinder, die vor ODER nach Entwurmung positiv für <i>Ascaris</i> sp. waren.	44
Tabelle 5: FECRs für <i>Ascaris</i> sp. OHNE Kinder, die vor Entwurmung negativ waren, Konfidenzintervall und Cure rates.....	45
Tabelle 6: Prävalenzen von <i>T. trichiura</i> vor und nach Entwurmung, Konfidenzintervalle (KI).	46
Tabelle 7: Prävalenzen der Hakenwürmer vor und nach Entwurmung, Konfidenzintervalle. .	47
Tabelle 8: FECRs unter Einbeziehung aller vor ODER nach Entwurmung positiven Individuen, dazugehöriges Konfidenzintervall und Cure Rate.....	48
Tabelle 9: Berechnung der FECRs OHNE Einbeziehung vorher negativer Individuen und zugehörige KI.....	49
Tabelle 10: Prävalenz der Spezies von städtischem und ländlichem Gebiet VOR Entwurmung, angegeben in Prozent, dazugehörige KI und p-Werte.	50
Tabelle 11: Prävalenz der Spezies von städtischem und ländlichem Gebiet NACH Entwurmung, angegeben in Prozent, dazugehörige KI und p- Werte.....	50
Tabelle 12: Prävalenzen der einzelnen Wurmspezies in Schweinen mit 95 % KI.	51
Tabelle 13: Mittlere Prävalenzen der Spezies.....	52
Tabelle 14: Prävalenzen und Konfidenzintervalle (KI) für <i>A. sp.</i>	55
Tabelle 15: FECRs, Konfidenzintervalle und CRs für <i>Ascaris</i> sp. unter Einbeziehung aller vor ODER nach Entwurmung positiven Kinder.	55
Tabelle 16: FECRs aller Schulen OHNE Berücksichtigung der vorher negativen Individuen, dazugehörige KI und CR.	56
Tabelle 17: Darstellung der Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Korrelation zum Vorkommen von <i>Ascaris</i> sp. bei Mensch und Schwein.....	53
Abbildung 2: Korrelation zum Vorkommen von <i>Trichuris</i> sp. bei Mensch und Schwein, Korrelationskoeffizient und p- Wert.....	53
Abbildung 3: Korrelation zum Vorkommen von MDS bei Mensch und Schwein, Korrelationskoeffizient und p-Wert.....	54
Abbildung 4: Chromatogramm von P378a, Analyse mittels Zielsequenzen von Asutbb-1.2. Der relevante SNP ist in Fettdruck dargestellt.	57

Abkürzungsverzeichnis

Mikroliter	µl
Mikrometer	µm
<i>Ascaris</i> β-Tubulin 1	Asutbb1
<i>Ascaris</i> β-Tubulin 1.2	Asutbb1.2
<i>Ascaris</i> β-Tubulin 2	Asutbb2
<i>Ascaris</i> β-Tubulin 4	Asutbb4
Basenpaare	bp
Benzimidazol	BZ
Community Health Worker	CHW
Zentimeter	cm
Kubikzentimeter	cm ³
Cure rate	CR
disability adjusted life years	DALY
Diethylpyrocarbonat	DEPC
Desoxyribonukleosidtriphosphaete	dNTPs
Ethylendiamintetraacetat	EDTA
Egg hatch test	EHT
eggs per Gram	epG
Egg reduction rate	ERR
Faecal egg count reduction	FECR
faecal egg count reduction test	FECRT
Guanosintriphosphat	GTP
Wasser	H ₂ O
Hydrochlorid	HCl
Immunglobulin-E	IgE

Abkürzungsverzeichnis

Immunglobulin-G	IgG
Kilobase	kb
Konfidenzintervall	KI
Dritte Larve	L 3
Erste Larve	L1
Larval developement assay	LDA
Mother and Child Health Week	MCHW
mass drug administration	MDA
Rwandan Ministry of Health	MoH
Nikotin- Acetylcholin- Rezeptor	nAChR
Natriumchlorid	NaCl
Nested	NES
Neglected tropical diseases	NTD
Polymerase Chain Reaction	PCR
P- Glykoproteine	Pgp
rounds per minute	rpm
Single Nucleotid Polymorphism	SNP
Soil transmitted helminth	STH
Unit	U
World Association for advancement of veterinary parasitology	WAAVP
World Health Organisation	WHO

1. Einleitung

Geohelminthen oder “Soil transmitted helminths”, kurz STHs, verursachen eine Gruppe der am weitest verbreiteten, vernachlässigten Tropenkrankheiten “Neglected Tropical Diseases” (NTDs) der Welt. Vor allem in den Tropen und Subtropen sind weltweit circa 1,2 Milliarden Menschen vom Befall mit *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* oder *Necator americanus* betroffen (Albonico, Engels et al. 2004, Bethony, Brooker et al. 2006, Vercruyse, Levecke et al. 2012, Campbell, Nery et al. 2016, Rees, Hotez et al. 2019).

Die Übertragung der Geohelminthen erfolgt vorwiegend oral beziehungsweise durch Schmierinfektion, im Fall der Hakenwürmer aber auch perkutan (Wenk P., Renz A. 2003). Bei *A. lumbricoides* scheidet der infizierte Mensch Eier aus, in denen sich nach einer Entwicklungszeit von zwei bis sechs Wochen das infektiöse dritte Larvenstadium (L3) befindet. Die Eier kontaminieren die Umgebung und die Erde, Lebensmittel und Wasser und werden auf Grund des mangelhaften bis nicht vorhandenen Hygienestandards oral aufgenommen. Hohe Eizahlen im Kot der Infizierten erklären sich durch immer wiederkehrende Reinfektion aus der kontaminierten Umgebung und sehr hohe Eiausscheidung der Weibchen, denn der Wurm selbst vermehrt sich im Körper nicht (Wenk P., Renz A. 2003). Aus den Eiern des Peitschenwurms *T. trichiura* entwickelt sich im Ei das infektiöse erste Larvenstadium (L1). Die Eier, die das infektiöse Larvenstadium enthalten, kontaminieren dann die Umgebung, Erde, Lebensmittel und Wasser und werden oral aufgenommen. Bei den Hakenwürmern *A. duodenale* und *N. americanus* schlüpft die L1 aus dem Ei, entwickelt sich im Freien über zwei Häutungen zur bescheideten, infektiösen L3, dem für den Menschen infektiösen Stadium. Die L3 dringt entweder durch Penetration der Haut oder gelegentlich oral, in seltenen Fällen auch über die Muttermilch, in den menschlichen Körper ein. Insbesondere die Penetration durch die Haut ist vor allem für Kinder eine große Gefahrenquelle, da diese in vielen der betroffenen Ländern meist barfuß laufen (Wenk P., Renz A. 2003).

Auch wenn Infektionen mit Geohelminthen selten tödlich verlaufen, ist die Wirkung auf den Körper bei schwerem Wurmbefall insbesondere bei Kindern enorm (Wenk P., Renz A. 2003, Bethony, Brooker et al. 2006). *Ascaris* sp. wandert aus dem Dünndarm über den Blutstrom bis ins Lungengewebe, wo er Pneumonien und allergische Reaktionen hervorrufen kann. Die adulten Würmer im Darm können in hoher Anzahl zu einem Ileus führen, zusätzlich behindern sie die Nährstoffaufnahme. Die adulten *T. trichiura* setzen sich am Übergang zwischen Dün- und Dickdarm in der Schleimhaut fest und ernähren sich vom Inhalt der Darmschleimhautzellen und saugen Blut. Bei hohem Befall kann es zu Durchfall, Blutungen und sogar zu Rektumprolapsen kommen. Die infektiöse Larve der Hakenwürmer, meist über die Haut eingetreten, wandert wiederum über die Lunge in den Darm, wo sie aus den

Darmzotten Blut saugt. Dies führt durch den Blutverlust zu Anämie und die Zerstörung der Zotten kann sehr starke Schmerzen hervorrufen. Die Larven einiger anderer Hakenwurmart, deren Endwirt nicht der Mensch ist, können bei Kindern und Erwachsenen auch das Krankheitsbild der „*Larva migrans cutanea*“ hervorrufen. Die Larve verbleibt in der Haut und hinterlässt Bohrgänge, die oft mit bloßem Auge sichtbar sind und lokal starke, allergische, entzündliche Reaktionen hervorrufen können (Wenk P., Renz A. 2003).

Der Blutverlust führt zu erniedrigten Hämoglobinwerten und Eisenunterversorgung. Durchfall und durch die Parasiten entstehende Schäden an der Darmschleimhaut führen zu mangelnder Nährstoffaufnahme. Das physische Wachstum betroffener Kinder ist beeinträchtigt und führt in weiterer Folge auch zum Zurückbleiben der psychischen Entwicklung (Wenk P., Renz A. 2003).

Das Vorgehen der Gesundheitsorganisationen, die sich in den meisten der betroffenen Ländern dem Kampf gegen einige der NTDs verschrieben haben, ist die Massenentwurmung in Kombination mit Gesundheits- und Hygienemaßnahmen (Ruxin and Negin 2012, Anderson, Truscott et al. 2013, Campbell, Nery et al. 2016). Einerseits zur Bildung und Erziehung der Menschen, andererseits um einen gewissen Grundstandard zu schaffen. Die Planung und Durchführung dieser Kampagnen und Programme unterliegt den Gesundheitsministerien der jeweiligen Länder.

In der Veterinärmedizin ist schon seit längerem bekannt, dass regelmäßiges Entwurmen zu Resistenzbildung führt (Wolstenholme, Fairweather et al. 2004, Demeler, Van Zeveren et al. 2009, Morrison, Mitchell et al. 2014). Auch hier finden im Sinne der Herdengesundheit oft Massenentwurmungen mit Benzimidazolen in regelmäßigen Abständen statt. Die tatsächliche Verwurmung des einzelnen Individuums (etwa gemessen in Eier pro Gramm Kot) wird dabei so gut wie nie berücksichtigt. Heute weiß man, dass diese Form der Behandlung zur Selektion resistenter Wurmpopulationen führt (von Samson-Himmelstjerna, Walsh et al. 2009).

Zur Untersuchung von Stuhlproben auf Parasiteneier werden in der Humanmedizin die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) als nicht quantitatives Verfahren und das Kato- Katz-Verfahren, die Mc Master Zählkammer und das seit 2013 verwendete Mini-FLOTAC Verfahren als quantitative Verfahren, verwendet (Barda, Ianniello et al. 2013, Barda, Zepherine et al. 2013, Barda, Rinaldi et al. 2013, Barda, Cajal et al. 2014, Barda, Ianniello et al. 2014). In der Veterinärmedizin verwendet man zur quantitativen Bestimmung von Kotproben mittels Flotation die McMaster Zählkammer, das FLOTAC oder das Mini-FLOTAC Verfahren. In der Praxis wird auch je nach zu erwartender Spezies eine einfache Sedimentation oder Flotation angesetzt.

Auch in der Humanmedizin drängt sich mittlerweile die Frage nach Resistenzbildungen bei parasitischen Nematoden auf. Die Parallelen zur Veterinärmedizin sind unbestreitbar vorhanden (Prichard 2007, Prichard, von Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Demeler, Kruger et al. 2013). Molekularbiologisch assoziiert man das Vorhandensein gewisser Single Nucleotide Polymorphisms („SNPs“) am β -Tubulin Isotyp 1 Gen mit Resistenzen bei Strongyliden: der Austausch von Thymin zu Adenin an Codon Position 167 oder 200 und von Adenin zu Cytosin an Position 198. Bei *A. lumbricoides* konnte bisher nur das Vorhandensein des mit Benzimidazol (BZ)- Resistenz assoziierten SNPs am Codon 200 des β -Tubulin Isotyp 1 nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die untersuchten Würmer keine verminderte Sensitivität auf Albendazol (Horton 2000, Prichard 2001, Bennett, Anderson et al. 2002, Albonico, Wright et al. 2004, Schwab, Boakye et al. 2005, Eng, Blackhall et al. 2006).

Ziel des Projektes MOPACUR war es, in einem endemischen Gebiet, in dem auch schon seit 2008 regelmäßig entwurmt wird, die Wirksamkeit der angewandten Anthelminthika zu überprüfen und die mögliche Entwicklung resistenter Wurmpopulationen zunächst durch parasitologische Untersuchungen aufzuzeigen und mittels molekularbiologischer Untersuchungen zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden in den weiterführenden Untersuchungen Position 167, 198 und 200 des β -Tubulins vier der fünf Isotypen von *Ascaris* sp. analysiert. Außerdem sollte durch die zusätzliche parasitologische Untersuchung von Schweinekotproben analysiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Infektionen mit *Ascaris* sp. bei Mensch und Tier gibt.

2. Literatur

2.1. Der Stamm Nematoden

Nematode ist die Bezeichnung für Fadenwürmer, die eine einförmige Körpergestalt aufweisen, da sie ein ausschließlich hydrostatisches Skelett besitzen (Wenk P., Renz A. 2003). Diese Flüssigkeitssäule wirkt gegen eine flexible, aber wenig dehnbare Körperhülle. Genau wie die Arthropoden machen sie während ihrer Jugendentwicklung mehrere hormonell gesteuerte Häutungen durch, jedoch erhärtet sich ihre Kutikula nie vollständig. Nematoden besiedeln beinahe alle Lebensräume und sie gehören mit etwa 30.000 Spezies zu den artenreichsten Klassen im Tierreich (Wenk P., Renz A. 2003).

2.1.1 *Ascaris* sp.

Ascaris lumbricoides, auch bekannt als der Spulwurm des Menschen, gehört zur Klasse Nematoda, Ordnung Ascaridida, Überfamilie Ascaridoidea, Familie Ascarididae, Unterfamilie

Ascaridinae

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6231&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>). Er wird vom Wirt mit der Nahrung aufgenommen (Wenk P., Renz A. 2003). Die L3 schlüpfen aus den embryonierten Eiern, die sich im Freien entwickelt haben, im Magen und Dünndarm. Sie gelangen in Folge der Peristaltik bis ins Kolon, von wo aus sie durch die Darmwand in die Pfortader wandern und in die Leber gespült werden, wo sie eine Wanderung durch das Leberparenchym machen. Im Anschluss gelangen sie als L4 etwa eine Woche nach der Infektion des Wirtes über die Vena cava caudalis in das rechte Herz und in die Lunge. In der Lunge bohren sie sich durch die Alveolen und gelangen über die Bronchien und die Luftröhre wieder in den Magen-Darm-Trakt. Im Duodenum häuten sie sich schließlich zum juvenilen Wurm, der zum Adulten heranwächst. Die Präpatenz von *A. lumbricoides*, also die Zeit von der peroralen Aufnahme bis zur Ausscheidung der ersten Eier durch den Wirt, dauert im Durchschnitt unter idealen Bedingungen circa 35 Tage. In der Regel kommt es bei den meisten Wirten zu Superinfestationen (Deplazes, Eckert et al. 2013).

Die Askariose bei Mensch und Schwein gehört zu den am häufigsten per os übertragenen Helminthen-Infestationen der Welt (Deplazes, Eckert et al. 2013).

Die allgemeine Symptomatik, wie Durchfall und Inappetenz, beruht auf der toxischen Wirkung der Stoffwechselprodukte adulter Würmer. Zusätzlich kann es durch Wanderung der Larven zu Lungenaffektionen kommen, die sich in Husten äußern. Bei extrem hoher Wurmbürde kann

es durch Obstruktion beziehungsweise Verstopfung des Darmes auch zu Todesfällen kommen (Wenk P., Renz A. 2003).

In holoendemischen Gebieten steigt die Prävalenz nach dem Kleinkindalter rapide an und erreicht ihren Höhepunkt bei den Sechs- bis Zehnjährigen, beziehungsweise 11- bis 15-Jährigen mit 14 beziehungsweise 15 Prozent. Danach fällt sie wieder auf 3 bis 5 Prozent (Wenk P., Renz A. 2003). Für den Abfall der Prävalenz macht man die hohe Produktion von IgG und IgE, hohe Eosinophilie und Anhäufung von Mastzellen im Darm verantwortlich, die eine protektive Antwort des Immunsystems darstellen. Bei Superinfestationen kommt es dann auch zur Abtötung aller migrierenden Larven und juvenilen Stadien, denn grundsätzlich erreicht *Ascaris* sp. bei mittlerer Wurmbürde und 80% Prävalenz ein konstantes Maximum von circa 30 Würmern. In manchen Fällen kann *Ascaris* sp. aber auch eine überdisperse (negativ-binominal) Verteilung haben. Das bedeutet, dass es mitunter zu tödlichen Wurmbürden kommen kann, dies ist aber nur sehr selten der Fall (Wenk P., Renz A. 2003).

Ascaris suum ist der Erreger der Ascariose beim Schwein, die als eine der häufigsten Parasiteninfektionen in der Veterinärmedizin gilt und von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Die Weibchen von *A. suum* werden bis zu 30 cm lang und 3- 5 mm dick, morphologisch lassen sie sich kaum von *A. lumbricoides* unterscheiden (Deplazes, Eckert et al. 2013). *A. suum* kommt weltweit unter allen Haltungsbedingungen vor. Man vermutet schon länger, dass Ascariose eine Zoonose ist, tatsächlich gibt es auch einige bestätigte Fälle in Europa, bei denen das Schwein das Reservoir war (Betson, Nejsum et al. 2014).

Ascaris sp. ist ein Parasit von epidemiologischer Bedeutung, da er eine hohe Reproduktionsrate, eine langsame exogene Entwicklung und eine sehr hohe Tenazität der Eier aufweist. Das Weibchen von *Ascaris* sp. kann täglich über 200.000 Eier produzieren. Unter 15 °C sistiert die Entwicklung, das Ei bleibt aber überlebensfähig. Auch unter sonnigen, trockenen Bedingungen überleben infektiöse Eier immer noch zwei bis vier Wochen. Wenn der Boden feucht ist, kann es vorkommen, dass Eier bis zu fünf Jahre infektiös bleiben. Unter diesen Voraussetzungen kann man nicht von Saisonalität sprechen, höchstens unter Stallbedingungen sagt man, dass die stärksten Expositionen im Herbst und Winter passieren (Deplazes, Eckert et al. 2013).

Für die Übertragung hat das Ei mit seiner mukopolysacchariden Hülle ideale Eigenschaften. Die Eier haften an Haut, Kleidung und in der Umgebung und werden dementsprechend auch leicht verschleppt. Die Symptome sind mit Durchfall, verminderter Fresslust und Körpergewichtsabnahme relativ unspezifisch. Pathologisch bilden sich sogenannte „milk spots“ in der Leber, die bei der Schlachtung von Nutztieren auffallen. Hierbei handelt es sich

um Granulome und Bindegewebsherde, die sich im Leberparenchym um die Larven herum als Reaktion auf Gewebsnekrosen bilden (Deplazes, Eckert et al. 2013).

In der Veterinärmedizin werden zur Therapie und Bekämpfung Levamisol, Pyrantelverbindungen, Benzimidazole oder makrozyklische Laktone eingesetzt. Hierbei weisen makrozyklische Laktone und einige BZ larvizide Wirkung auf. Entwurmt wird peroral durch Gabe eines Bolus über das Futter oder parenteral, letzteres meistens an mehreren Tagen hintereinander. Diese Strategie fördert eine gleichmäßigere Aufnahme des Wirkstoffes und verbessert bei den BZ ihre Wirksamkeit gegen wandernde Larven. Die ganzheitliche Bekämpfung zielt zusätzlich darauf, durch Hygienebestimmungen die Durchsetzung diverser Hygienemaßnahmen und die Aufrechterhaltung eines hohen Hygienestands zu gewährleisten (Deplazes, Eckert et al. 2013).

2.1.2 *Trichuris trichiura*

Die L1 des Peitschenwurmes schlüpfen aus den oral aufgenommenen Eiern und wandern in die Darmzotten oder Villi ein. Der Vorderkörper der L1 bohrt sich durch die Epithelzellen der Mukosa des Caecum und des Colon und verbringt in der Schleimhaut eine etwa ein bis zwei Wochen dauernde histotrophe Phase. Durch das Mundstilet sondert der Wurm histolytische Sekrete in die umliegenden Wirtszellen ab. Diese verflüssigen das Plasma und dieses sowie Blut können oral aufgenommen werden (Wenk P., Renz A. 2003). In der weiteren Entwicklung häutet sich die Larve viermal und die Adulten besiedeln anschließend den Dickdarm.

Stärkerer Befall mit Peitschenwürmern führt in seltenen Fällen zu einer subakuten, katarrhalischen Entzündung der Darmwand. Massiver Befall äußert sich in einer hämorrhagischen Entzündung, die pathologisch durch Blutbeimengung des Darminhaltes gekennzeichnet ist. Klinisch führt die hämorrhagische Entzündung zu Hypoalbuminämie und Anämie, da über den durchlässig gewordenen Darm sowohl Proteine als auch Blut verloren gehen (Deplazes, Eckert et al. 2013).

2.1.3 Hakenwürmer

Die darmbewohnenden Hakenwürmer des Menschen sind *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus* (Wenk P., Renz A. 2003). Der Eintrittsweg der Hakenwürmer ist die intakte Haut oder die orale Aufnahme. Die L3 penetriert die Haut und gelangt mit der Gewebelymphe in den regionalen Lymphknoten. Sie durchbohrt diesen und wandert über den

Ductus thoracicus in die Vena cava, das rechte Herz sowie die Lunge und Trachea und besiedelt schließlich den Darm.

Die ein bis zwei cm langen Hakenwürmer besiedeln den Dünndarm und je nach Gattung das Duodenum, das Jejunum oder das Ileum. In ihrer Bukkalhöhle befinden sich Chitinzähne, mit denen sie die Zotten oder Blutgefäße anschneiden. Sie ernähren sich von Darmgewebe und dem Blut, das durch den Wechsel der Anheftungsstelle abfließt (Wenk P., Renz A. 2003).

Die Eier der Hakenwürmer werden mit dem Kot ausgeschieden. Außerhalb des Wirtes schlüpfen die L1 und entwickeln sich unter Aufnahme von Bakterien im Kot zur L2. Aus der L2 entwickelt sich die L3, die dann aktiv durch das feuchte Erdreich wandert, um an die Erdoberfläche zu gelangen. Hier kann es zu Infektionen durch direkten Hautkontakt kommen, wenn der Wirt zum Beispiel seinen Defäkationsplatz aufsucht (Wenk P., Renz A. 2003). Für diese Entwicklung ist ein feuchtes Mikroklima Voraussetzung. Es eignen sich schattige Stellen trockener Regionen genauso gut wie Gebiete, in denen es ausgeprägte Regen- und Trockenzeiten gibt. Der Blutverlust bei *A. duodenale* ist 0,1- 0,2 ml, bei *N. americanus* 0,02-0,03 ml pro Wurm und Tag. Das entspricht bei 2000 Individuen einer Anzahl, die in Endemiegebieten leicht erreicht wird, einem Blutverlust von 300 beziehungsweise 50 ml pro Tag. Die Hauptsymptomatik ist daher eine Anämie (van den Broek 1996, van den Broek 1998, Wenk P., Renz A. 2003, Mpairwe, Tweyongyere et al. 2014).

2.2 Wirkstoffgruppe Benzimidazole

Mebendazol und Albendazol sind BZ-Derivate, die beim Menschen in der Chemotherapie gegen Bandwürmer, Hakenwürmer, Peitschenwürmer, Spulwürmer, Trichinen und Madenwürmer eingesetzt werden (Aktories et al. 2013).

Ihre pharmakologische Wirkung beruht auf der Bindung an das β -Tubulin und somit der Hemmung der Polymerisation der Mikrotubuli. Dies hat gravierende Folgen für die Struktur des Zytoskeletts, den zellulären Stofftransport sowie den Stoffwechsel der Wurmzellen. In der Folge kommt es zur Hemmung der Glukoseaufnahme und dem Verbrauch der Glykogenreserven. Hierdurch wird der Verdauungstrakt irreversibel geschädigt und der Wurm stirbt ab (Aktories et al. 2013).

Empfohlen wird die Aufnahme der BZ-Derivate mit fettreicher Nahrung per os (p.o.), da sie eine mäßige gastrointestinale Resorption aufweisen. Außerdem haben sie einen hohen „First pass“-Metabolismus in der Leber, der allerdings durch zusätzliche Gabe von Praziquantel oder Cimetidin verzögert werden kann. Die Ausscheidung erfolgt über die Galle (Aktories et al. 2013).

Als Therapie gegen Ascariose empfiehlt sich die Gabe von 100 mg Mebendazol p. o. morgens und abends an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Aktories et al. 2013).

Albendazol, in der Dosierung von 400 mg zweimal täglich, hat stärkere Nebenwirkungen, wird aber in den Tropen und Subtropen eher zur Therapie eingesetzt, weil es ein breiteres anthelminthisches Wirkspektrum besitzt (Lüllmann et al. 2016).

2.3 Entwicklungen in der Veterinärmedizin

Die Behandlung gegen Würmer wird in der Veterinärmedizin in manchen Gegenden der Welt schon seit über einem halben Jahrhundert praktiziert (Morrison, Mitchell et al. 2014). Haus- und Nutztiere werden zur Bekämpfung von Zoonosen, klinischen Erkrankungen oder verminderter Leistung, ausgelöst durch parasitische Nematoden, entwurmt (Whittaker, Carlson et al. 2016). Es gibt momentan nur eine begrenzte Anzahl an Anthelminthika, auf die zurückgegriffen werden kann und gegen diese, so weiß man, entwickeln sich mehr und mehr resistente Wurmpopulationen in den Nutztierbeständen der ganzen Welt (Kaplan 2004). Vor allem Würmer der Familie Strongylida sind nachweislich von dieser Entwicklung betroffen (May, Brugemann et al. 2017).

Gastrointestinale Nematoden sind bei Haus- und Nutztieren die am häufigsten vorkommenden parasitischen Nematoden und verursachen vor allem in Gegenden, in denen intensiv Viehwirtschaft betrieben wird, spürbare wirtschaftliche Verluste (Demeler, Van Zeveren et al. 2009, Kaplan and Vidyashankar 2012, Vande Velde, Charlier et al. 2018, Squire, Robertson et al. 2019). Hier werden und wurden vor allem Strongyloidea und Trichostrongyloidea dem anthelminthischen Selektionsdruck ausgesetzt. Im Feld verwendet man zur Detektion dieser Resistenzen den Eizahlreduktionstest, auch „Faecal egg count reduction test“ (FECRT), eine quantifizierende Methode, die darauf beruht, Eizahlreduktionen in Prozentzahlen anzugeben und an Hand bestimmter Schwellen für die gewissen Spezies einen Abfall in Sensitivität gegen die angewandten Chemotherapeutika zu ermitteln (McKenna 1990, Grimshaw, Hunt et al. 1994, Cabaret and Berrag 2004, Daniel, van Dijk et al. 2010, Vercruysse, Albonico et al. 2011, De Graef, Sarre et al. 2012). Andere Erkennungsmaßnahmen sind die in vitro im Labor durchgeführten Tests wie zum Beispiel der Eischlupfhemmtest, auch „egg hatch test“ (EHT) und der Larvenentwicklungshemmtest, auch „larval development assay“ (LDA). Diese Untersuchungen sind jedoch sehr arbeitsaufwendig und setzen ein spezielles Wissen voraus, weshalb sie in der Klinik selten angewendet werden (Craven, Bjorn et al. 1999, Konigova, Varady et al. 2003). Die Notwendigkeit für Tests, die in der Praxis schnell und unkompliziert durchführbar sind, wächst. Zusätzlich zur Erkennung von Resistenzmechanismen erhofft man

sich durch Aufschlüsselung der zur Resistenzentwicklung beitragenden Faktoren die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Methoden zur gezielteren Bekämpfung der Parasiten, um Resistenzselektion zu vermeiden und die Ausbreitung resistenter Populationen zu vermindern beziehungsweise zu verhindern.

In der Veterinärmedizin arbeitet man bei der Bekämpfung parasitischer Nematoden hauptsächlich mit drei Wirkstoffklassen: Makrozyklische Laktone, Nikotin- Agonisten und BZ (Coles, Jackson et al. 2006).

Makrozyklische Laktone sind die mit am weitesten verbreiteten und verwendeten Breitspektrum- Anthelminthika der Welt. Ivermectin wird meistens bei Nutztieren sowohl zur Bekämpfung von Endo- als auch Ektoparasiten eingesetzt und ist der einzige Wirkstoff aus dieser Stoffklasse, der auch beim Menschen zugelassen ist. Makrozyklische Laktone sind Agonisten der Liganden- gesteuerten Ionenkanäle, hauptsächlich wirken sie an den Glutamat- gesteuerten Chlorid- Kanälen. Die molekularbiologischen Mechanismen, die der Resistenz zu Grunde liegen, sind noch nicht ausreichend erforscht. Ein möglicher Resistenzmechanismus scheint die strukturelle Veränderung der Ionenkanäle zu sein (Prichard 2007, Beech, Levitt et al. 2010). Zusätzlich gibt es aber ein ausgeklügeltes Efflux- System, durch welches Toxine aller Art effizient aus dem Wurm abtransportiert werden können. Es wurde beobachtet, dass auch die Hochregulation gewisser P-Glykoproteine (Pgp), die eine große Rolle in diesem System spielen, mit Resistenz in Verbindung gebracht werden kann (Kerboeuf, Blackhall et al. 2003).

Die Agonisten der nikotinergen- Acetylcholin- Rezeptoren (nAChR), die in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommen, Levamisol und Pyrantel, wirken an Nikotin- und Acetylcholin- gesteuerten Kationen- Kanälen, die man an neuromuskulären Synapsen in Nematoden findet (Kotze, Hunt et al. 2014). Dort führen sie zu einer dauernden Aktivierung dieser Kanäle und damit zu dauerhafter Depolarisation des neuromuskulären Systems und somit zur spastischen Paralyse. Die Paralyse hindert den Wurm an der Aufrechterhaltung seiner lebenserhaltenden Funktionen und entweder verendet er oder wird vom Wirt ausgeschieden. Die reduzierte Expression und die Expression dysfunktionaler Untereinheiten senken hier die Sensitivität des Wurmes gegenüber dem Medikament und sind mögliche Mechanismen der sich entwickelnden Resistenzen (Prichard 2001, Martin, Verma et al. 2005, Charvet, Guegnard et al. 2018, Santos, Vasconcelos et al. 2019).

BZ sind ebenfalls Breitband-Anthelminthika, die in der Veterinärmedizin sehr häufig eingesetzt werden. Die ersten Resistenzen gegen BZ wurden schon im Jahr 1964, kurz nach der erstmaligen Markteinführung von Thiabendazol im Jahre 1960, bekannt (Conway 1964, Lacey and Prichard 1986). Anfang der neunziger Jahre wurde das erste Mal beschrieben, dass die

Variation eines Basenpaares, „Single Nucleotid Polymorphism“ (SNP), in bestimmten Abschnitten des Genoms, genauer am β -Tubulin, zu Resistenzen führt (Kwa, Veenstra et al. 1993, Elard and Humbert 1999, Prichard 2001, Silvestre and Cabaret 2002, Ghisi, Kaminsky et al. 2007). Die Änderung des Codes einzelner Basen führt an Codonposition 200 und 167 zur Änderung von Phenylalanin zu Tyrosin und an Codonposition 198 zur Änderung von Glutaminsäure zu Alanin.

In gastrointestinalen Nematoden ist die Strukturveränderung des Isotyp 1 Gens des β -Tubulins weithin anerkannt als der Hauptmechanismus der Resistenz gegen diese Stoffklasse. Durch Änderungen in der Nukleotidsequenz ändern sich die Aminosäureabfolge und so vermutlich auch die dreidimensionale Struktur des β -Tubulins. BZ binden deshalb an das β -Tubulin des Parasiten, weil es durch seine ursprüngliche Proteinstruktur sehr hohe Affinität aufweist. Verändert sich diese Proteinstruktur, so sinken die Affinität und damit auch die Bindungswahrscheinlichkeit von BZ an das β -Tubulin (Lacey and Prichard 1986, Lubega and Prichard 1991, Lacey and Gill 1994).

Obwohl es Studien gibt, die darauf hindeuten, dass das Isotyp 2 Gen des β -Tubulins ebenfalls an der Bildung von Resistenzen beteiligt sein könnte, gibt es bis dato sehr wenige Daten, die diese Aussage unterstützen (Kwa, Veenstra et al. 1994, Prichard 2001, Saunders, Wasmuth et al. 2013).

Infektionen mit parasitischen Nematoden spielen in der Veterinärmedizin eine gewichtige Rolle. Ökonomisch gesehen sind sie besonders in der Nutztiermedizin von großer Bedeutung, da sie über kurz oder lang auch großen Einfluss auf die Produktivität der Tiere und somit auf die Landwirtschaft haben. Die Resistenz gegen BZ ist die am weitesten verbreitete, vor allem bei Parasiten von Pferden, Schafen und Ziegen. Kühe und Schweine scheinen weit weniger betroffen zu sein (Jackson and Coop 2000, Kaplan 2004, Ghisi, Kaminsky et al. 2007, Demeler, Van Zeveren et al. 2009, Furtado, de Paiva Bello et al. 2016). Aufgabe der Tierärzte muss es daher in Zukunft sein, eine genaue Überwachung infektionsgefährdeter Populationen durchzuführen, Entwicklungen in Richtung Resistenz zu überwachen und gezielt zu entwurmen. Hierzu wird es weiterhin wichtig sein, die molekularbiologischen Mechanismen, die zu Resistenzen führen, zu beobachten und zu erforschen. Auch muss daran gearbeitet werden, einfache Werkzeuge zur Diagnose von Resistenzen zu entwickeln und einer breiteren Masse zugänglich zu machen.

Die Prävalenz der Resistenz liegt bei Schafen, Ziegen und Pferden weltweit innerhalb kommerziell geführter Betriebe oft bei über 50 % (Geerts and Gryseels 2000).

Es ist bekannt, dass die Geschwindigkeit, mit der sich Resistenzen entwickeln, auch von der Frequenz der Resistenzallele in der ursprünglich unbehandelten Population abhängt (Prichard 2001). Aber nicht nur die Häufigkeit von Allelen, Anzahl der Gene, sondern auch Ihre Dominanz oder Rezessivität spielen eine Rolle bei der Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung (Prichard 2001).

Resistenz wird gefördert durch zu hohe, beziehungsweise intensive Behandlungsfrequenz, Zeitpunkt und Unterdosierung des Medikamentes. Je öfter Anwendungen stattfinden, desto schneller werden resistente Würmer in der Population selektiert (Prichard 2001, Leathwick and Luo 2017).

In der Veterinärmedizin kommen unterschiedlichste Behandlungsschemata zur Anwendung. Die Zielgruppe der Anwendung ist hierbei ein nicht zu unterschätzender Punkt, da die Proportion der Population, die dem Medikament nicht ausgesetzt wird, auch nicht auf Resistenz selektiert wird. In der Humanmedizin, in der meistens Schulkinder entwurmt werden, liegt die Anzahl der infizierten Individuen, die durch die Behandlung tatsächlich erreicht werden, im Gegensatz zur Veterinärmedizin (100%), meistens nur bei ungefähr 80%, manchmal sogar darunter. Beim Timing spielt das Klima und die für den Parasiten vorliegenden Bedingungen in den Reservoirs außerhalb des Wirtes eine Rolle. Findet der resistente Allel tragende Parasit außerhalb seines Wirtes Bedingungen zum Überleben vor, kann er sein Resistenzgen weitervererben. Zum Schluss bleibt noch die Unterdosierung als hoher Risikofaktor. Die bedenklichste Dosis ist jene, die alle suszeptiblen, homozygoten Individuen tötet, aber Würmer mit heterozygot vorhandenen Resistenzallelen überleben lässt, da sich diese weitervererben (Prichard 2001).

Die „World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology“ (W.A.A.V.P.) hat genaue Richtlinien festgelegt, nach denen Resistenzen bei Nutztieren beurteilt werden können. Ein Medikament gegen Nematoden, Trematoden oder Cestoden wird an Hand der „Faecal Egg Count Reduction“ (FECR) als hoch effektiv (über 98 % Wirksamkeit), effektiv (90-98 %), moderat effektiv (80- 89 %) oder insuffizient (weniger als 80 % Wirksamkeit) eingestuft (Coles, Bauer et al. 1992, Wood, Amaral et al. 1995). Neuere Studien zeigen, dass eine Vielzahl an Faktoren die FECRT beeinflussen kann und somit bei der Einschätzung, ob ein Medikament effektiv oder nicht effektiv ist, berücksichtigt werden sollten. Entscheidend sind Probenzahl, eine Mindestanzahl an ausgezählten Eiern pro Probe, Aggregation der Eier im Kot, der mittlere FEC vor Entwurmung und die „true drug efficacy“ (TDE). Je nach vorhandener Probenzahl sollte man eine bestimmte Zahl an Eiern in der Probe auszählen und Wirksamkeitsschwellen anpassen, da es sonst zu verfälschten Ergebnissen kommen kann (Levecke, Dobson et al. 2012, Levecke, Kaplan et al. 2018).

2.4 Zu Resistenzen in der Humanmedizin

2.4.1 „Soil- transmitted helminths“

Geohelminthen oder „Soil- transmitted helminths“ (STHs) zählen immer noch zu den wichtigsten NTDs. Weltweit sind über eine Milliarde Menschen einfach oder multipel von dem Befall mit *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus* oder *A. duodenale* betroffen (Bethony, Brooker et al. 2006, Feasey, Wansbrough-Jones et al. 2010, Utzinger, Becker et al. 2012, Campbell, Nery et al. 2016). Die Auswirkungen von Krankheiten auf den Menschen können in „Disability Adjusted Life Years“ (DALY) angegeben werden. DALY sind eine Einheit, die entwickelt wurde um darzustellen, wie viele Jahre guter Lebensqualität der Mensch aufgrund der Beeinträchtigung durch bestimmte Krankheiten einbüßt (Murray, Lopez et al. 1994, Murray, Vos et al. 2012). Die DALY setzen sich zusammen aus den „Years of life lost“ (YLL) und den „Years lived with disability“ (YLD). Anhand dieser Messwerte kann man nicht nur den Einfluss der STHs angeben, die Auswirkungen vieler anderer Krankheiten und Umwelteinflüsse werden so eingestuft (Murray, Vos et al. 2012). NTDs exklusive Malaria machen weltweit etwa ein Prozent an „Disability Adjusted Life Years“ (DALY) aus, dennoch sind die Auswirkungen in Risikopopulationen nicht unerheblich.

Die meisten Infektionen mit STHs verlaufen selten tödlich, aber ihr Einfluss auf erkrankte Individuen und die daraus resultierenden Einbußen sollten quantifizierbar sein (Murray, Vos et al. 2012).

Da das Klima und vor allem auch die Hygiene für die Übertragung der Krankheit eine entscheidende Rolle spielt, ist die Infektion mit STHs vorrangig in den Tropen und Subtropen zu finden (Jex, Lim et al. 2011, Davis, Worrell et al. 2014, Kaminsky, Ault et al. 2014, Levecke, Montresor et al. 2014, Staudacher, Heimer et al. 2014, Shumbej, Belay et al. 2015, Siza, Kaatano et al. 2015, Alemu, Tegegne et al. 2016, Speich, Moser et al. 2016).

In Entwicklungsländern sind vor allem Kinder infiziert und leiden an den Folgeerscheinungen. Diese beinhalten Anämie, zurückgebliebenes Wachstum, reduzierte körperliche Fitness und Unaufmerksamkeit bis zu Fernbleiben von der Schule. Todesfälle sind jedoch äußerst selten (Martins-Melo, Ramos et al. 2017).

Die Epidemiologie bei der Infektion durch Würmer unterscheidet sich von anderen Infektionskrankheiten, da keine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch stattfindet. Adulte Würmer haben eine begrenzte Lebenszeit und die Wurbürde des einzelnen Individuums spielt eine große Rolle. In endemischen Gebieten kann es vorkommen, dass 15-30 % der

Population 70 % der Wurmbürde trägt (Bethony, Brooker et al. 2006). Die Fragen zu Immunitätsmechanismen, die hier möglicherweise eine Rolle spielen, sind noch unzureichend geklärt.

Die „World Health Organisation“ (WHO) verwendet Prävalenz und Intensität der Eiausscheidung, gemessen in „eggs per Gram“ (epg, Eier pro Gramm Kot), um die Infektionsintensität und die Gefahr einer Transmission in den endemischen Gebieten als hoch, mittel oder niedrig einzustufen (Feasey, Wansbrough-Jones et al. 2010). Die Einteilung mittels epg erfolgt in leicht, moderat und schwer. Bei *A. lumbricoides* spricht ein epg von eins bis 4.999 für einen leichten Befall, ein epg von 5.000- 49.999 für eine moderate Infektion und ein epg über 50.000 für das Vorliegen einer schweren Infektion. Bei *T. trichiura* spricht man bei einem epg von eins bis 999 epg von einer leichten Infektion, bei einem epg von 1.000- 9.999 von einer moderaten Infektion und ein epg ab 10.000 gilt als schwerer Befall. Bei den Hakenwürmern liegt bei einem epg von eins bis 1.999 eine leichte Infektion vor, ein epg von 2.000- 3.999 gilt als moderat und ab 4.000 epg spricht man von einer schweren Infektion (Comitee 2002).

Die Infektion mit allen vier Spezies *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus* und *A. duodenale* ist insbesondere bei Kindern in Entwicklungsländern nicht ungewöhnlich und kommt dort auch meist chronisch vor (Bethony, Brooker et al. 2006). Die Infektion mit STHs stellt auf der Welt wohl eines der größten Hindernisse für den Zugang zu uneingeschränktem physischem und intellektuellem Wachstum, vor allem der Armen, dar. Die Ignoranz der Öffentlichkeit gegenüber diesem Problem erklärt sich wahrscheinlich daraus, dass es erstens vorrangig die Ärmsten der Armen betrifft, zweitens Infektionen meist chronisch verlaufen und somit klinisch oft unauffällig sind und drittens der Einfluss auf Ökonomie und Sozioökonomie schleichend und dadurch schwer einschätzbar ist.

Nichtsdestotrotz ist mittlerweile unbestritten, dass die hohe Wurmbürde in vielen Ländern Auswirkungen sowohl auf die Gesundheit als auch die Bildung der Menschen hat und somit in letzter Instanz zu einem verminderten wirtschaftlichen Wachstum führt (Bethony, Brooker et al. 2006). Außerdem gibt auch die Frage, ob und in welcher Art und Weise der befallene Wirt anderen wichtigen Krankheiten gegenüber anfälliger wird, immer wieder Anlass zum Nachdenken (Fincham, Markus et al. 2003, Le Hesran, Akiana et al. 2004, Siff, Geus et al. 2016).

Für die Entwicklung und den Erhalt der Parasiten spielen neben dem Klima und anderen Umwelteinflüssen auch die Lebensbedingungen der Menschen eine große Rolle. In Entwicklungsländern, in denen es zusätzlich zur Armut auch noch unterentwickelte sanitäre Einrichtungen oft ohne fließendes Wasser gibt, Menschen auf engem Lebensraum

zusammenleben und Hygiene meist unzureichend praktiziert wird, beziehungsweise erst bei Heranwachsenden überhaupt eine Rolle spielt, ist die Prävalenz ungemein höher. Seit 1994 ist die Prävalenz in vielen süd- und mittelamerikanischen und asiatischen Ländern, die teilweise enorme Entwicklungsschübe, sowohl wirtschaftlich als auch soziologisch gemacht haben, drastisch gesunken. Im deutlichen Gegensatz dazu steht Afrika, hier hat sich an den Prävalenzen nahezu nichts verändert (de Silva, Brooker et al. 2003, Ngonjo, Okoyo et al. 2016, Tefera, Belay et al. 2017, M'Bondoukwe N, Kendjo et al. 2018).

Ascaris lumbricoides und *T. trichiura* kommen am häufigsten bei Kindern in der Altersgruppe von fünf bis 15 Jahren vor (Bethony, Brooker et al. 2006). Danach flauen die Intensitäten der Infektionen ab. Das könnte unter anderem damit zu tun haben, dass nicht alle Würmer in einem endemischen Gebiet die exakt gleiche Immunreaktion hervorrufen und sich unterschiedliche Arten von Immunitäten entwickeln (Galvani 2005, Dunn, Turner et al. 2016). Je älter der Mensch wird, desto mehr antigenen Varianten innerhalb einer Wurmpopulation war er ausgesetzt, desto breiter hat sich die Immunität ergo ausgebildet und er ist für die meisten Varianten nicht mehr anfällig. Zusätzlich könnten mit zunehmendem Alter höhere Hygienestandards eine Rolle spielen.

Bei den Hakenwürmern ändert sich die Infektionsintensität nicht, sie kann auch in fortgeschrittenem Alter sehr hoch sein (Bethony, Chen et al. 2002, Dunn, Turner et al. 2016). Dies stellt vor allem für schwangere Frauen einen enormen Risikofaktor dar. Durch den Blutverlust, den der Befall mit Hakenwürmern verursacht, kommt es zu teilweise drastischem Eisenmangel. Dieser führt zu Anämie und Mangelerscheinungen, die Entwicklung des Fötus ist verzögert. Dadurch kommt es zu vermindertem Geburtsgewicht des Säuglings, in schweren Fällen kommt es durch zusätzlich hohe Blutverluste bei der Geburt zum Tod der Mutter (van den Broek 1996, van den Broek 1998, Guidotti 2000).

2.4.2 Koproscopische Methoden in der Humanmedizin

Die gängigsten Methoden zur Untersuchung von humanen Stuhlproben sind der Ausstrich nach Kato- Katz, der direkte Ausstrich und die Formol- Ether- Konzentrationsmethode. Eine neuer entwickelte Methode ist das aus der FLOTAC- Methode entstandene Mini- FLOTAC Verfahren (Barda, Ianniello et al. 2013, Barda, Zepherine et al. 2013, Barda, Rinaldi et al. 2013, Barda, Cajal et al. 2014, Barda, Ianniello et al. 2014).

Die WHO empfiehlt die Untersuchung von humanen Stuhlproben mittels Kato- Katz, da diese Methode einfach anzuwenden ist und man, vor allem in unzureichend ausgestatteten Laboren, keine zusätzliche Ausrüstung braucht (Barda, Zepherine et al. 2013, Assefa, Crellen et al.

2014). Außerdem hat sich in klinischen Studien gezeigt, dass Mini- FLOTAC für die Untersuchung auf *A. lumbricoides* weniger sensitiv als ein einziger Ausstrich nach Kato- Katz ist. Dafür war Mini- FLOTAC für die Untersuchung auf *T. trichuris* etwas sensitiver als Kato- Katz. Bezüglich des Nachweises von Hakenwürmereiern fand man keine Unterschiede zwischen den zwei Untersuchungsmethoden. Alle diagnostischen Methoden, die in der Studie von Cools et al. (2019) untersucht wurden (Kato- Katz, Mini- FLOTAC, FEKPAK und quantitative PCR, kurz qPCR), weisen bei moderaten bis hohen STH- Infektionsintensitäten eine Sensitivität von über 90 % auf. Einzig für Infektionen mit niedriger Intensität war nur die qPCR sensitiver als der einzelne Ausstrich nach Kato- Katz (Cools, Vlaminck et al. 2019).

Mini- FLOTAC ist eine quantitative Flotationsmethode mit einer Sensitivität von fünf Eiern pro Gramm Kot oder epg. Als Flotationslösung eignen sich gesättigte Kochsalzlösung, Zinksulfatlösung, Natriumnitratlösung, Magnesiumsulfatlösung und Zuckerlösung, wobei nicht jede dieser Lösungen einfach in der Handhabung und zu entsorgen ist (Ballweber, Beugnet et al. 2014, Barda, Cajal et al. 2014).

Mini- FLOTAC birgt im Vergleich zu Kato- Katz den Vorteil, dass der Untersuchende keinen direkten Kontakt mit der Stuhlprobe hat und man auch vorher fixierte Proben Tage später untersuchen kann. Es ist auch in nicht optimal ausgestatteten Laboren gut anwendbar, da im Gegensatz zu FLOTAC keine Zentrifugation notwendig ist und die zur Flotation verwendete gesättigte Kochsalzlösung auch unter einfachsten Bedingungen hergestellt und entsorgt werden kann (Cringoli, Rinaldi et al. 2013).

Im direkten Vergleich hat sich Mini- FLOTAC als ebenso sensitiv wie Kato- Katz und sensitiver als McMaster zur Diagnose von parasitischen Nematoden des Menschen herausgestellt. In Bezug auf die durchschnittliche Untersuchungszeit pro Probe liegt Mini- FLOTAC mit dem kürzesten Zeitaufwand an der Spitze (Barda, Ianniello et al. 2013, Barda, Zepherine et al. 2013, Barda, Rinaldi et al. 2013, Barda, Cajal et al. 2014, Barda, Ianniello et al. 2014). Dennoch hängt die Sensitivität bei Flotationsmethoden auch von vielen anderen Faktoren ab. Das Probenhandling, ob und wie lange vorher zentrifugiert wird, was für ein Gefäß zur Zentrifugation verwendet wird, die verwendete Menge an Kot, ob Siebe als Zwischenschritt verwendet werden, der Zeitpunkt der Untersuchung nach Flotation und der Untersucher sind einige Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können (Ballweber, Beugnet et al. 2014).

Man weiß, dass die Präzision und die Sensitivität von Untersuchungsmethoden bei höherer Infektionsintensität genauer sind. Dies ist nur einer der Gründe, warum es dringend notwendig ist, einen Goldstandard für das Vorgehen zur Überwachung der Infektionsintensitäten verschiedener Populationen in endemischen Gebieten zu entwickeln (Montresor et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Standardisierung der Untersuchungsmethoden, jedoch

hängt diese auch von der Situation, der Zielpopulation und damit von dem zu generierenden Ergebnis ab (Ballweber, Beugnet et al. 2014).

2.4.3 Zur Anwendung von Anthelminthika in der Humanmedizin

Es gibt deutlichen Anlass, Strategien zur Bekämpfung und Eindämmung der bei Menschen durch Würmer hervorgerufenen Infektionen in betroffenen Ländern zu entwickeln. Die WHO stellte 2017 einen Katalog mit Empfehlungen vor, wie mit welchen Medikamenten gegen welche Wurmspezies vorgegangen werden sollte (http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sth/en/). Zusätzlich fordern sie die regelmäßige chemotherapeutische Behandlung von mindestens 75 % aller Schulkinder, die in betroffenen Ländern dem Risiko zu erkranken ausgesetzt sind. Außerdem soll sichergestellt werden, dass alle Menschen in endemischen Gebieten, hier vor allem Hochrisiko-Gruppen wie Schulkinder oder Schwangere, Zugang zu Anthelminthika haben (Torlesse and Hodges 2000, Imhoff-Kunsch and Briggs 2012, Mpairwe, Tweyongyere et al. 2014).

Die WHO spricht sich für die Behandlung von *A. lumbricoides*, *T. trichiura* und den Hakenwürmern mit entweder 400 mg Albendazol, 500 mg Mebendazol oder 2,5 mg/ kg Levamisol aus. Gegen *A. lumbricoides* und *T. trichiura* eignet sich zusätzlich Ivermectin in einer Dosierung von 200 µg/ kg und gegen *A. lumbricoides* und die Hakenwürmer kann man 10 mg/ kg Pyrantel einsetzen, bei starkem Hakenwurmbefall über eine Dauer von vier Tagen (http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sth/en/).

Da vorrangig Kinder von den Infektionen betroffen sind, liegt der Fokus in der Bekämpfung auf Entwurmungskampagnen, sogenannten „Mass drug administrations“ (MDAs), die in Schulen durchgeführt werden, beziehungsweise in Mutter- Kind- Gesundheitstagen eingebettet sind (Beaver 1961, Brooker, Singhasivanon et al. 2003, Kabatereine, Fleming et al. 2006, Hotez, Molyneux et al. 2007, Hotez 2009, Jex, Lim et al. 2011, Parker and Allen 2011, Tchuem Tchuente 2011, Ruxin and Negin 2012, Utzinger, Becker et al. 2012, Anderson, Truscott et al. 2013, Davis, Worrell et al. 2014, Kaminsky, Ault et al. 2014, Campbell, Nery et al. 2016).

Als Mittel der Wahl zur Entwurmung hat sich eine Einmaldosierung mit einem der beiden gängigen BZ Albendazol oder Mebendazol durchgesetzt (Vercruysse, Behnke et al. 2011, Levecke, Montresor et al. 2014). Albendazol ist auf Grund seiner hohen Absorptionsrate im Gastrointestinaltrakt und der Umwandlung in der Leber besser geeignet als Mebendazol, da es auch Stadien im Gewebe erreicht (Lacey 1990).

Das Ziel der regelmäßigen Entwurmung ist es die Morbidität zu verringern und die Mortalität zu verhindern, die komplette globale Eliminierung der gastrointestinalen Nematoden war das Langzeitziel bis zum Jahr 2020. Die Wurmbürde soll auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten werden, um chronische Infektionen zu verhindern und vor allem Hochrisikogruppen besser vor der Übertragung zu schützen (Albonico, Engels et al. 2004). Dazu rückt die Überwachung der Wirksamkeiten in den Programmen zur Elimination und Kontrolle in endemischen Ländern in den Vordergrund (Albonico, Levecke et al. 2015). Der Selektionsdruck bei regelmäßigen Massenanwendungen, wie sie in der Humanmedizin momentan noch Goldstandard sind, ist ein anderer als bei gezieltem Einsatz der Medikamente, wie er in der Veterinärmedizin mittlerweile deutlich gefordert wird. Denn es ist unumstritten, dass MDAs einen Selektionsdruck auf die Parasiten ausüben, der zu Resistenzen führen kann (Prichard, von Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Furtado, de Paiva Bello et al. 2016).

2.4.4 Hinweise auf Anthelminthika-Resistenz in der Humanmedizin

Die Entwicklung in der Veterinärmedizin in den letzten Jahrzehnten deutet darauf hin, dass auch in der Humanmedizin damit gerechnet werden muss, dass sich Resistenzen entwickeln beziehungsweise schon entwickelt haben. Dennoch ist der Beweis schwierig zu erbringen (Prichard 2007). Bei zwei unabhängigen Studien in Mali und in Zanzibar wurde von einem Scheitern beziehungsweise einer Ineffektivität der Behandlung mit Mebendazol berichtet. Bei beiden Studien gab es keine Folgestudie, um die Entwicklung zu verfolgen oder zu ergründen, ob die mangelnde Wirksamkeit in diesen Fällen vielleicht andere Ursachen gehabt haben könnte (De Clercq, Sacko et al. 1997, Albonico, Bickle et al. 2003).

Die Wirksamkeit von Anthelminthika zu überwachen und die Entwicklung von Resistenzen nachzuprüfen stellt sich beim Menschen ungleich schwieriger dar als beim Tier. Denn die Möglichkeit einen naiven Wirt mit den infektiösen Larven zu infizieren, ihn anschließend zu entwurmen und in einer Autopsie die tatsächliche Reduktion der Wurmbürde im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrolle zu überprüfen, gibt es nicht. Auch die in der Veterinärmedizin gängigen *in vitro*-Untersuchungsmethoden zu Resistenzen, wie der EHT, das LDA oder andere Motilitätsassays, haben sich bis jetzt noch nicht durchgesetzt, da sie für Trichostrongyloidea entwickelt wurden, deren Entwicklungszyklus sich von *Ascaris* sp. und *Trichuris* sp. unterscheidet (Prichard 2007). Allerdings entwickelten Tyden et al. (2016) einen *in ovo*-LDT für *Parascaris* spp., dessen erfolgreiche Adaptierung für *Ascaridia galli* gelang (Tyden, Skarin et al. 2016, Tarbiat, Jansson et al. 2017). Dies könnte die nötigen Weichen für zukünftige Entwicklungen derartiger Tests für *Ascaris* sp. stellen.

Da das Langzeitziel die komplette Eliminierung des Parasitenbefalls in endemischen Gebieten ist, wird es unbedingt notwendig sein, Entwicklungen in Richtung Resistenz im Auge zu behalten. Die Methode der Wahl zur Überwachung der Wirksamkeit ist der FECRT (Vercruyse, Albonico et al. 2011). Bis heute unterscheiden sich durchgeführte Studien zu diesem Thema oft in ihrem Design, der verwendeten Methodik, der Zeitspanne zwischen Entwurmung und Folgestudie, dem Ursprung des Medikamentes, der angewandten Statistik und vielen anderen Dingen und eine Verallgemeinerung der erhobenen Resultate ist nicht möglich.

Vercruyse et al. (2011) führten eine anthelminthische Wirksamkeitsuntersuchung in sieben Ländern, in denen STHs endemisch sind, durch. Untersucht wurden Schulkinder im Alter von vier bis 18 Jahren in den Ländern Brasilien, Kambodscha, Kamerun, Äthiopien, Tanzania und Vietnam. Das Studiendesign war in allen Ländern gleich, das heißt, es wurden die gleichen Altersgruppen gesammelt, Untersuchungsmethode für die Stuhlproben war die McMaster-Zählkammer, die für die Entwurmung verwendeten Albendazol-Tabletten waren von einem Hersteller und die Folgeuntersuchung fand stets zwischen 14 und 30 Tagen nach Behandlung statt. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf die FECR und die „Cure rate“ (CR) ausgewertet. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Sensitivitätsschwelle von Albendazol gegen *A. lumbricoides* bei über 95 % und bei Hakenwürmern bei über 90 % angesetzt werden sollte und bei allen Werten darunter von einer verminderten Wirksamkeit des Medikamentes auf die behandelte Wurmpopulation ausgegangen werden kann und somit die potenzielle Entwicklung einer Resistenz beobachtet wird (Vercruyse, Behnke et al. 2011). Zusätzlich sprechen sich die Autoren deutlich für die Angabe und Auswertung erhobener Ergebnisse in solchem Zusammenhang mittels der FECR aus. Die CR als Wert aus der Humanmedizin ist in solchen Fällen eher irreführend, da man nur jene Individuen erfasst, die von der Krankheit vollkommen genesen sind. Eine Infektion mit Würmern kann jedoch auch symptomlos verlaufen und ist daher nicht mit einer Krankheit gleichzusetzen. Der Nachweis von Resistenzen schlägt sich immer in einer verminderten Wirksamkeit gegen medikamentöse Behandlung nieder und Individuen, die eine verminderte Eizahl im Stuhl aufweisen, werden bei der CR nicht in die Auswertung miteinbezogen, da sie per definitionem nicht genesen sind. Zusätzlich hängt die CR von der Sensitivität der Untersuchungsmethode ab, die FECR aber kaum beziehungsweise gar nicht (Bennett and Guyatt 2000, Vercruyse, Albonico et al. 2011). Daher ist dieser Wert insbesondere für *T. trichiura*, bei dem eine einmalige Behandlung nachgewiesenermaßen kaum wirksam ist, nicht aussagekräftig (Vercruyse, Behnke et al. 2011).

Bei einer unter denselben Bedingungen durchgeführten Wirksamkeitsstudie zu Mebendazol konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass sich die Wirksamkeiten von Albendazol und

Mebendazol auf *A. lumbricoides* und Hakenwürmer kaum unterscheiden. Die Wirksamkeitsschwellen von 95 % bei *A. lumbricoides* und 90 % bei Hakenwürmern konnten bestätigt werden (Levecke, Montresor et al. 2014, Speich, Moser et al. 2016).

Albendazol und Mebendazol zeigen gute Wirksamkeiten gegen *A. lumbricoides* und Hakenwürmer, jedoch sind sie bei einmaliger Behandlung gegen *T. trichiura* unzureichend (Vercruysse, Behnke et al. 2011). Die Reinfektionsraten sind sowohl bei *A. lumbricoides* als auch bei *T. trichiura* hoch, bei letzterem aber auf Grund der unzureichenden Wirkung bei einmaliger Entwurmung unmöglich genau festzustellen. Da die Durchführung von MDAs nicht vorsieht an mehreren Tagen hintereinander zu entwurmen, versuchen neuere Ansätze Wirkstoffkombinationen zu testen, die auch bei einmaliger Anwendung Wirkung gegen *T. trichiura* haben (Albonico, Bickle et al. 2003, Keiser and Utzinger 2008, Speich, Moser et al. 2016, Moser, Schindler et al. 2017).

In einer von Speich et al. durchgeführten Studie (2013) auf Pemba Island, Tanzania, kamen mehrere Kombinationen von Medikamenten zur Anwendung und es zeigte sich, dass die Kombination aus Albendazol und Oxantel-Pamoate gegen *T. trichiura* bei der Nachuntersuchung nach 18 Wochen eine höhere CR zeigte als Mebendazol oder andere Kombinationen. Alle Kinder, die behandelt wurden, waren nachweislich positiv auf *T. trichiura*. Verglichen wurde die Wirkung von Mebendazol und den Kombinationen Albendazol-Mebendazol, Albendazol-Ivermectin und Albendazol-Oxantel-Pamoate. Bei 405 Kindern konnte der komplette Datensatz aller Untersuchungen dokumentiert werden. Die Kombination aus Albendazol-Oxantel-Pamoate zeigte hier die höchste Effizienz sowohl nach drei Wochen als auch in der Folgestudie 18 Wochen nach Behandlung (Speich, Moser et al. 2016). Zu diesem Zeitpunkt ergaben Untersuchungen eine CR für *T. trichiura* von 54 % und eine „Egg reduction rate“ (ERR), die der FECR in der Veterinärmedizin entspricht, von 98,6 % (Speich, Moser et al. 2016).

Zum Vergleich wurden in einer Metaanalyse Reinfektions-Prävalenzen für *T. trichiura* von 36 %, 67 % und 82 % nach drei, sechs und 12 Monaten dokumentiert (Jia, Melville et al. 2012).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Entwurmung mit Albendazol plus Oxantel-Pamoat zur deutlichen Verminderung moderater Infektionen beiträgt (Speich, Moser et al. 2016). Das ist bedeutend, denn weniger moderate Infektionen bedeuten ein Sinken der Morbidität, verminderte Kontamination der Umwelt und damit sinken des Infektionsdrucks.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass es bei allen Geohelminthen in den ersten drei Monaten nach der Entwurmung zu sofortiger Reinfektion kommen kann und die Infektionsintensität anschließend eine kontinuierliche Steigerung erfährt (Jia, Melville et al. 2012). Dies wiederum

ist ein deutlicher Hinweis, dass präventive Chemotherapie, um längerfristig bleibende Wirkung zu erzielen, regelmäßig stattfinden muss.

2.4.5 Molekularbiologische Hinweise auf Resistenzen bei humanen gastrointestinalen Nematoden

Im Falle von *A. lumbricoides* und *T. trichiura* wird beim Menschen empfohlen ein bis dreimal im Jahr zu entwurmen (Hotez 2009, Ruxin and Negin 2012, Anderson, Truscott et al. 2014). Im Falle der Anwendung des immer selben Medikamentes in nicht ausreichender Dosis könnten Behandlungen schlussendlich zu Resistenzen führen, wenn resistente Populationen überleben und so durch die Behandlung unwissend selektiert werden.

Jeder Wurm reagiert auf Grund einer gewissen genetischen Diversität unterschiedlich auf die Behandlung mit Anthelminthika. Die suszeptiblen Individuen werden durch die Behandlung eliminiert und können ihre Gene demnach nicht weitergeben, die Resistenten überleben (Prichard 2001).

Wenn man die Allele für Suszeptibilität und Resistenz identifiziert, kann man sie exprimieren und ihre Produkte, deren Funktionen und ihre Anfälligkeit Medikamenten gegenüber vergleichen. Gene, die in den Resistenzmechanismus involviert sind, müssen nicht zwangsweise in den Mechanismus der Wirkung des Anthelminthikums involviert sein. Gene, die Proteine kodieren, die in Transport und Metabolismus involviert sind, können gleichzeitig in Resistenz involviert sein, aber keine direkte Rolle im Wirkmechanismus des Medikamentes spielen (Prichard 2001).

Bei *H. contortus* korreliert die Resistenz gegen BZ mit der Selektion von Stämmen, die einen Polymorphismus am β - Tubulin Isotyp 1 Gen an Codon Position 200 aufweisen (Kwa, Veenstra et al. 1994). Der Austausch der Aminosäure, nahe der Guanosin triphosphat (GTP)- bindenden Domäne, hat eine Modulation der BZ- β - Tubulin- Interaktion zur Folge. In einem Experiment konnte gezeigt werden, dass das Resistenzallel an Codon Position 200 bei suszeptiblen Populationen in niedriger Frequenz vorlag und mehrere Selektionsrunden dazu führten, dass kaum mehr suszeptible Individuen übrig blieben und die Resistenten überwogen (Kwa, Veenstra et al. 1994).

In einer Studie in Zanzibar wurden die DNA- Sequenzen von menschlichen Hakenwürmern auf die bei resistenten *H. contortus* an Codon Position 200 vorkommende Mutation untersucht (Albonico, Wright et al. 2004). Die zur Beprobung herangezogenen Kinder waren nachweislich seit 1994 regelmäßig einmal im Jahr entwurmt worden. Es wurden 71 *N. americanus*-

Exemplare und ein *A. duodenale*- Exemplar der Kinder gewonnen, die DNA isoliert und anschließend die fraglichen DNA- Sequenzen untersucht. Der gesuchte SNP wurde bei keinem der untersuchten Würmer gefunden (Albonico, Wright et al. 2004).

Diawara et al. (2009) genotypisierten einige Exemplare von *A. lumbricoides* und *T. trichiura* vor der MDA mit Albendazol und Mebendazol, um zu untersuchen, ob in einer Population, die vermutlich noch nie mit einem Anthelminthikum in Berührung gekommen war, der SNP TTC/ TAC an Codon Position 200 vorhanden war. Bei *A. lumbricoides* konnte kein SNP gefunden werden, wohingegen der SNP bei *T. trichiura* am Isotyp 1 des β - Tubulins gefunden wurde (Diawara, Drake et al. 2009).

Eine andere Studie konnte hierzu den Beweis antreten, dass sich die TAT- Allelfrequenz an Codon Position 200 bei *T. trichiura* nach Behandlung mit Albendazol drastisch erhöht (Diawara, Halpenny et al. 2013). In Haiti von 3,1 % auf 55,3 % und in Kenia von 51,3 % auf 67,8 %. Da er, sowohl in Haiti als auch in Kenia, schon vor Beprobung gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das Allel für Resistenz hier schon vorher angelegt war, ob nativ oder durch vorangegangene Mutation lässt sich mutmaßen (Diawara, Halpenny et al. 2013).

Diawara et al. (2013) fanden aber nicht nur bei *T. trichiura* Bemerkenswertes, auch bei *A. lumbricoides* konnte an Codon Position 167 bei Isotyp 1 des β - Tubulins ein SNP gefunden werden. Sowohl bei Würmern aus behandelten als auch aus unbehandelten Kindern aus Haiti, Kenia und Panama war der SNP TTC/ TAC präsent. Die Wirksamkeit von Albendazol gegen *A. lumbricoides* blieb allerdings hoch, die ERRs lagen hier je nach Untersuchungsmethode zwischen 60 und 100 %. Die ERR von *T. trichiura* hingegen wies eine weitaus größere Schwankungsbreite auf. Je nach Untersuchungsmethode bewegte sich diese zwischen 10 und 100 %. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis, dass Benzimidazole generell keine ausreichend gute Wirksamkeit gegen *T. trichiura* aufweisen (Bennett and Guyatt 2000, Keiser and Utzinger 2008, Vercruyse, Behnke et al. 2011).

Die Isotypen des β -Tubulins werden bei allen Nematoden mit 1, 2 etc. durchnummeriert. Diese Isotypen, obgleich nach demselben Schema benannt, unterscheiden sich je nach Nematodenart. Die Forschung greift bei der Suche nach den gängigen mit Benzimidazol-assoziierten SNPs des β -Tubulins Isotyp 1 auf die bekannten aus der Veterinärmedizin zurück. Das ist ein guter Ansatz, allerdings sind alleine für *A. suum* drei eng verwandte Isotypen bekannt. Assays zur Überwachung von Resistenzmechanismen sollten sich genauer mit den Verwandtschaftsverhältnissen der β -Tubulin Gene der verschiedenen Nematoden auseinandersetzen und Nomenklaturen gegebenenfalls nochmal anpassen (Demeler, Kruger et al. 2013).

Die klassischen Überwachungsmethoden für Resistenzen, wie FECRT und CR, sind nicht mehr ausreichend, da sie zu ungenau sind und zu viel Interpretationsspielraum zulassen. Da Resistenzen eine genetische Basis haben und das Wissen über die DNA der Parasiten stetig wächst, sollte es in näherer Zukunft möglich sein, molekulare Marker zu entwickeln, die an Resistenzmechanismen gekoppelt sind und eine Identifizierung dieser zweifelsfrei ermöglichen (Prichard 2007, Prichard, von Samson-Himmelstjerna et al. 2007). Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse werfen aber auch die Frage nach der Entwicklung von Resistenzen in der veterinärmedizinischen und humanen Praxis und in der Viehwirtschaft auf. Auf der Suche nach Resistenzmechanismen fehlt immer noch das komplette Verständnis der Interaktion von Parasit und Anthelminthikum. Und auch die Frage, ob Abwehrmechanismen des Parasiten wie das P-Glykoprotein, das als Ausschleusesystem von Medikamenten gilt, oder das Cytochrom P 450 als entgiftendes Enzym eine Rolle spielen, ist nicht restlos geklärt. Denn möglicherweise liegen die Mechanismen der Resistenzentwicklungen genau an den Rezeptoren für das Anthelminthikum und Änderungen an diesen führen zu Resistenzen. Würde man diese Mechanismen kennen, so wäre es in der Zukunft möglich auch an der Entwicklung von Anthelminthika zu arbeiten, die diese Mechanismen umgehen können (Prichard, von Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Diawara, Drake et al. 2009, Scott, Pomroy et al. 2013, Kotze, Hunt et al. 2014).

2.4.6 Entwicklungen in Ruanda

Ruxin und Negin (2007) starteten in Ruanda zum ersten Mal ein dreijähriges Projekt, dem eine Million Dollar jährlich zur Verfügung gestellt wurde, um die aktuellen NTDs in Ruanda zu bekämpfen (Ruxin and Negin 2012, Tyden, Skarin et al. 2016).

In 2008 wurden 8313 Kinder randomisiert aus 136 Schulen in 30 Bezirken ausgewählt und Stuhlproben gesammelt und untersucht. Die Stuhlproben wurden mittels Kato -Katz -Methode auf STHs und intestinale Schistosomiasis untersucht und zusätzlich wurden Harnproben mittels Dipstick- Tests auf die Prävalenz von *Schistosoma haematobium* untersucht. Die Gesamtprävalenz für eine Infektion mit einer oder mehreren Spezies der STH lag bei 65 %. Davon waren 38,6 % der Kinder mit *A. lumbricoides* und 31,6 % mit Hakenwürmern befallen. Diese zwei Parasiten kamen am häufigsten vor und Coinfektionen von *A. lumbricoides* und *T. trichiuria* waren üblich (Ruxin and Negin 2012).

Das Projekt beinhaltete drei Phasen, in denen das Sammeln von Hintergrundwissen, das Trainieren von Personal auf die durchzuführenden Aufgaben und eine genaue nationale Datenerhebung integriert waren. Im Zuge dessen wurde auch Informationsmaterial für die

Menschen und für die Kinder im Schulunterricht entwickelt, unter anderem Comics und Radiosendungen.

Die erste offizielle Entwurmungskampagne fand 2008 statt und war in die Mutter- Kind-Gesundheitsvorsorgetage integriert. Die Projektpartner „Rwandan Ministry of Health“ (MoH) und „Ministry of Education“ schlugen die Einbettung in die „Mother and Child Health Week“ (MCHW) vor. Dadurch konnte ein großer Anteil der Risikopopulation, die Schulkinder mit fast 34 % der Gesamtpopulation (alle Altersgruppen), erreicht werden. Albendazol wurde an 3.785.263 Kinder verteilt und 107.028 wurden mit Praziquantel gegen Schistosomiasis behandelt. Insgesamt wurden ungefähr 95 % der Schulkinder behandelt (Ruxin and Negin 2012).

Im dritten Jahr der Kampagne fanden zwei Entwurmungen statt, bei denen jeweils 4.164.709 beziehungsweise 4.228.130 Kinder im Alter von ein bis 16 Jahren beziehungsweise Mütter mit Albendazol behandelt wurden. Insgesamt wurden in den drei Jahren 17.921.306 Medikamentendosen gegen STHs und 596.384 Dosen Praziquantel angewendet. Ausgehend davon, dass die gesamte Bevölkerung anfällig für Infektionen mit STHs ist, entspräche das einer 40- prozentigen Behandlungsrate und bei *S. haematobium*, basierend auf erhobenen regionalen Ausgangsdaten, einer beinahe hundertprozentigen Reichweite der Behandlung.

Die Entwurmung der Schulkinder erfolgte durch vorher genau instruiertes und in diesem Hinblick zusätzlich ausgebildetes Lehrpersonal, die Erwachsenen bekamen in den „Health Centern“, von denen jede Gemeinde eines hat, von ausgebildeten „Community Health Workern“ (CHW) das Medikament verabreicht.

Ziel des Programmes war auch die problemorientierte Ausbildung von Ärzten, Krankenhauspersonal, CHW, Lehrern und Labortechnikern. Am Ende des dritten Jahres waren 18.825 Menschen zur Diagnose, Behandlung und Prävention von STHs, Schistosomiasis und Trachoma trainiert (Ruxin and Negin 2012).

Eine Kontrollerhebung nach dem ersten Jahr bei 2166 Schulkindern und 110 Erwachsenen ergab eine Reduzierung der Prävalenzen um 71 % (Hakenwürmer), 13 % (*T. trichiura*), fünf Prozent (*A. lumbricoides*) und insgesamt um 14 %. Das durchschnittliche epg sank von 147, 898, 8974 und 151 auf 79, 398, 5269 und 105 für Hakenwürmer, *T. trichiura*, *A. lumbricoides* und *S. mansoni*. Eine Umfrage unter Schulkindern ergab, dass 94 % in der zuvor stattfindenden Entwurmungskampagne behandelt worden waren (Ruxin and Negin 2012).

Obgleich erste Schritte im Kampf gegen NTDs ergriffen wurden, gibt es einige Aspekte zu berücksichtigen. Ruanda zählt zu den ärmsten Ländern der Welt, somit sind Programme in diesem Ausmaß weiterhin nur mit Unterstützung von außen durchführbar. Die

Herausforderung wird außerdem sein, die Regelmäßigkeit der Entwurmungen aufrecht zu erhalten, damit Übertragung und Reinfektion eingedämmt werden (http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sth/en/). Hierzu wird es zusätzlich notwendig sein, Schritte in Richtung sanitäre Einrichtung und Versorgung zu gehen, denn Schulen in den besonders betroffenen Regionen sind dahingehend nur unzureichend ausgestattet, aber der Ort, an dem die Kinder viel Zeit verbringen. Es scheint allgemein akzeptiert, dass Sponsoren ihren Fokus auf die medikamentöse Versorgung richten und damit in Kauf nehmen, dass der Fortschritt dieser Programme durch die Ignoranz und das Nicht-Verbessern der Hygienestandards und Versorgung mit fließendem Wasser massiv gehemmt wird.

In der Basisdatenerhebung zeigte sich, dass vier von sechs Schulen keine Wasserversorgung hatten, sie verwenden nahe gelegene Quellen oder Flüsse. An fünf von sechs Schulen gab es keine Möglichkeit zum Händewaschen, aber alle sechs Schulen hatten Latrinen (Ruxin and Negin 2012).

In einer 2012 durchgeführten Studie in der südlichen Provinz von Ruanda, im Bezirk Huye, um die Stadt Butare, wurden zwei Schulen, eine in einer ländlichen und eine in einer städtischen Umgebung, bewusst ausgewählt und vor und nach der staatlich stattfindenden Entwurmung mit Mebendazol, beprobt (Staudacher, Heimer et al. 2014). Insgesamt wurden 622 Stuhlproben untersucht, 301 aus dem ländlichen, 321 aus dem städtischen Gebiet. Alle Stuhlproben wurden mittels Kato-Katz-Methodik untersucht und die epg ermittelt. Zusätzlich wurden von allen Proben Aliquots eingefroren, die im Anschluss mittels real-time PCR auf *A. lumbricoides* untersucht wurden.

Eines von vier Kindern wurde positiv mit einem der vorkommenden STHs diagnostiziert. Die Prävalenz im ländlichen Gebiet war 38 %, im städtischen Gebiet lag sie bei 13 %. *Ascaris lumbricoides* kam bei 95,6 % der infizierten Kinder vor und war damit der am Häufigsten vorkommende Wurm (Staudacher, Heimer et al. 2014).

Eine Wiederholungsuntersuchung bei 510 Kindern nach zwei Wochen ergab eine CR von 92 % für alle STHs. Eine weitere Untersuchung nach 15 Wochen bei 518 Kindern ergab eine Reinfektionsrate von sieben Prozent für alle STHs, davon 5,8 % *A. lumbricoides*, 1,1 % *T. trichiura* und 0,5 % Hakenwürmer.

2.4.7 *Ascaris lumbricoides* versus *Ascaris suum*

Während *A. lumbricoides* in vielen Teilen der Erde eine erhebliche gesundheitliche Bürde für den Menschen darstellt, ist *A. suum* im Gegensatz dazu ein globales Problem in der

Tierhaltung, das sowohl in intensiver als auch in extensiver Viehwirtschaft zu Verlusten führt (Leles, Gardner et al. 2012).

Schon seit geraumer Zeit stellt sich die Frage, ob *A. lumbricoides* und *A. suum* ein und dieselbe Spezies sind. Dazu stellten Leles et al. (2012) vier Hypothesen auf: 1) *A. lumbricoides* und *A. suum* sind unabhängig voneinander entstandene Arten. Diese Hypothese scheint die am wenigsten wahrscheinliche, da es wenige Aufzeichnungen zu *Ascaris* sp. Vorkommen bei in freier Wildbahn lebenden Menschenaffen gibt (Kalema-Zikusoka, Rothman et al. 2005, Gillespie, Lonsdorf et al. 2010, Drakulovski, Bertout et al. 2014). 2) *A. lumbricoides* stammt von *A. suum* ab, *A. suum* ist der persistierende Ahne und *A. lumbricoides* wurde durch allopatrischen Wirtswechsel vom Schwein auf den Menschen übertragen. Hypothese 3) ist die umgekehrte Variante zu 2). Und 4) *A. lumbricoides* und *A. suum* sind Artgenossen (Leles, Gardner et al. 2012).

Bei in Gefangenschaft gehaltenen Affen kommen *Ascaris* sp. deutlich häufiger vor als bei frei lebenden Tieren (Okulewicz, Lonc et al. 2002). Bei phylogenetischen Analysen fand man sowohl *A. lumbricoides* als auch *A. suum* in einem Zoo in Polen und in einem Zoo in Kopenhagen (Okulewicz, Lonc et al. 2002, Nejsun, Grondahl et al. 2006). Bei der Gruppe Schimpansen aus dem Kopenhagener Zoo geht man von einer Übertragung der *A. suum* durch in der Nähe lebende Schweine auf die Affen aus (Nejsun, Bertelsen et al. 2010).

Parasitologisch gleichen sich die Eier beider Spezies (Leles, Gardner et al. 2012). Einzig die adulten Würmer zeigen anhand der Zahnreihe und der Lippenform leichte morphologische Unterschiede. Experimentelle Versuche einer Infektion von Mensch und Schwein mit parasitärem Material der anderen Spezies konnten erfolgreich durchgeführt werden und in beiden Fällen vervollständigte der Parasit seinen kompletten Lebenszyklus im Wirt (Nejsun, Betson et al. 2012).

Menschen und Menschenaffen lebten mit Schweinen lange vor deren Domestizierung in denselben Lebensräumen und die gegenseitige Übertragung von Parasiten ist ein sehr wahrscheinliches Szenario. Auch nach der Domestizierung lebten Mensch und Schwein in sehr engem Kontakt zueinander. Bis zur Gegenwart gibt es indianische Stämme in Südamerika, bei denen die Frauen verwaiste Wildschweinferkel adoptieren und ihnen die Brust geben (Leles, Gardner et al. 2012).

Liu et al. (2011) gelang es, das komplette mitochondriale Genom von *A. lumbricoides* (China Isolat) zu sequenzieren und es mit dem Genom von *A. suum* zu vergleichen. Zusätzlich untersuchten sie zwei Isolate von *A. suum*, eines aus China und eines aus den USA. Die

Genome von *A. lumbricoides* und *A. suum* unterschieden sich um 1,9 %, die verschiedenen Isolate von *A. suum* unterschieden sich um 1,5 %. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Varianz im mitochondrialen Genom auch interspezifisch bis zu zwei Prozent betragen kann, scheint dies ein konkreter Hinweis zu sein, dass es sich um dieselbe Spezies handelt (Liu, Wu et al. 2012).

Zhou et al. (2018) analysierten in ihrer Studie mittels Mikrosatelliten 258 Exemplare von *Ascaris* sp. von Menschen und Schweinen. Sie fanden begrenzte Heterogenität zwischen den drei Populationen, jedoch große Variationen innerhalb der Populationen (Zhou, Jian et al. 2018). Sie stellen die Hypothese auf, dass es in China drei genetische Gruppen von *Ascaris* sp. gibt, namentlich *A. lumbricoides*, *A. suum* und einen Hybrid. Der Mensch kann sich mit allen drei Spezies infizieren, das Schwein ist fast ausschließlich suszeptibel für *A. suum*. Das bestätigen auch experimentelle Infektionen mit *A. lumbricoides*-Eiern beim Schwein, diese konnten ihren Lebenszyklus im tierischen Wirt nicht vollenden (Peng, Yuan et al. 2006).

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien und Reagenzien

Lugol's Kaliumjodidlösung: 250 g Kaliumjodid und 125 g Jod plus 20 l Leitungswasser.

Natriumchloridlösung, gesättigt: 400 g NaCl in 1 l H₂O (0,4 g/cm³), selbst angesetzt

EcoRI10× Puffer: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

EcoRI Enzym: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

GR Green DNA Dye: Labgene Scientific SA, Châtel-Saint-Denis, Schweiz

LE Agarose: Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Ladungspuffer: 60 ml Glycerin vorlegen plus 1 ml 3 % Bromphenolblau plus plus 10 ml 1 M Tris HCl (pH- Wert 8,5) ad 100 ml Aqua destillata

1 M Tris HCl (Tris Puffer); pH- Wert 8,5

DEPC- H₂O: Roth, Karlsruhe

50 x Tris- Acetat- EDTA- Elektrophoresepuffer (TAE): 242 g Tris Pufferan 99 % plus 57, 1 ml Eisessig 100 % plus 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l Aqua destillata

LB Agar

Kanamycin (0,1 g/ml)

Kits

NucleoSpin® Soil Kit: Macherey- Nagel, Düren, Deutschland

NucleoSpin® Tissue Kit: Macherey- Nagel, Düren, Deutschland

DNA Clean & Concentrator™-5 Kit: Zymo Research, Irvine, USA

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit: Zymo Research, Irvine, USA

StrataClone™ Blunt PCR Cloning Kit: Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Busenbach, Deutschland

Biozyme EasyPrep® Pro Plasmid Miniprep Kit: Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Primer (synthetisiert durch Invitrogen, Darmstadt)

Tabelle 1: Verwendete Primer mit Gradienten- PCR- Konditionen und angewandten Konzentrationen

Primer	Gradienten- PCR	Konzentration in nM
<u>Asutbb1</u> 167 for: 5'-CTT CCA GTT AAC CCA TTC GCT TGG T-3' 200 rev: 5'-AGA CAA CTT CAG CGT TCT CAG ACA GAT-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50 bis 60 °C oder 60 bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3
<u>Asutbb2</u> 167-200 for: 5'-TTC AAT TGA CGC ACT CGT TGG GCG GAG GTA-3' 167- 200 rev: 5'-AAG ATG ATT AAG GTC GCC GTA GCT TGG GTT-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3
<u>Asutbb4</u> 167- 200 for: 5'-TTC ACT TGG CGG TGG CAC CGG CTC TGG CAT-3' 167- 200 rev: 5'-CTG AAG CAA ATG TCA TAA AGA GCC TCG TTG TCA A-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3
<u>Asutbb1.2</u> 167 for: 5'-TCC GTG AAG AAT ACC CCG ACA-3' 200 rev: 5'-AGG GTC CTG AAG CAG ATG TCG T-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3
<u>Asutbb1NES</u> for: 5'-AGG GAC AGG TTC GGG TAT G-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3
<u>Asutbb2NES</u> for: 5'-GTA CAG GCT CGG GAA TGG-3' rev: 5'-TGG GTT GGT TAG CTT GAG TG-3'	Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98°C für 15 s, 50 bis 60 °C oder 60 bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min	0,3

<p><u>Asutbb4NES</u> for: 5'-TCT CGA AAA TTC GCG AAG AG-3' rev: 5'-AAA TGT CAT AAA GAG CCT CGT TGT-3'</p>	<p>Initialdenaturierung bei 98°C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min</p>	<p>0,3</p>
<p><u>Asutbb1.2NES</u> rev: 5'-CAG ATG TCG TAC AAA GCC TCA TT-3'</p>	<p>Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 15 s, 50° bis 60 °C oder 60° bis 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 5 min</p>	<p>0,3</p>
<p><u>Sequenzierungsprimer</u> 167Asutbb1: 5'-GCT CAT TTT TAG TGA AAC CAG GCG-3' 198_200Asutbb1: 5'-TAT CCA GCC TAC AGC TGG GAT G-3' 167Asutbb2: 5'-CTA CAC AGT TGC ATC GAT CCG-3' 198_200Asutbb2: 5'-AGC TGC TAG ATC GCT GGA GC-3' 167Asutbb4: 5'-CCA AGC ATT ACT GCT AAG G-3' 198_200Asutbb4: 5'-GGC ATT AGG AAT CGA CGG ATT AC-3' 167Asutbb1.2: 5'-GAA CTC CGA AAG TCT GCA GAC-3' 200Asutbb1.2: 5'-GAG AGC CAC AGT TGG TTT AG-3'</p>		<p>0,3</p>

Tabelle 2: Primer mit optimalen Annealingtemperaturen, PCR- Konditionen und Fragmentgrößen

Primer	Optimale Annealingtemperatur und PCR Konditionen	Fragmentgröße
Asutbb1	56 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 56 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	645 bp
Asutbb2	72 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 72 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	750 bp
Asutbb4	66 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 66 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	422 bp
Asutbb1.2	65 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 65 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	462 bp
Asutbb1N ES	65 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 65 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	627 bp
Asutbb2N ES	68 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 68 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	700 bp
Asutbb4	60 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	372 bp
Asutbb1.2	65 °C Initialdenaturierung bei 98 °C für 30 s, 40 Zyklen bei 98 °C für 10 s, 65 °C für 30 s und 72 °C für 30 s, finale Elongation bei 72 °C für 10 min	450 bp

Marker

Gene Ruler 100 bp Marker: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Gene Ruler 1 kb Marker: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

λ EcoRI+ HindIII Ladder: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

PCR Reagenzien

Nuclease free water: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

10mM dNTP Mix: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

5×HF Buffer: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Phusion Hot Start High Fidelity II DNA-Polymerase: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Einwegartikel

Nitrilhandschuhe: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Plastikbecher: diverse Hersteller, in Ruanda am Markt gekauft

Stuhlbecher 55x 44 mm: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Falcon Tubes 50 ml, 15 ml: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Holzspatel: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Transferpipette 3,5 ml: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl: Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

PCR Single Cap 8er- Soft Strips 0,2 ml farblos: Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Parafilm® M: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Mehrwegartikel

Mini-FLOTAC- Kammer: Unitá di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicine Veterinaria e Produzione Animali, Università degli Studi Napoli Federico II

Selbstgebastelte Siebe: 120 ml Schraubgefäße Sarstedt, Nürnberg und offenmaschiges Monofilamentgewebe Sefar Nitex 03-22/14 und 03- 200/39, Sefar AG, Heiden, Schweiz

Spritzflasche mit Spritzrohr 500 ml: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Pipetten Research Pro 10 µl, 100 µl, 1000 µl: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Reagenzglasröhrchen

Handzähler: megro GmbH & Co KG, 46485 Wesel

Technische Geräte

Eppendorf Zentrifuge 5810, Rotor A-4-81: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikroskop Olympus CH20: Olympus, Tokio, Japan

Okulare NWCHK 10x/18: Olympus, Tokio, Japan

VWR Clinical 200 Zentrifuge, 28° Fixed- angle Rotor, 12 x 15 ml: VWR International, Pennsylvania, USA

Heraeus Sepatech Biofuge 13, Rotor 3743, 24 x 1,5 ml: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

MaxQ 6000 Inkubator: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Wasserbad: Memmert, Schwabach, Deutschland

Wide Mini- Sub Cell GT Gelelektrophoresekammer: Bio Rad, München, Deutschland

Gefrierschrank -20°C: Liebherr, Bieberach an der Riß, Deutschland

Epoch: Biotek, Winooski, USA

Software

Endnote: Version X4; Thomson Reuters, New York, USA

Gen5: Version 1.10; Biotek, Bad Friedrichshall

Microsoft Excel: Version 2013; Microsoft Inc.

R Studio: Version 3.2; The R Foundation for Statistical Computing

BioEdit: Version; Ibis Biosciences, Carlsbad, USA

OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version.

3.2 Methoden

3.2.1 Ethik

Das Studienprotokoll wurde vom nationalen, ruandesischen Ethikkomitee unter der Referenznummer 242/RNEC/2014 genehmigt. Das ruandesische Gesundheitsministerium erteilte die Erlaubnis zur Durchführung der Studie unter der Referenznummer 2543/12.00/2014.

Alle Eltern der an der Studie teilnehmenden Kinder wurden in einer Versammlung über den Studienablauf informiert und es wurden schriftliche Einverständniserklärungen („Informed consent“) eingeholt.

3.2.2 Humane Proben

3.2.2.1 Probensammlung

Es wurden Stuhlproben von Kindern im Alter von sechs bis zehn Jahren in der südlichen Provinz Huye in Butare, Ruanda gesammelt. Aus den 14 Subdistrikten der Provinz (Gishamvu, Karama, Kigoma, Kinazi, Maraba, Mbazi, Mukura, Ngoma, Ruhashya, Huye, Rusatira, Rwaniro, Simbi, Tumba) wurden 12 Schulen randomisiert ausgewählt, wobei jede Schule in einem anderen Subdistrikt lag. Die Kinder wurden durchnummeriert und jede Schule bekam ein Kürzel. Allen Kindern wurde vorab ein Stuhlbecher ausgehändigt, den sie am Tag der staatlich durchgeführten Entwurmung gefüllt in die Schule mitbrachten. 2014 wurde jedes Kind im Anschluss an eine klinische Untersuchung und Blutprobenentnahme unter Aufsicht oral mit einer Tablette Albendazol (400 mg/Kind; Zentel, GlaxoSmithKline) entwurmt, 2015 wurde ausschließlich entwurmt. Zusätzlich erfolgte eine Fragebogenanamnese. Jedes Kind bekam

nach Behandlung wieder einen Stuhlbecher ausgehändigt, der sieben bis zehn Tage nach der Entwurmung entweder in der Schule oder direkt bei den Kindern zu Hause gefüllt wieder eingesammelt wurde. Im ersten Durchgang vor Entwurmung im Jahre 2014 wurden 977 Proben gesammelt, im zweiten nach Entwurmung 1052. Im Jahr 2015 wurden insgesamt 392 Proben gesammelt, 212 vor und 180 nach der Entwurmung.

3.2.2.2 Probenkonservierung

Alle Proben wurden ins Labor transportiert, jeweils zu Teilen von fünf und 10 g in 50 ml Falcons umgefüllt und in Lugol's Kaliumjodidlösung wie folgt konserviert:

Die fünf g Proben wurden mit Kaliumjodidlösung auf 25 ml aufgefüllt, die 10 g Proben auf 50 ml. Alle Proben wurden mindestens eine Nacht, spätestens bis zur Untersuchung, gekühlt gelagert. Die 10 g Proben wurden als Rückstellproben aufgehoben, um bei positiv diagnostizierter fünf g Probe daraus die vorhandenen Parasiteneier isolieren zu können.

3.2.2.3 Parasitologische Untersuchung der Proben

Die Untersuchung aller fünf g Proben erfolgte mittels einer quantitativen Flotationsmethode unter Verwendung von Mini-FLOTAC Kammern.

Die in Kaliumjodidlösung konservierte fünf g Probe wurde bis zur 50 ml- Marke mit Leitungswasser aufgefüllt und bei 4500 x G drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet mit 45 ml gesättigter Natriumchloridlösung aufgefüllt und mit einem Holzspatel homogenisiert. Das Falcon wurde wieder verschlossen und geschüttelt. Die entstandene Suspension wurde durch ein grobes Sieb (200 µm) gegossen und der Durchfluss aufgefangen. Der Durchfluss wurde durch Schwenken durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Eier zu gewährleisten, und anschließend mit einer Transferpipette aufgenommen. Pro Zählkammer der Mini-FLOTAC Kammer wurde je eine Probe eingefüllt, das heißt, es wurden pro Mini-FLOTAC Kammer zwei Stuhlproben untersucht. Die Proben wurden unter dem Mikroskop in hundertfacher Vergrößerung durchgemustert, alle vorhandenen Parasiteneier erfasst und mittels Handzähler ausgezählt. Spezifiziert und quantifiziert wurden *A. lumbricoides*, *T. trichiura* und Hakenwürmer (*A. duodenale* und *N. americanus*).

Zur Bestimmung des epG wurden die ausgezählten Eier mit dem Faktor 10 multipliziert, daraus ergibt sich eine untere Nachweisgrenze der Methode von 10 Eiern pro Gramm Kot.

3.2.2.4 Statistische Auswertung der Prävalenzen, der Eizahlreduktion und der “Cure rate“

Die Prävalenzen wurden mittels des öffentlich zugänglichen Online- Portals „OpenEpi“ mit der Funktion „Proportion“ ausgerechnet und zusammen mit dem Konfidenzintervall nach Wilson angegeben. Die zugehörigen Korrelationen wurden mittels Spearman- Korrelation berechnet.

Die FECR mit 95 % KI wurden mit dem Programm R und dem Zusatzpaket „eggCounts“, Version 2.1-2, ausgerechnet. Das Paket „egg counts“ ist ein statistisches Werkzeug, das es ermöglicht, die 95 % KI der Eizahlreduktionen unter Berücksichtigung der Poisson Fehler auszurechnen. Dazu werden statistisch die teilweise hohe Streuung bei Eizahlen innerhalb der Gruppe berücksichtigt sowie die Wahrscheinlichkeitsverteilung und das KI laufend an die Eizahlen angepasst unter der Annahme, dass ein negatives Untersuchungsergebnis nur aussagt, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt keine Eier gefunden wurden, nicht aber, dass keine vorhanden waren (Torgerson et al. 2013). Die Berechnung erfolgt in einem Bayesianischen Ansatz und nutzt eine Markov- Monte- Carlo Kette. Die Eizahlreduktion ergibt sich aus dem Modalwert der posterioren Dichte und das 95 % KI aus dem höchsten posterioren Dichteintervall (HPD) mit 2,5 % und 97,5 % Perzentilen.

Die CR wurde bestimmt als der prozentuale Anteil an zuvor infizierten Individuen in der Population, die im Anschluss ein negatives epG hatten, und wurde händisch ausgerechnet. Hierzu wurden nur die Individuen herangezogen, die vor Behandlung ein positives epG hatten. Die Anzahl der Individuen, die anschließend ein negatives epG hatte, wurde durch die Gesamtzahl geteilt und mit 100 multipliziert, um die CR in Prozent zu erhalten.

Bei den Berechnungen der Eizahlreduktionen wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. In einer ersten Berechnung wurden alle Individuen herangezogen, die zu irgendeinem Zeitpunkt der Untersuchung positiv waren, somit auch jene, die vor Untersuchung negativ und nachher positiv waren. In einer zweiten Berechnung wurden nur jene Individuen einbezogen, die vor Untersuchung positiv waren.

3.2.2.5 Prozessierung der Rückstellproben

Bei auf *A. lumbricoides*, *T. trichiura* oder Hakenwurm positiven Proben wurden aus der in Kaliumjodidlösung konservierten Rückstellprobe vorhandene Parasiteneier isoliert. Die Proben wurden bei 4500 x G drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit 45 ml gesättigter Natriumchloridlösung aufgefüllt und mit einem Holzspatel homogenisiert. Das Falcon wurde wieder verschlossen, geschüttelt und die entstandene Suspension durch ein grobes Sieb (200 µm) gegossen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und erneut drei Minuten bei 4500 x G zentrifugiert. Die zentrifugierte Lösung wurde durch ein

feines Sieb (22 µm) gegossen und der Durchfluss verworfen. Der auf dem Sieb befindliche Rückstand wurde mit Leitungswasser aus einer Spritzflasche gespült und mit einer Transferpipette dreimal abgenommen. Der gesammelte Rückstand wurde in ein Falcon Tube (15 ml) überführt. Das Falcon Tube wurde mit destilliertem Wasser bis zur 15 ml- Markierung aufgefüllt und fünf Minuten bei 1800 x G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit einer Transferpipette in ein 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt und mit 70 µl DEPC-H₂O versetzt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

3.2.2.6 Transport nach Deutschland

Die bei -80°C eingefrorenen Proben wurden aus Ruanda mittels Luftfracht auf Trockeneis gekühlt zur Charité nach Berlin transportiert.

3.2.3 Schweineproben

3.2.3.1 Probensammlung

Mit Hilfe der Community Health Worker wurden im Jahr 2014 insgesamt 502 Schweineproben aus den zu den Schulen zugehörigen Dörfern gesammelt.

3.2.3.2 Probenkonservierung

Alle Proben wurden ins Labor transportiert und jeweils fünf g in ein 50 ml Falcon umgefüllt und auf 25 ml mit Lugol's Kaliumjodidlösung aufgefüllt.

Alle Proben wurden mindestens eine Nacht, spätestens bis zur Untersuchung, gekühlt gelagert.

3.2.3.3 Probenuntersuchung

Die Untersuchung aller Proben erfolgte mittels der quantitativen Flotationsmethode Mini-FLOTAC mit einer Sensitivität von 10 epG Kot.

Quantifiziert und dokumentiert wurden Wurmeier der Spezies *A. suum*, *T. suis* und die beim Schwein vorkommenden Magendarmstrongyliden, die weiters unter dem Begriff MDS zusammengefasst sein werden.

3.2.3.4 Aufbereitung der Parasiteneier

Zur Aufbereitung wurden einige übrig gebliebene, nicht mikroskopierte fünf g Proben herangezogen, da eine Weiterverarbeitung zu Beginn des Projekts noch nicht im Raum stand.

Die Aufbereitung erfolgte wie im Unterpunkt „3.2.2.5 Prozessierung der Rückstellproben“ beschrieben. Abweichend vom Protokoll wurden die 5 g Proben aber in einem ersten Schritt vor der ersten Zentrifugation mit Leitungswasser bis zur 50 ml Marke aufgefüllt.

3.2.3.5 Transport nach Deutschland

Die bei -80°C eingefrorenen Proben wurden aus Ruanda mittels Luftfracht auf Trockeneis gekühlt zur Charité nach Berlin transportiert.

3.2.4 Molekularbiologische Analysen

3.2.4.1 DNA- Isolation

Die Proben wurden aufgetaut und bei 13.000 x G für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet in ein NucleoSpin® Bead Tube aus dem Macherey- Nagel NucleoSpin® Soil Kit überführt. Die DNA wurde laut empfohlenem Protokoll des Herstellers isoliert. Es wurde mit 50 µl SE Puffer eluiert und anschließend in zwei 25 µl Aliquots aufgeteilt.

Alle DNA Proben wurden mit Kürzel der Schule und dazugehöriger Nummer beschriftet und bei -20°C eingefroren.

Aus einem in Ruanda bei Schweinen gesammelten adulten *Ascaris* sp. Exemplar wurde DNA mittels Macherey- Nagel NucleoSpin® Tissue Kit, dem empfohlenen Protokoll des Herstellers folgend, gewonnen.

3.2.4.2 Primer Entwicklung für Polymerase-Ketten-Reaktionen der untersuchten genomischen Sequenzen des β -Tubulins

Für vier der fünf bekannten β -Tubulin-Isotypen von *A. lumbricoides* wurden die Sequenzen aus der öffentlich zugänglichen GenBank® des NCBI („National Center for Biotechnology Information“) herausgesucht und Primer konzipiert, die innerhalb der Introns liegen. Auf Grund der Identität von Asutbb2 und Asutbb3 wird dieser Isotyp im Folgenden konsequent als Asutbb2 zusammengefasst.

3.2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der untersuchten β -Tubulin Sequenzen

Temperatur Gradient

Zur Verwendung für alle folgenden PCR- Verfahren wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1:6 verdünnt (50 µl DEPC behandeltes Wasser plus 10 µl DNA).

Um die optimale Primerhybridisierungs- (Annealing) Temperatur für alle Primer der vier zu untersuchenden Isotypen zu finden, wurden als erster Schritt Temperatur-Gradienten-PCRs von 50° bis 60 °C und 60° bis 70 °C durchgeführt. Als Template diente die DNA-Probe des in Ruanda gesammelten adulten *Ascaris* sp. Exemplars. Jeder Reaktionsansatz der PCR beinhaltete 0,2 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 0,25 µM Vorwärts-Primer, 0,25 µM Rückwärts-Primer, 0,4 U Phusion Hot Start II DNA Polymerase sowie 2 µl DNA-Template in 20 µl 1 x HF Puffer. Von dem Reaktionsansatz wurden 18 µl pro Reaktionsgefäß in einen 8er Strip pipettiert und jeweils zwei µl DNA respektive Nuklease- freies Wasser in die Negativkontrolle.

Zu Beginn wurden die Proben im Cycler für 30 s bei 98 °C denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 98 °C für 15 s, einem Temperaturgradienten von 50°- 60 °C, respektive 60°- 70 °C für 30 s und einer Primer-Extension bei 72 °C für 5 min. Nach Ablauf des letzten Zyklus wurden die Proben bei 12 °C gekühlt.

Aus den Gradienten-PCRs ergaben sich die in Tabelle 2 angegebenen Annealingtemperaturen.

Standard PCR

Im Anschluss an das Etablieren der geeigneten Protokolle und das Herstellen der Positivkontrolle wurden mit allen isolierten DNA- Proben Standard PCRs durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz der PCR beinhaltete 0,2 mM dNTPs, 0,25 µM Vorwärts-Primer, 0,25 µM Rückwärts-Primer, 0,4 U Phusion Hot Start II DNA- Polymerase sowie 2 µl DNA-Template in 20 µl 1 x HF Puffer.

(Semi)- Nested PCR

Bei den β-Tubulin Isotypen *Asutbb1* und *Asutbb1.2* wurden nur „semi- nested“ Primer verwendet, da die Primer sonst zu nahe an den untersuchten Codons gelegen hätten, beziehungsweise das Intron zum Anlegen eines zweiten Primer zu kurz war und ein positives Sequenzierergebnis nicht mehr sicher gewesen wäre. Die verdünnten PCR-Produkte der Standard PCRs wurden als Templates (2 µl) für die (Semi)-Nested PCR unter denselben Konditionen mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt.

3.2.4.4 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der Proben wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden die Proben, die Negativkontrolle und wenn mitgeführt, die Positivkontrolle, mit je 4 µl Ladungspuffer versetzt, und zusammen mit einem 100 Basenpaar- (100 bp Ladder) und einem

1- Kilobase-Marker (1 kb Ladder) auf ein 1,5 %- Agarose Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei durchschnittlich 80 V/cm.

Anhand der Qualität der Banden der Proben der Gradienten PCR wurde die ideale Annealingtemperatur für die Primer bestimmt und eine geeignete Probe zur Klonierung gewählt.

Die PCR- Produkte aus Standard- und (Semi)- Nested PCR wurden, wenn sie positiv waren, aufgereinigt und für die Sequenzierung vorbereitet.

3.2.4.5 Aufreinigung für Klonierung

Die Probe, die bei der Agarose-Gelelektrophorese die qualitativ stärkste Bande hinterließ, wurde mittels DNA Clean& Concentrator KitTM- 5 von Zymoresearch aufgereinigt. Hierfür wurde das jeweilige PCR- Produkt direkt mit dem ersten Puffer vermischt, weiteres Vorgehen siehe Protokoll des Herstellers.

3.2.4.6 Klonierung

Die aufgereinigte Probe wurde mit dem StrataClone Blunt PCR Cloning Kit von Stratagene kloniert, um später als Positivkontrollen in den PCRs verwendet zu werden. Hier wurde, in Abweichung zum empfohlenen Protokoll des Herstellers, die Probe bei Schritt 3.) (Inkubation bei Raumtemperatur) statt fünf Minuten 30 Minuten inkubiert, bei Schritt 5.) (Inkubation auf Eis) dreißig Minuten statt 20 Minuten auf Eis gelegt und bei Schritt 8.) (Inkubation unter Schütteln) eine Stunde im Inkubator geschüttelt.

Nach der Inkubation unter Schütteln wurde von dem Transformationsgemisch im Anschluss mit einem abgeflamten Drygalskispatel einmal fünf µl und einmal 100 µl auf LB- Kanamycin Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit individuellen Klonen Flüssigkulturen beimpft. Hierzu wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen ein Mastermix mit 25 ml LB-Agar und 25 µl Antibiotikum Kanamycin (0,1 g/ml) angesetzt und jeweils fünf ml in ein Reagenzglasröhrchen pipettiert. Die über Nacht gewachsenen Klone wurden mit einer Pipettenspitze (10 µl) gepickt und jeweils eine Pipettenspitze in ein mit fünf ml LB- Agar/ Kanamycin- Mischung gefülltes Reagenzröhrchen überführt. Pro Platte wurden fünf Klone gepickt. Die Reagenzglasröhrchen wurden über Nacht im Inkubator bei 200 rpm (rounds per minute) bei 37 °C geschüttelt.

Alle Platten wurden im Anschluss mit Parafilm verschlossen und bei plus vier °C im Kühlschrank gelagert.

Die DNA-Extraktion aus den gezüchteten Bakterienkulturen wurde mittels EasyPrep® Pro Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Ansonsten wurde dem Protokoll des Herstellers folgend abweichend beim letzten Schritt in 50 µl DEPC-H₂O eluiert. Die Konzentration der DNA jeder Probe wurde mittels Take3 Platte im Epoch Plattenphotometer gemessen.

Die hergestellten Klone wurden im Anschluss mittels EcoRI- Enzym restringiert. Hierzu wurden fünf µl Plasmid, drei µl DEPC-H₂O, ein µl 10× EcoRI-Puffer und ein µl EcoRI Enzym (10 U/µl) in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Die Reaktionskomponenten wurden gemischt und zentrifugiert und bei 37 °C für zweieinhalb Stunden im Wasserbad inkubiert. Von jedem Klon wurden ein µl mit neun µl DEPC und zwei µl Ladungspuffer gemischt und mit dem λ EcoRI + HindIII Marker auf ein Gel aufgetragen. Von dem Klon, der die qualitativ deutlichste Bande auf Höhe des Inserts zeigte, wurde die Konzentration an DNA, die zuvor mit dem Epoch Plattenphotometer bestimmt wurde, von 100 ng pro µl nach folgender Formel ausgerechnet: $v_2 = c_1 \times v_1$ dividiert durch c_2 . c_1 entspricht 100 ng, v_1 steht für 20 µl Volumen der Probe, das erreicht werden soll, c_2 entspricht der gemessenen Konzentration und v_2 dem gesuchten Volumen. Im Anschluss wurde die Probe entsprechend dem Ergebnis mit DEPC- H₂O, um eine Konzentration von 100 ng/µl zu erreichen, verdünnt und zum Sequenzieren zu LGC Genomics geschickt.

3.2.4.7 Aufreinigung von PCR Produkten zur direkten Sequenzierung

Alle Proben, die bei der Agarose-Gelelektrophorese eine positive Bande zeigten und bei denen mittels Positivkontrolle das Vorhandensein amplifizierbarer DNA nachgewiesen werden konnte, wurden aufgereinigt. Bei spezifischen eindeutigen Banden wurde das DNA Clean & Concentrator™- 5 Kit verwendet. Beim Nachweis multipler Banden wurden erneut vier µl der Probe auf ein 1,5 % Agarose Gel aufgetragen, unter UV- Licht ausgeschnitten und mittels Zymoclean™ Gel DNA- Recovery Kit aufgereinigt. Alle Proben wurden in 20 µl DEPC-H₂O eluiert.

3.2.4.8 Sequenzierung

Um sicherzugehen, dass nur erfolgreich aufgereinigte Proben zur Sequenzierung geschickt wurden, wurde von jeder Probe ein µl vermischt mit neun µl DEPC H₂O und zwei µl Ladungspuffer zusammen mit dem EcoRI +HindIII Ladder auf ein 1,5 % Agarose Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. PCR-Produkte, die eine ausreichende Konzentration aufwiesen, wurden zusammen mit den jeweiligen Sequenzierprimern, mit einer Konzentration von 20 mM, zu LGC Genomics geschickt. Die Proben wurden individuell mit DEPC-H₂O verdünnt, um eine Konzentration von circa 10 ng/µl zu erreichen.

3.2.4.9 Analyse mittels BioEdit Software

Die Sequenzierergebnisse von LGC wurden mit der Software Bio Edit analysiert und die Ergebnisse in Excel dokumentiert.

Bio Edit ist eine Software, die unter anderem die von ABI Sequenziergeräten Rohdaten der Chromatogramme lesen und visualisieren kann. Anhand dieses Chromatogramms lässt sich ablesen, ob und an welcher Position es eine Änderung in der Nukleotidabfolge gegeben hat. Diese stellt sich in Form einer Spitze dar, die über dem Hintergrund der umgebenden negativen Signale liegt. Dabei sind missense Änderungen, die zu einer anderen kodierten Aminosäure führen, von besonderem Interesse.

Die zu untersuchenden Sequenzen wurden durchgemustert und besonders an den kritischen Codon Positionen 167, 198 und 200 analysiert. Eventuelle Veränderungen wurden in einer Exceltabelle dokumentiert.

4. Ergebnisse

4.1 Parasitologische Kotuntersuchungsverfahren 2014

Die 2014 gesammelten Humanproben wurden mittels des Mini- FLOTAC Flotationsverfahrens mit einer Sensitivität von bis zu zehn Eiern pro Gramm Kot parasitologisch auf Wurmeier von *Ascaris* sp., *T. trichiura* und den Hakenwürmern *A. duodenale* und *N. americanus* untersucht. Alle Eier wurden quantifiziert und die Anzahl dokumentiert, die einzelnen Ergebnisse siehe Anhang.

Anhand dieser Ergebnisse konnten die Prävalenzen in den einzelnen Schulen vor und nach Probenentnahme, sowie die FECRT und die CR berechnet werden. Die KI sind mit einem Konfidenzniveau von 95 % angegeben.

Die CR ist ein Messwert aus der Humanmedizin und gibt an, wie viele Individuen innerhalb einer Population, die an einer bestimmten Krankheit gelitten haben, nachher wieder vollständig genesen sind. Daher steht sie in teilweise starkem Kontrast zur FECR, wird aber der Vollständigkeit halber mitangeführt.

4.1.1 *Ascaris* spezies

In der folgenden Tabelle sind die Prävalenzen von *Ascaris* sp. vor und nach Entwurmung mit den zugehörigen KI mit einem Konfidenzniveau von 95 % angegeben.

Tabelle 3: Prävalenzen von *Ascaris* sp. vor und nach Entwurmung, Konfidenintervall

Schule	Kinder vor Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI	Kinder nach Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI
NGOMA	12/60	20,00	11,83-31,78	4/74	5,40	2,12-13,09
MBAZI	30/107	28,04	20,40-37,19	16/101	15,84	9,99-24,19
RANGO	19/72	26,39	17,59-37,58	4/63	6,35	2,50-15,22
MUGOGWE	7/106	6,60	3,24-13,01	3/147	2,04	0,70-5,82

Ergebnisse

SHOLI	51/108	47,22	38,07-56,57	7/109	6,42	3,14-12,67
GATHOVU	13/95	13,68	8,17-22,02	4/75	5,33	2,09-12,93
KARAMA	60/90	66,67	56,42-75,55	18/83	21,69	14,18-31,70
GITHOVU	1/61	1,64	0,29-8,72	0/53	0	0-6,75
TUMBA	1/22	4,54	0,80-21,80	0/20	0	0-16,11
SOVU	58/102	56,86	47,18-66,05	22/111	19,82	13,47-28,19
MARABA	24/54	44,44	32,00-57,62	10/80	12,50	6,93-21,50
KIGOMA	38/100	38,00	29,10-47,79	46/136	33,82	26,41-42,12
TOTAL	314/977	32,14	29,29-35,13	134/1052	12,74	10,86-14,89

Die zwölf Bezirke, in denen Proben für die Untersuchung gesammelt wurden, unterschieden sich hinsichtlich ihrer Infrastruktur teilweise stark voneinander. Die Prävalenzen zwischen ländlichem und urbanem Gebiet liegen zwischen knapp zwei und 67%, allerdings weisen z.B. Mugogwe als ländlicher und Tumba als urbaner Bezirk ähnliche Prävalenzen auf (6,60; 4,54). Als urbane Bezirke gelten Ngoma und Tumba, als ländliche Rango, Sholi, Sovu, Mbazi, Mugogwe, Gathovu, Karama, Githovu, Maraba und Kigoma. Auch die Anzahl an Proben, die gesammelt werden konnten, wiesen zum Teil starke Schwankungen auf.

Die höchste Prävalenz von *Ascaris* sp. wies mit fast 67 % die Schule in Karama auf, die niedrigste lag bei ungefähr zwei Prozent in Githovu, beides sind ländliche Bezirke. Auf alle Schulen betrachtet lag die Prävalenz bei 32 % und nach der Entwurmung bei rund 13 %, 95% KI.

Mit Hilfe des Statistik-Programmes R und der Zusatzfunktion „eggCounts“ (Version 2.1-2) wurde die Eizahlreduktion für alle Individuen berechnet. Das KI ist mit einem Konfidenzniveau von 95% angegeben. In den in Tabelle 4 angegebenen Ergebnissen wurden alle Individuen in die Berechnung miteinbezogen, die zu irgendeinem Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen positiv waren. Es wurden auch Kinder in die Berechnung miteinbezogen, die vor Entwurmung negativ und nach Entwurmung positiv waren.

Tabelle 4: FECRs mit zugehörigen Konfidenzintervall aller Kinder, die vor ODER nach Entwurmung positiv für *Ascaris* sp. waren

Schule	Paare	FECR %	95 % KI
NGOMA	7	59,11	55,79-61,65
MBAZI	28	0	0-0,06
RANGO	13	91,25	89,76 - 92,57
MUGOGWE	4	99,56	98,12-99,98
SHOLI	32	93,59	93,08-94,12
GATHOVU	9	52,33	46,91-56,90
KARAMA	51	95,41	95,14-95,68
GITHOVU	1	n. b. ^a	n. b. ^a
TUMBA	1	n. b. ^a	n. b. ^a
SOVU	54	89,77	89,47-90,08
MARABA	17	93,96	93,45-94,53
KIGOMA	39	56,88	55,21-58,33
TOTAL	256	75,40	75,07-75,71

a = nicht berechnet; da nur sehr wenige Datenpunkte vorlagen, kam es an Hand der Verteilung in der Markov-Kette zu sehr breiten Konfidenzintervallen und ungenauen Ergebnissen.

In der Literatur (Vercruysse, Behnke et al. 2011) wird die Grenze, an der man die Sensitivität für die Eizahlreduktion misst, für *A. lumbricoides* mit 95 %, für Hakenwürmer mit 90 % angegeben. Alle Werte, die darunter liegen, werden als Anzeichen für die Entwicklung einer resistenten Wurmpopulation angesehen.

Fünf der von uns untersuchten zwölf Schulen (Ngoma, Mbazi, Gathovu, Sovu, Kigoma) wiesen laut der Ergebnisse der Eizahlreduktionstests eine deutlich verminderte Wirksamkeit von Albendazol und damit Anzeichen für resistente Wurmpopulationen von *A. lumbricoides* auf. Die Schulen Rango, Sholi und Maraba weisen Ergebnisse knapp unterhalb der angegebenen Sensitivitätsgrenze auf und gelten somit als gefährdet.

FECRs um Null, wie zum Beispiel von Mbazi in Tabelle 4, kommen bei der Berechnung ebenfalls vor, wenn Eizahlen nach der Entwurmung höher als vorher waren, insbesondere wenn eine größere Anzahl der Kinder vor Entwurmung negativ und nachher positiv war, oder wenn die Eiausscheidungen nach der Entwurmung höher waren als vor der Entwurmung, bewegen sich auch die Konfidenzintervalle um Null herum.

Die Tatsache, dass es bei *Ascaris* sp. zu unregelmäßiger Eiausscheidung kommen kann, rechtfertigte die Einbeziehung aller Daten bei den Eizahlreduktionstests und ermöglichte zwei Blickwinkel. In einer zweiten Berechnung wurden nur jene Individuen in die Berechnung mit einbezogen, die vor Entwurmung positiv waren.

Tabelle 5: FECRs für *Ascaris* sp. OHNE Kinder, die vor Entwurmung negativ waren, Konfidenzintervall und CR (%)

Schule	Paare	FECR %	95 % KI	CR %
NGOMA	5	99,83	99,59-99,96	80,00
MBAZI	22	0,01	0-0,10	68,00
RANGO	12	91,28	89,70-92,72	83,00
MUGOGWE	4	99,90	98,81-100	100
SHOLI	32	93,61	93,05-94,10	91,00
GATHOVU	8	52,77	47,27-57,75	75,00
KARAMA	48	95,85	95,59-96,10	73,00
GITHOVU	1	100 ¹	n.b. ^a	100
TUMBA	1	100 ¹	n.b. ^a	100
SOVU	52	91,98	91,98-92,25	69,00
MARABA	16	94,06	93,48-94,54	69,00
KIGOMA	33	64,82	63,69-66,24	33,00
TOTAL	234	81,63	81,41-81,95	69,65

a= Auf Grund der niedrigen Probenanzahl kam es hier bei Berechnung der FECR mittels Markov-Kette zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen, weshalb auf die Darstellung verzichtet wurde; 1= die aufgeführten FECRs wurden nicht mit Hilfe von „eggCounts“ berechnet.

Die Ergebnisse zeigen eine gewisse Varianz, dennoch gibt es laut den Eizahlreduktionen Hinweise, dass sich in den Bezirken Mbazi, Gathovu und Kigoma resistente Wurmpopulationen bilden.

Die CRs sagen aus, dass nur in drei (Mugogwe, Githovu, Tumba) von zwölf Schulen eine vollständige Elimination des Parasiten erreicht werden konnte, wobei die niedrige Probenanzahl beachtet werden muss.

4.1.2 *Trichuris trichiura*

In der folgenden Tabelle sind die *T. trichiura* Prävalenzen vor und nach Entwurmung und zugehörige KI mit einem Konfidenzniveau von 95% sowie die Cure Rate für die in den jeweiligen Schülergruppen in Prozent angeführt.

Tabelle 6: Prävalenzen von *T. trichiura* vor und nach Entwurmung, Konfidenzintervalle (KI) sowie CR (%)

Schule	Kinder vor Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI	Kinder nach Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI	CR %
NGOMA	2/60	3,33	0,92-11,36	0/36	0	0-9,64	100
MBAZI	2/107	1,87	0,51-6,56	3/101	2,97	1,02-8,37	0
RANGO	0/72	0	0-5,07	2/63	3,17	0,88-10,86	0
MUGOG WE	0/106	0	0-3,50	1/147	0,68	0,12-3,75	k.A. ^b
SHOLI	1/108	0,92	0,16-5,06	1/110	0,91	0,16-4,97	50
KARAMA	10/90	11,11	6,15-19,26	4/83	4,82	1,89-11,75	63
TUMBA	0/22	0	0-14,86	1/20	5,00	0,89-23,61	0
SOVU	7/101	6,93	3,40-13,62	8/111	7,21	3,70-13,58	36
MARABA	5/54	9,25	4,02-19,91	1/80	1,25	0,22-6,75	75
KIGOMA	6/100	6	2,78-12,48	5/136	3,68	1,58-8,32	63
TOTAL	33/977	3,38	2,41-4,70	26/1052	2,47	1,69-3,56	

In den Schulen Gathovu und Githovu wurden keine Eier der Spezies *T. trichiura* in den untersuchten Proben gefunden.

Von der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse der Eizahlreduktionstests von *T. trichiura* wurde abgesehen. Auf Grund der niedrigen Prävalenz und der daraus resultierenden niedrigen Anzahl paariger Proben mit *T. trichiura* konnten keine relevanten Aussagen zur FECR auf Schulebene gemacht werden. Die CR ist der Vollständigkeit halber mitangeführt, sie liegt, außer bei Ngoma, deutlich unter bzw. bei 75 %.

Die FECR für *T. trichiura* für alle Schulen und unter der Einbeziehung vorher negativer und nachher positiver Individuen ergibt eine FECR von 50 % einem 95 % KI von 36,1 - 61,4 %.

Wenn man dieselbe Berechnung anstellt, ohne die vorher negativen Individuen miteinzubeziehen, erhält man eine FECR von 75 % bei einem 95 % KI von 66,2 - 82,6 %.

4.1.3 Hakenwürmer

Im Folgenden (Tabelle 7) sind die Prävalenzen der Hakenwürmer mit zugehörigen KI und einem Konfidenzniveau von 95 % angeführt.

Tabelle 7: Prävalenzen der Hakenwürmer vor und nach Entwurmung, Konfidenzintervalle

Schule	Kinder vor Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI	Kinder nach Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI
NGOMA	1/60	1,67	0,29-8,85	2/74	2,70	0,74-9,32
MBAZI	3/107	2,80	0,95-7,92	8/101	7,92	4,06-14,86
RANGO	4/72	5,56	2,18-13,43	3/63	4,76	1,63-13,09
MUGOGWE	6/106	5,66	2,62-11,8	8/147	5,44	2,78-10,37
SHOLI	13/108	12,04	7,17-19,51	11/109	10,09	5,72-17,17
GATHOVU	4/95	4,21	1,64-10,33	0/75	0	0
KARAMA	10/90	11,11	6,14-19,26	9/83	10,84	5,81-19,34
SOVU	13/102	12,75	7,60-20,59	7/111	6,31	3,08-12,45
MARABA	7/54	12,97	6,42-24,42	7/80	8,75	4,30-16,98
KIGOMA	7/100	7,00	3,43-13,75	14/136	10,29	6,23-16,54
TOTAL	68/977	6,96	5,52-8,73	69/1052	6,56	5,21-8,21

Tabelle 8: FECRs unter Einbeziehung aller vor ODER nach Entwurmung positiven Individuen, dazugehöriges Konfidenzintervall und CR (%)

Schule	Paare	FECR %	95 % KI	CR %
NGOMA	2	4,78	0,03-45,29	0
MBAZI	7	6,16	0,03-49,87	28
RANGO	4	57,76	2,80-83,98	50
MUGOGWE	6	76,99	24,43-90,33	50
SHOLI	15	2,45	0-23,52	40
GATHOVU	4	98,39	78,78-99,99	100
KARAMA	13	5,64	0,05-40,56	46
SOVU	17	87,91	78,06-95,19	65
MARABA	9	26,01	2,05-55,81	44
KIGOMA	15	1,06	0-10,77	47
TOTAL	92	10,90	0,42-26,34	49

In den Schulen Githovu und Tumba war keine der untersuchten Proben positiv auf Hakenwürmer.

Bei allen von uns untersuchten Schulen lag die FECR mit Ausnahme von Gathovu unter 90% und damit unter der in der Literatur angenommenen Sensitivitätsschwelle. Bei Kigoma ist sie mit nur ein Prozent am niedrigsten. Die CR schwankt zwischen null und 100 % stark, insgesamt gesehen ist sie aber mit Ausnahme von Gathovu, das allerdings mit nur vier Proben repräsentiert wird, zwischen 28 und 65 % eher ungenügend.

Da es auch hier unter Einbeziehung der vor Entwurmung negativen Kinder zu sehr niedrigen FECRs mit sehr breiten KI bei Ngoma, Mbazi, Sholi, Karama und Kigoma kam, wurden zum Vergleich in einer zweiten Berechnung nur paarige Proben ausgewertet, deren Untersuchungsergebnis mittels Mini- FLOTAC Kammer vorher positiv war.

Tabelle 9: Berechnung der FECRs OHNE Einbeziehung vorher negativer Individuen und zugehörige KI

Schule	Paare	FECR %	KI %
MBAZI	2	n.b. ^a	n.b. ^a
RANGO	4	57,83	0,74-84,15
MUGOGWE	4	92,65	64,87-99,73
SHOLI	6	96,69	51,37-99,96
GATHOVU	4	98,51	80,20-100
KARAMA	7	82,24	41,25-98,04
SOVU	12	98,63	93,14-99,88
MARABA	6	64,60	23,01-84,07
KIGOMA	7	97,89	73,88-99,69
TOTAL	52	89,88	84,41-94,39

a= n.b.: auf Grund der niedrigen Probenanzahl kam es hier bei der Berechnung der FECR mittels Markov- Kette zu irreführenden Ergebnissen, weshalb auf die Darstellung verzichtet wird.

Für die Schulen Ngoma, Githovu und Tumba lagen keine paarigen Proben vor.

In drei (Rango, Karama, Maraba) der neun ausgewerteten Schulen konnten Anzeichen für die Bildung resistenter Wurmpopulationen nachgewiesen werden.

4.1.4 Statistischer Vergleich zwischen städtischem und ländlichem Gebiet

Signifikante Unterschiede in den Prävalenzen von städtischen und ländlichen Gebieten zeigten sich bei *Ascaris* sp. und den MDS vor Entwurmung und bei *Ascaris* sp. nach Entwurmung, die p- Werte sind in der Tabelle in Fettdruck dargestellt.

Bei *T. trichiura* ließ sich sowohl vor als auch nach der Entwurmung kein signifikanter Unterschied der Prävalenzen feststellen, sie blieben auch zwischen einem und fast 3,5 % vor und nach Entwurmung eher niedrig.

Tabelle 10: Prävalenz der Spezies von städtischem und ländlichem Gebiet VOR Entwurmung, angegeben in Prozent, dazugehörige KI und p-Werte

Spezies	Gebiet	Prävalenz %	95 % KI	p- Wert
<i>Ascaris</i> sp.	Stadt	15,85	9,51-25,26	0,0005695
	Land	33,63	30,61-36,79	
<i>T. trichiura</i>	Stadt	2,44	0,67-8,46	0,6835
	Land	3,46	2,45-4,87	
MDS	Stadt	1,22	0,21-6,59	0,01798
	Land	7,49	5,94-9,40	

Tabelle 11: Prävalenz der Spezies von städtischem und ländlichem Gebiet NACH Entwurmung, angegeben in Prozent, dazugehörige KI und p- Werte

Spezies	Gebiet	Prävalenz %	95 % KI	p- Wert
<i>Ascaris</i> sp.	Stadt	4,25	1,67-10,44	0,004864
	Land	13,57	11,55-15,88	
<i>T. trichiura</i>	Stadt	1,06	0,18-5,78	0,3929
	Land	2,60	1,77-3,82	
MDS	Stadt	2,13	0,58-7,43	0,05288
	Land	6,99	5,54-8,79	

4.1.5 Schweineproben

In den Dörfern der jeweiligen Schulen wurden im Jahr 2014 insgesamt 502 Proben von dort lebenden Schweinen gesammelt und parasitologisch mittels der Flotationsmethode Mini-FLOTAC auf *Ascaris* sp., *T. suis* und MDS untersucht. Von 502 gesammelten Proben waren 452 positiv auf eine oder mehrere Spezies, das entspricht einer Gesamtprävalenz von 90,04 % (95 % KI von 87,11 bis 92,36). In den Dörfern Tumba und Ngoma wurden zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen keine Schweine gehalten.

In Tabelle 12 sind die Prävalenzen von *Ascaris* sp., *T. suis* und den MDS einzeln angeführt.

Tabelle 12: Prävalenzen der einzelnen Wurm��pezies in Schweinen mit 95 % KI

Dorf	Probenanzahl		Prävalenz %	95% KI
MBAZI	36	<i>Ascaris</i> sp.	41,67	27,14-57,80
		<i>T. suis</i>	11,11	4,41-25,31
		MDS	72,22	56,01-84,15
RANGO	49	<i>Ascaris</i> sp.	42,86	30,02-56,73
		<i>T. suis</i>	22,45	13,03-35,88
		MDS	81,63	68,64-90,02
MUGOGWE	50	<i>Ascaris</i> sp.	36,00	24,14-49,86
		<i>T. suis</i>	10,00	4,35-21,36
		MDS	78,00	64,76-87,25
SHOLI	56	<i>Ascaris</i> sp.	76,79	64,23-85,90
		<i>T. suis</i>	14,29	7,42-25,74
		MDS	92,86	83,03-97,19
GATHOVU	56	<i>Ascaris</i> sp.	39,29	27,58-52,37
		<i>T. suis</i>	10,71	5,00-21,47
		MDS	80,36	68,16-88,66
KARAMA	52	<i>Ascaris</i> sp.	80,77	68,10-89,20
		<i>T. suis</i>	28,84	18,33-42,27
		MDS	94,23	84,36-98,02
GITHOVU	27	<i>Ascaris</i> sp.	18,51	8,18-36,70
		<i>T. suis</i>	0	0
		MDS	81,48	63,30-91,82
SOVU	60	<i>Ascaris</i> sp.	46,67	34,63-59,11
		<i>T. suis</i>	10,00	4,66-20,15
		MDS	83,33	71,97-90,69
MARABA	59	<i>Ascaris</i> sp.	62,71	49,95-73,92

		<i>T. suis</i>	16,94	9,48-28,46
		MDS	93,22	83,83-97,33
TOTAL	452/502		90,04	87,11-92,36

Vergleicht man die mittleren Prävalenzen der in den Schweineproben vorkommenden Spezies untereinander, so lässt sich bei allen Vergleichen ein signifikanter Unterschied (P- Wert <0,00001) errechnen.

Die MDS kommen mit der höchsten Prävalenz, *T. suis* mit der niedrigsten Prävalenz vor. *Ascaris* sp. wurde bei etwas mehr als der Hälfte der Proben gefunden. Die Prävalenzen von *Ascaris* sp. und den MDS sind deutlich höher als die *T. suis* Prävalenzen.

Tabelle 13: Mittlere Prävalenzen der Spezies

	Anzahl von TOTAL	Prävalenz % ¹	95 % KI
<i>Ascaris</i> sp.	260/502	51,93	47,43-56,13
<i>T. suis</i>	72/502	14,34	11,55-17,68
MDS	421/502	83,86	80,39-86,82

1= die Prävalenzen unterschieden sich alle mit einer Signifikanz <0,00001.

4.1.6 Prävalenzvergleich interspezifisch

In den folgenden Grafiken sind die Korrelationen zum Vorkommen der einzelnen Spezies bei den beiden Wirten Mensch und Schwein dargestellt. Bei *Trichuris* sp. ist die Korrelation nicht signifikant, bei *Ascaris* sp. und den MDS deutlich. Alle Korrelationen wurden mittels Spearman-Korrelation berechnet.

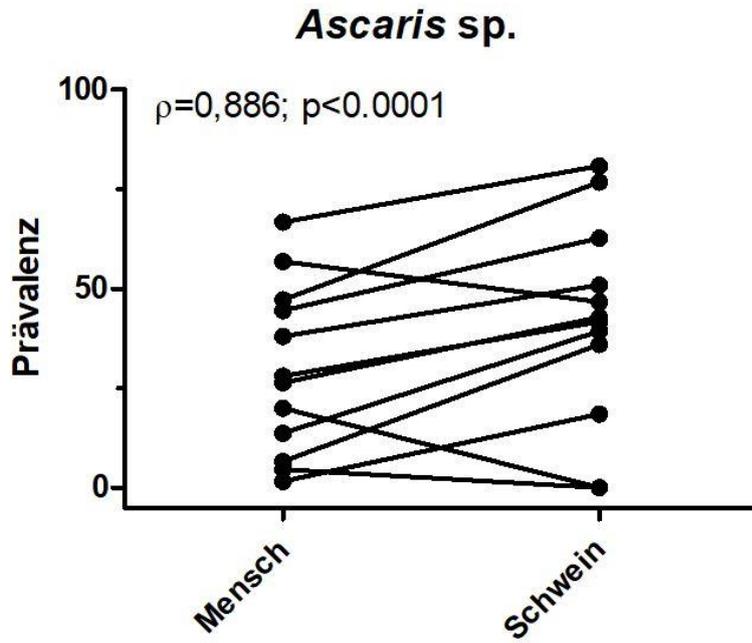


Abbildung 1: Korrelation zum Vorkommen von *Ascaris* sp. bei Mensch und Schwein.

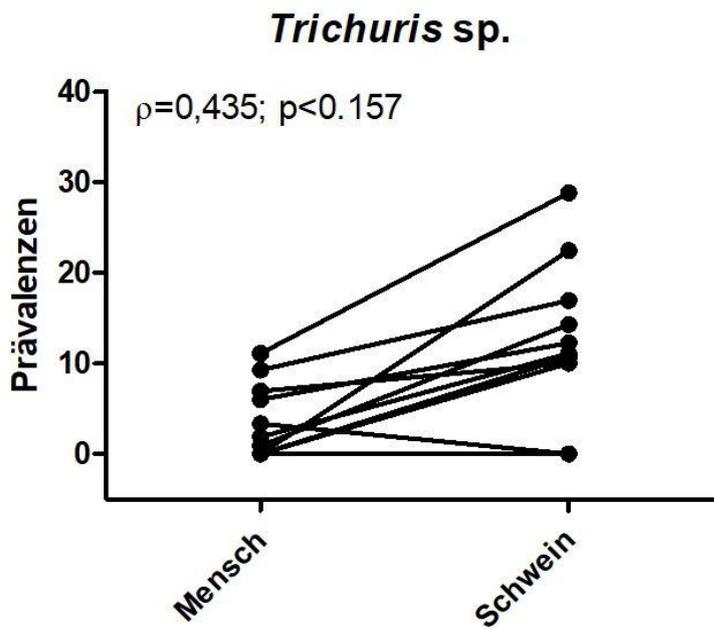


Abbildung 2: Korrelation zum Vorkommen von *Trichuris* sp. bei Mensch und Schwein, Korrelationskoeffizient und p-Wert.

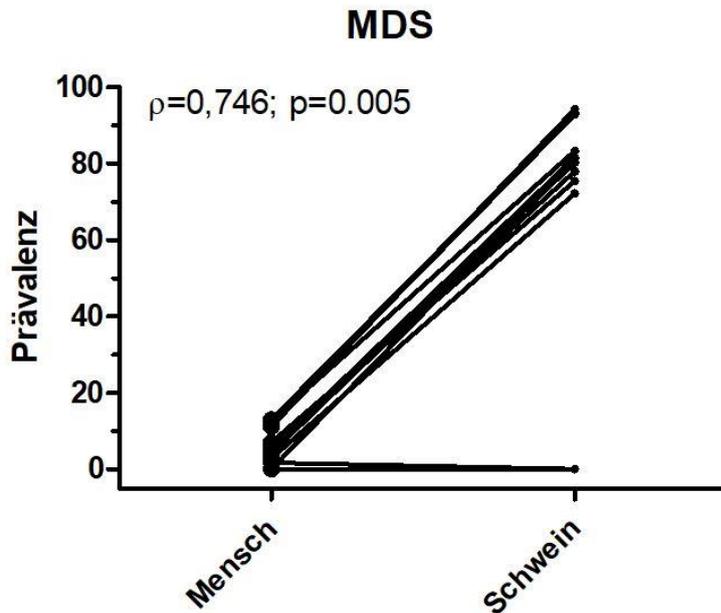


Abbildung 3: Korrelation zum Vorkommen von MDS bei Mensch und Schwein, Korrelationskoeffizient und p-Wert.

Die Prävalenz für *Ascaris* sp. ist in Karama bei den untersuchten Schweinen mit circa 80 % die höchste, bei den Schulkindern war die Prävalenz mit 66,67 % in Karama ebenfalls am höchsten.

4.2 Parasitologische Kotuntersuchungsverfahren 2015

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse von 2014 wurde beschlossen, den Fokus sowohl parasitologisch als auch in weiterer Folge molekularbiologisch auf *Ascaris* sp. zu legen. Daher wurden die Daten von 2015 nur für *Ascaris* sp. ausgewertet und angegeben.

Es wurde versucht, entsprechend den 2014 generierten Proben und Untersuchungsergebnissen, aus allen Schulen, bei denen Anzeichen für die Bildung resistenter Wurmpopulationen von *Ascaris* sp. nachgewiesen werden konnten, Proben zu sammeln (Ngoma, Mbazi, Gathovu, Sovu, Kigoma).

Es konnten erneut Proben aus allen Schulen gesammelt werden, zusätzlich gelang es, eine geringe Anzahl an Proben aus Sholi zu sammeln.

Tabelle 14: Prävalenzen und Konfidenzintervalle (KI) für *A. sp.*

Schulen	Kinder vor Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI	Kinder nach Entwurmung/ +	Prävalenz %	95 % KI
NGOMA	5/33	15,15	6,65-30,92	1/22	4,54	0,81-21,80
MBAZI	12/47	25,53	15,25-39,51	1/32	3,12	0,55-15,74
GATHOVU	9/79	11,40	6,11-20,25	6/61	9,84	4,59-19,84
KIGOMA	4/47	8,51	3,36-19,93	5/64	7,81	3,38-17,02
SHOLI	1/6	16,67	3,01-56,35	0/1	0	0-79,34
TOTAL	31/212	14,62	10,50-20,01	13/180	7,22	4,27-11,96

Tabelle 15: FECRs, Konfidenzintervalle und CRs für *Ascaris sp.* unter Einbeziehung aller vor ODER nach Entwurmung positiven Kinder

Schulen	Paare	FECR %	95 % KI %
NGOMA	2	69,80	62,34-75,21
MBAZI	6	99,97	99,71-100
GATHOVU	10	65,69	60,02-71,60
KIGOMA	5	0,53	0-6,42
TOTAL	23	77,77	75,41-79,92

In drei (Ngoma, Gathovu, Kigoma) der vier untersuchten Schulen zeigen sich hier deutliche Hinweise auf verminderte Resistenzen und auch die Gesamtprävalenz liegt deutlich unter 90 %.

Die Berechnung der FECR ohne vorher negative Individuen war nur für Gathovu und Kigoma möglich, da uns bei den anderen Schulen ausschließlich Proben vorlagen, die vorher positiv und nachher reduziert oder negativ waren.

Tabelle 16: FECRs aller Schulen OHNE Berücksichtigung der vorher negativen Individuen, dazugehörige KI und CR (%)

Schulen	Paare	FECR %	95 % KI %	CR %
NGOMA	2	69,80	62,34-75,21	50,00
MBAZI	6	99,97	99,71-100	100
GATHOVU	5	99,94	99,39-100	100
KIGOMA	2	80,62	61,14-89,12	50,00
TOTAL	15	92,98	91,84-94,16	87,00

In Sholi konnte auf Grund der niedrigen Anzahl an Proben kein Paar gesammelt werden.

Lässt man die vorher negativ und nachher positiven Kinder aus der Berechnung, ergeben sich noch bei zwei von vier auswertbaren Schulen deutliche Hinweise auf verminderte Wirksamkeit von Albendazol und das Risiko der Entstehung resistenter Wurmpopulationen (Ngoma, Kigoma).

4.3.1. Identifizierung putativer „SNPs“ in den Codons 167, 198 und 200

Wie in Abschnitt 4.2 (Parasitologische Kotuntersuchungsverfahren 2015) bereits erwähnt wurde der Fokus molekularbiologisch ausschließlich auf *A. lumbricoides* gelegt.

Die PCRs, die zur Identifizierung putativer, mit BZ-Resistenz des β -Tubulins assoziierter SNPs verwendet wurden, wurden neu etabliert und das erste Mal durchgeführt. Hierzu wurden Primer, die verwendet wurden, anhand der Sequenzen in GenBank® konzipiert. Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der verschiedenen Primer wurden in einem ersten Schritt Gradienten PCRs von 50° - 60°C und von 60° - 70°C mit der DNA eines aus Ruanda importierten, adulten *A. suum*- Exemplares durchgeführt.

Da die Qualität der DNA aus den Humanstuhlproben, die für die PCRs verwendet wurden, deutlich schlechter war, zeigten sich in den ersten Durchführungen ausschließlich multiple Banden, weshalb in einem weiteren Schritt „(semi)- nested“ Primer für alle Proben konzipiert wurden und diese fortan in „(semi)- nested“- PCRs zur Anwendung kamen.

Die PCR-Produkte der Standard PCRs wurden als Vorlagen für die (semi)- nested PCRs eingesetzt. Nach erfolgreicher Durchführung der (semi)- nested PCRs wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und das Material zur Sequenzierung zu LGC Biotech geschickt. Die

Ergebnisse der Sequenzierung wurden mittels des Programmes BioEdit in Form von Chromatogrammen dargestellt und ausgewertet.

Die folgende Abbildung 4 zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer repräsentativen Probe mit dem gesamten Codon 167 in Fettdruck dargestellt. Die Basen TTC entsprechen bei Isotyp Asutbb1.2 in dieser Lage Codon 167. Die Änderung einer Aminosäure würde sich in einem deutlich ausgeprägten Ausschlag des zu Grunde liegenden Chromatogramms beziehungsweise einer Überlagerung des Ausschlags der ursprünglichen Base darstellen.

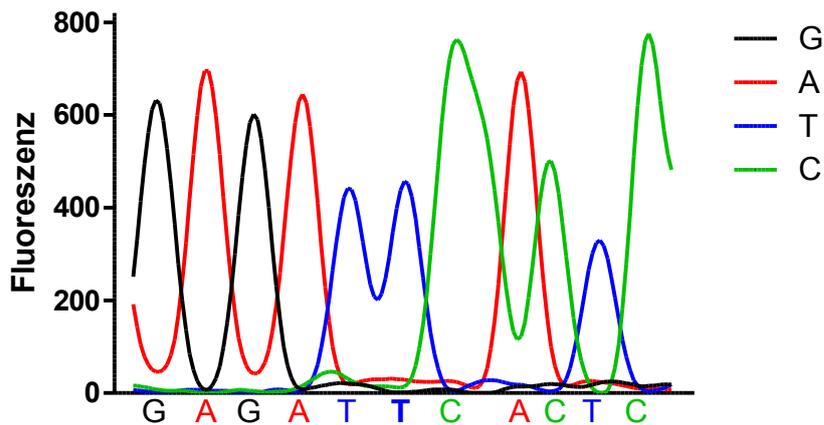


Abbildung 4: Chromatogramm von P378a, Analyse mittels Zielsequenzen von Asutbb-1.2. Der relevante SNP ist in Fettdruck dargestellt.

4.3.2. Tabellen aller untersuchten SNPs

Von allen gesammelten Proben konnten 43 Stück erfolgreich sequenziert und für weitere molekularbiologische Analysen verwendet werden. Bei keiner der vorliegenden Proben gelang der Nachweis eines SNPs irgendeiner der vier zum Vergleich herangezogenen Isotypen, weswegen die Ergebnisse in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

Tabelle 17: Darstellung der Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene

Isotyp	Anzahl amplifizierbarer Proben	Codon 167	Codon 198	Codon 200	SNPs
β- Tubulin 1	38	TTC	GAG	TTT	0
β- Tubulin 2	39	TTC	GAA	TTT/C	0
β- Tubulin 4	39	TTC	GAG	TTC	0
β- Tubulin 1.2	40	TTC	GAG	TTC	0

5. Diskussion

Das MOPACUR Projekt war eine Kooperation der Charité Berlin mit der Freien Universität Berlin, dem Ministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen: 01D613006A, MOPACUR), dem CHUB („University Teaching Hospital Butare“) in Ruanda und dem Robert-Koch-Institut Berlin. In Ruanda finden zweimal jährlich staatliche Entwurmungskampagnen statt und MOPACUR begleitete die Kampagnen im September 2014 und Ende September/Anfang Oktober 2015. Mit der vorliegenden Studie sollte im Rahmen des Projektes die mögliche Entwicklung von Resistenz durch regelmäßige Entwurmung parasitologisch untersucht werden und mögliche Resistenzmechanismen molekularbiologisch analysiert werden. Zusätzlich sollte die Untersuchungsmethode Mini-FLOTAC als zusätzliche Möglichkeit zur Evaluierung des Parasitenbefalls den vor Ort untersuchenden Parasitologen bei- und nähergebracht werden.

Die WHO empfiehlt in Gebieten, in denen STHs endemisch sind, die jährliche ein- bis zweimalige Entwurmung mit Albendazol oder Mebendazol der gesamten Risikopopulation mit Ausnahme von Kindern unter einem Jahr und Schwangeren im ersten Trimester (WHO, 2006). Seit 2008 wird in Ruanda regelmäßig zumindest einmal im Jahr entwurmt, um die gesundheitliche Belastung durch Infektionen mit STHs bei Vorschul- und Schulkindern einzudämmen bzw. längerfristig auf ein Minimum zu reduzieren und schlussendlich auszuschalten (Ruxin and Negin 2012). Vor der von uns durchgeführten Studie wurde insgesamt siebenmal entwurmt. Das wirft die Frage nach der möglichen Selektion resistenter Wurmpopulationen auf.

Im Rahmen der Studie wurden humane Stuhlproben und Schweinekotproben mittels Mini-FLOTAC Zählkammer auf Wurmeier der Spezies *Ascaris* sp., *Trichuris* sp. und Magendarmstrongyloiden untersucht. Vor der Entwurmung waren im Jahr 2014 insgesamt 314 Stuhlproben koproskopisch positiv auf eine oder mehrere der oben genannten Wurmspezies, nach der Entwurmung 134. 2015 fanden wir vor Entwurmung bei 31 und nach Entwurmung bei 13 Kindern eine oder mehrere Spezies im Kot.

5.1 Prävalenzen

Unsere Studie ergab für die humanen Proben Prävalenzen der einzelnen Wurmspezies von knapp einem (0,9) bis zu 66 %. Die Prävalenz der Hakenwürmer schwankte je nach untersuchter Schule zwischen Werten von 1,67 (Ngoma) bis knapp 13 % (12,97 %; Maraba). In Githovu und Tumba war keine der Proben in der mikroskopischen Untersuchung positiv auf

Hakenwürmer. Bei *T. trichiura* lagen die Prävalenzen in den Schulen zwischen 0,9 und 11,1 %, auch hier konnten in zwei Schulen (Gathovu, Githovu) keine positiven Proben gefunden werden. Die Prävalenzen von *Ascaris* sp. schwankten zwischen 1,6 und 66,6 %, diese Spezies kam in jeder Schule vor.

Vergleicht man die Gesamtprävalenzen so fällt auf, dass *Ascaris* sp. sowohl vor (32,14 %) als auch nach der Entwurmung (12,74 %) mit den höchsten Prävalenzen vorkommt. Die Hakenwürmer kommen vor und nach der Entwurmung mit annähernd derselben Gesamtprävalenz vor (6,96; 6,56 %). Interessant hierbei ist, dass es Schulen gibt, bei denen die Prävalenz vor Entwurmung niedriger (Ngoma 1,67 %; Mbazi 2,80 %; Kigoma 7%) und nachher höher war (2,70; 7,92; 10,29%). Im Falle von Mbazi war die Prävalenz nachher beinahe um das Dreifache erhöht.

Sieht man sich die Prävalenzen zwischen städtischem und ländlichem Gebiet vor der Entwurmung an, so gibt es bei *Ascaris* sp. (15,85; 33,63 %) und den MDS (1,22; 7,49 %) signifikante Unterschiede. Nach der Entwurmung gab es nur bei *Ascaris* sp. (4,25; 13,57 %) einen signifikanten Unterschied.

Die mittleren Prävalenzen der Schweine korrelieren bei *Ascaris* sp. und den MDS deutlich mit den beim Menschen gefundenen Prävalenzen. Die Prävalenz für *Ascaris* sp. ist in Karama bei den untersuchten Schweinen mit circa 80 % die höchst gefundene, bei den Schulkindern war die Prävalenz mit 66,67 % in Karama ebenfalls am höchsten. Die MDS wiesen die höchste Prävalenz mit circa 94 % in Maraba auf, bei den Kindern lag sie hier zwar nur bei 12,97 %, war aber insgesamt betrachtet auch die am höchsten gefundene. Es ist also gut möglich, dass hier ein Zusammenhang besteht, da in Ruanda die Menschen ihre Schweine sehr nahe am und teilweise im Haus halten und dadurch die Hygiene leidet bzw. für Kinder unzureichend ist und der Infektionsdruck höher wird. Auch dass es sich hierbei im Falle von *Ascaris* sp. teilweise um Zoonosen handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, da zumindest *A. lumbricoides* nachweislich beide Wirte befallen kann (Nejsun, Grondahl et al. 2006, Nejsun, Bertelsen et al. 2010, Nejsun, Betson et al. 2012).

Das nationale Institut für Statistik Ruanda veröffentlichte 2011 die „2010/11 Integrated Household Living Conditions Survey (EICV3)“, eine Studie, die Armut und Lebensbedingungen in Ruanda dokumentiert und in dieser Form seit 2009 veröffentlicht wird. Für den Bezirk Huye wurden repräsentative Daten aus 14.308 Haushalten gesammelt. Laut dieser Studie gelten 47 % der Menschen in Huye als arm, davon 21,4 % als arm und 25,2 % als extrem arm (Rwanda 2011). Dies könnte die großen Unterschiede und Schwankungsbreite unserer Ergebnisse erklären, da die in unserer Studie vorkommenden Schulen über den gesamten Bezirk verteilt waren. Leider gibt es in der vorliegenden Studie keine konkreten Angaben zur Verteilung der

Armut, aber es ist auf Grund der vor Ort gesammelten Erkenntnisse anzunehmen, dass es infrastrukturelle Unterschiede zwischen Stadt und Land gibt. Githovu zum Beispiel gilt unter den vor Ort lebenden Ruandesen als eher städtischer Bezirk, hier kamen zwei (*T. trichiura*, Hakenwürmer) der untersuchten Wurmspezies gar nicht vor. Im Jahr 2008 wurden in einer Querschnittsstudie, in der über 8000 Schulkinder beprobt wurden, erste Zahlen zu Prävalenzen von STHs in Ruanda veröffentlicht. *Ascaris lumbricoides* war mit einer Gesamtprävalenz von 38,6 % und die Hakenwürmer mit 31,6 % vertreten (Ruxin and Negin 2012). Staudacher et al. (2014) kamen in ihrer Studie zu einem fast identischen Ergebnis. Sie untersuchten Humanstuhlproben von Schulkindern mittels Kato- Katz- Methode und PCR Assays und fanden eine Prävalenz von *A. lumbricoides* von 38 % im ländlichen Gebiet. Sie untersuchten jeweils eine Schule in der Stadt und auf dem Land. In der städtischen Schule lag die Prävalenz von *A. lumbricoides* bei 18 %. Im direkten Vergleich der ländlichen Schule, die Staudacher et al. beprobt hatten, fanden wir 2014 eine um beinahe zwei Drittel gesunkene Prävalenz (13,68 %). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass der Vergleich anhand nur einer Schule nicht sehr zuverlässig ist.

Albonico et al. (2003) fanden auf der Insel Pemba Island, Zanzibar, bei 914 Schulkindern Prävalenzen der Spezies *A. lumbricoides*, *T. trichiura* und der Hakenwürmer zwischen 57 und 96%. Pemba Island ist die kleinere der zwei Inseln und gehört geographisch zu Zanzibar. Hier werden Schulkinder seit 1994 regelmäßig mit Mebendazol entwurmt. Die Prävalenzen von *A. lumbricoides* waren mit Abstand die niedrigsten und lagen zwischen 57 und 62 %. Die Prävalenzen sowohl von *T. trichiura* als auch den Hakenwürmern waren deutlich höher, sie bewegten sich hier zwischen 90 und 94, respektive 94 und annähernd 97 %. Alle Proben wurden in jener Studie ausschließlich mittels Ausstrich nach Kato- Katz untersucht (Albonico, Bickle et al. 2003). Die Anzahl an Studienteilnehmern in unserer und der Studie von Albonico et al. (2003) ist annähernd gleich, dennoch unterscheiden sich die Prävalenzen bei *T. trichiura* und den Hakenwürmern deutlich. Auf Pemba Island wird alle 4 bis 6 Monate entwurmt, die Frequenz ist also etwas höher als in Ruanda und könnte damit einen höheren Selektionsdruck bedeuten (Renghanatan E, Evolution of operational reserach and developement of a national control strategy against intestinal helminths in Pemba Island, 1988-92; WHO 2006). Außerdem wurde hauptsächlich Mebendazol zur Entwurmung verwendet, das alleine nachweislich keine ausreichende Wirksamkeit gegen die Hakenwürmer und *T. trichiura* aufweist (Albonico, Engels et al. 2004, Vercruysse, Behnke et al. 2011).

Kaminsky et al. (2005) untersuchten Prävalenzen der STHs in Belize, um ihre Untersuchungsergebnisse zur Erstellung eines landesweiten Strategieplanes zur Kontrolle und Eindämmung von STHs zu nutzen. Zur Untersuchung wurden 500 Kinder aus jeweils vier urbanen und sechs ländlichen Schulen in zwei südlichen Bezirken von Belize herangezogen,

die vorher noch nie im Rahmen einer öffentlichen Kampagne entwurmt worden waren. Auch Kaminsky et al. (2005) zogen in ihrer Studie den Vergleich zwischen städtischem und ländlichem Gebiet. Bei *A. lumbricoides* lagen die Prävalenzen im urbanen Gebiet zwischen vier und 32 %, im ländlichen zwischen 22,5 und 60 %. *Trichuris trichiura* war im städtischen Gebiet mit einer Prävalenz zwischen 26 und 60, im ländlichen mit 18 bis 60 % vertreten. Die Prävalenzen der Hakenwürmer bewegten sich zwischen null und 12 % im urbanen und zwei bis 54 % im ländlichen Gebiet (Kaminsky, Ault et al. 2014). Auch hier sind die Prävalenzen der Hakenwürmer und *T. trichiura* circa drei- bis fünfmal höher als die in unserer Studie gefundenen, aber nicht so hoch wie in Pemba Island, wo vor der von uns zitierten Studie regelmäßig entwurmt wurde (Albonico, Bickle et al. 2003).

Davis et al. (2014) untersuchten die STH- Prävalenzen bei 692 Kindern, 205 im Vorschul-, 487 im Schulalter, in zwei Slums in Nairobi, Kenia. Auch in Kenia wird unter Einhaltung der Richtlinien der WHO regelmäßig entwurmt, allerdings wurde Nairobi bisher vom nationalen Entwurmungsprogramm ausgenommen, da Studien nur sehr niedrige Prävalenzen zeigten (Mwanthi, Kinoti et al. 2008). Die Autoren nahmen an, dass die Prävalenzen hoch genug sein würden, um für Entwurmungen, wie sie laut der WHO vorgesehen sind, zu qualifizieren. Die Prävalenz war hier bei Kindern im Vorschulalter für *A. lumbricoides* mit 24 % geringgradig höher als bei den Schulkindern mit einer Prävalenz von knapp 23 %. *Trichuris trichiura* kam bei Vorschulkindern mit einer Prävalenz von 24 %, bei Schulkindern mit einer Prävalenz von knapp 29 % vor. Die Hakenwürmer kamen bei Schulkindern mit einer Prävalenz von 0,2 % am seltensten vor, keine der Proben von Vorschulkindern war positiv auf diese Spezies (Davis, Worrell et al. 2014). Wir untersuchten 977 Proben, also nur knapp ein Drittel weniger als in der Studie von Davis et al. (2014), fanden aber Prävalenzen von *A. lumbricoides* von bis zu 66%.

In einer Studie in Äthiopien untersuchten Alemu et al. (2016) das Vorkommen von STHs und *Schistosoma mansoni* bei 401 Vorschulkindern, die vorberichtlich in den vier Wochen vor Beginn der Studie nicht entwurmt worden waren. Die verschiedenen Spezies waren hier in den unterschiedlichen Schulen mit Prävalenzen von 10- 24 % (*A. lumbricoides*), 14- 43 % (*T. trichiura*) und 11- 23 % (Hakenwürmer) vertreten (Alemu, Tegegne et al. 2016).

Sunish et al. (2015) beschrieben in ihrer Studie in Indien von 2001-2010 das Sinken der Gesamtprävalenz der STHs in einer über sieben Jahre mit Diethylcarbamazin und Albendazol behandelten Gruppe von 60,4 auf 12,5 %. Objekt der Studie waren Schulkinder im Alter von neun bis zehn Jahren aus 18 Dörfern und deren zugehörigen Schulen, die vor Durchführung der Studie noch nie im Zuge einer offiziellen Entwurmungskampagne mit Anthelminthika gegen Endoparasiten behandelt worden waren. Die Kinder wurden in zwei Gruppen zu je neun Dörfern aufgeteilt, in denen *A. lumbricoides* mit einer Prävalenz von 54,8 beziehungsweise

52,9 %, die Hakenwürmer mit 16,5 respektive 8,3 % und *T. trichiura* mit 4,7 und 6,8 % vorkamen (Sunish, Rajendran et al. 2015). Es wurde einmal im Jahr entwurmt, eine Gruppe mit Diethylcarbamazin, die andere mit einer Kombination aus Diethylcarbamazin und Albendazol. In der Gruppe, die mit Diethylcarbamazin und Albendazol behandelt wurde, war die Reinfektionsrate mit 50 % deutlich niedriger als in der ausschließlich mit Diethylcarbamazin behandelten Gruppe (>80%). Hier sank die Gesamtprävalenz auch nur marginal von 58,8 auf 52,7 % (Sunish, Rajendran et al. 2015).

Die Wirksamkeit einer anthelminthischen Behandlung wird anhand von CR und FECR festgemacht. Dennoch sollte, um davon auszugehen, dass die regelmäßige Behandlung über einen längeren Zeitraum wirksam ist und korrekt durchgeführt wird, auch die Prävalenz sinken, weil Erfolg der Behandlung auch an geringeren Reinfektionsraten gemessen wird (Jia, Melville et al. 2012). Betrachtet man die Daten aus Zanzibar, wo seit 1994 entwurmt wird, findet man im Jahr 2003 Prävalenzen von 57 bis zu 97 % (Albonico, Bickle et al. 2003). Möglicherweise zeichnet sich hier die Auswirkung, wenn bestimmte anthelminthische Stoffklassen, die gegen gewisse Spezies nachweislich geringe Wirksamkeit haben in der Entwurmung unregelmäßig und in nicht ausreichender Dosierung zum Einsatz kommen, ab (Albonico, Bickle et al. 2003, Moser, Schindler et al. 2017). Der andauernde Selektionsdruck durch zu häufige Anwendung nicht ausreichender Dosen und nicht breit genug gefächerte Massenentwurmungen hat hier zur Bildung resistenter Wurmpopulationen beigetragen. Dies bestätigt auch das bei Sunish et al. (2015) gefundene Ergebnis, hier sanken die Prävalenzen in neun Jahren der regelmäßigen, organisierten anthelminthischen Behandlung aller STHs von knapp 60 auf knapp zwölf Prozent, diese Zahlen sprechen für die Wirksamkeit der Anwendung und gegen die Bildung resistenter Populationen bei korrekt durchgeführter Entwurmung (Sunish, Rajendran et al. 2015). Die höchsten Prävalenzen bei den STHs sind nicht immer bei *A. lumbricoides* zu finden. Einzig in der Studie in Indien hat *A. lumbricoides* mit 54,8 in der einen beziehungsweise 52,9% in der anderen zur Untersuchung herangezogenen Gruppe deutlich die höchste Prävalenz (Sunish, Rajendran et al. 2015). Die Prävalenz schwankt nicht so breit wie zum Beispiel in unserer Studie (1,6 bis 66 %). In Zanzibar und Kenia schwanken die Prävalenzen von *A. lumbricoides* auch nicht so deutlich, in Zanzibar schwanken sie zwischen den untersuchten Schulen um fünf Prozent, beziehungsweise unterscheiden sich in Kenia in den untersuchten Schulen um ein Prozent (Albonico, Bickle et al. 2003, Davis, Worrell et al. 2014). Die größte Schwankungsbreite weisen die in unserer Studie gefundenen Prävalenzen von *A. lumbricoides* auf (1,6- 66 %). Sowohl die Hakenwürmer als auch *T. trichiura* kommen in anderen Studien mit sehr breiten Streuungen an Ergebnissen vor. *Trichuris trichiura* kommen in unserer Studie zum Beispiel mit einer Prävalenz von 0,9 % vor, in anderen Studien (Albonico, Bickle et al. 2003) mit einer Prävalenz von 94 % (Zanzibar). Nicht außer Acht

gelassen werden sollten die geographischen Gegebenheiten einzelner Länder im Bezug auf die Wurmprävalenzen. Denn je nach Lage des Landes variieren auch die gegebenen Lebensräume und Überlebenschancen der Parasiten im Hinblick auf z.B. Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Fauna und Bodenqualität. Vergleicht man die geographischen Gegebenheiten, so sind Kenia, Äthiopien und Ruanda ostafrikanische Staaten in nächster Nähe, einzig Ruanda liegt komplett unter dem Äquator. Kenia grenzt an den indischen Ozean, Äthiopien und Ruanda haben keine Küste, wobei Ruanda das zentralst gelegene Land ist. Kenia und Äthiopien weisen in den vorliegenden Studien, außer bei den Hakenwürmern, die in der Studie in Kenia so gut wie gar nicht vorkamen (0,2%), sehr ähnliche Prävalenzen auf (Davis, Worrell et al. 2014, Alemu, Tegegne et al. 2016). *Ascaris lumbricoides* hat in Ruanda hohe Prävalenzen, beziehungsweise bei *T. trichiura* und den Hakenwürmern ähnliche, niedrige Prävalenzen (Ruxin and Negin 2012, Staudacher, Heimer et al. 2014). Die vorliegenden Studien sind nicht repräsentativ für das ganze Land, dennoch werfen die Gemeinsamkeiten die Frage nach der Rolle geographischer Gegebenheiten auf. Auf Zanzibar, einer Insel, konnten bei zwei der drei untersuchten Wurmspezies die höchsten Prävalenzen gefunden werden, die bei *A. lumbricoides* gefundene Prävalenz ist die zweithöchste gefundene (Albonico, Bickle et al. 2003). Allerdings scheint hier auch die Möglichkeit zu bestehen, dass jahrelange Massenentwurmung resistente Wurmpopulationen hervorgebracht hat. Da Zanzibar eine Insel ist, ist der Neueintrag nicht selektierter *A. lumbricoides*-Populationen durch Waren- und Menschenverkehr auf dem Wasserweg nicht so schnell gegeben, die dort ansässigen Wurmpopulationen, die dem Selektionsdruck ausgesetzt waren, waren über Jahre die gleichen. Vergleicht man die Prävalenzen interkontinental, sieht man, dass die Hakenwürmer und *T. trichiura* in der Studie in Indien mit den niedrigsten Prävalenzen vorkommen (Sunish, Rajendran et al. 2015). Das Alter der untersuchten Kinder scheint keine signifikante Rolle zu spielen, in allen Studien wurden Kinder im Vorschul- oder Schulalter bis zu zwölf Jahren beprobt. Sowohl bei Vorschulen bei der Studie in Kenia als auch bei Schulen in unserer Studie in Ruanda kam es vor, dass keine Hakenwurmeier gefunden wurden.

Die WHO spricht sich auch in ihrer aktuell herausgegebenen Empfehlung dafür aus, dass in einer Region, in der STHs mit bzw. ab einer Prävalenz von 20 % vorkommen, entwurmt werden sollte (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258983/1/9789241550116-eng.pdf?ua=1>). Sie sprechen von einer „strong recommendation“, dies bedeutet, dass der positive Effekt der Chemotherapie die Nachteile überwiegt. Denn die präventive Chemotherapie soll Lebensqualität steigern und Sterblichkeit verhindern beziehungsweise vermindern. Es gibt einen Zusammenhang zwischen Prävalenz und Infektionsintensität. Je höher die Prävalenz in einer Region steigt, desto höher ist die Chance, dass es hier auch zu hochgradigem Befall mit Würmern kommen kann (Montresor, N et al. 2014).

5.2 Quantitative Daten der parasitologisch untersuchten Stuhlproben

Die epg gibt die Anzahl an Eiern pro Gramm Kot in einer untersuchten Probe an. Untersucht man eine Kotprobe mittels Mini- FLOTAC- Zählkammer, berechnet man die epg, indem man die Gesamtanzahl an ausgezählten Eiern mit Fünf multipliziert. Wir haben uns in unserer Studie auf Grund der großen Menge an zu untersuchenden Proben dazu entschlossen, zwei Proben pro Mini- FLOTAC- Zählkammer zu untersuchen. Daher wurde in unserer Studie die Gesamtanzahl an ausgezählten Eiern pro Probe mit 10 multipliziert.

Die WHO klassifiziert Infektionsintensitäten mittels der ausgezählten Eier pro Gramm Kot in niedrig, mittel und hoch. Eizahlen von eins bis 4999 gelten bei *A. lumbricoides* und *T. trichiura* als niedrig, zwischen 5000 und 9999 spricht man von moderaten Infektionen und Eizahlen ab 10.000 gelten als hoch. Bei den Hakenwürmern gelten Infektionen mit einem bis 1999 Eiern pro Gramm Kot als niedrig, solche mit 2000 bis 3999 als moderat und ab 4000 spricht man von einer hohen Infektionsintensität (Albonico, Bickle et al. 2003). Eine hohe Infektionsintensität wird mit einer hohen Wurmbürde gleichgesetzt. Da Parasiten sich in der Regel nicht in ihrem Wirt vermehren, wird die Infektionsintensität direkt korreliert mit der Wurmbürde. Und die Wurmbürde bestimmt das Ausmaß an Schadwirkung für den Menschen, da der Wurm das parasitische Stadium ist, nicht das Ei selbst. Dies kann insbesondere bei den Spulwürmern zur Einschätzung der tatsächlichen Wurmbürde fehlleiten. Ein einziges Spulwurmweibchen legt bis zu 200.000 Eier pro Tag, hier lässt sich von der epg also nicht gleich auf eine hohe Wurmbürde schließen.

Die höchsten Eizahlen bei *A. lumbricoides* fanden wir in Mbazi (72860 epg), Sholi (27280 epg) und Sovu (49440 epg). Alle drei Werte liegen im Bereich der hohen Infektionsintensität, der Wert in Mbazi spricht für eine massive Verwurmung. Hier wäre es zusätzlich interessant zu sehen, ob es einen Zusammenhang zu hohen Infektionsintensitäten und anderen vorherrschenden Erkrankungen gibt bzw. auch, ob Kinder, die intensiver verwurmt sind, signifikant andere, untereinander ähnliche Lebensbedingungen haben als solche, die es nicht sind. Mbazi, Sholi und Sovu werden als ländliche Regionen eingestuft. In Mbazi und Sovu kam es vor, dass Kinder, die vor Entwurmung als negativ oder mild verwurmt diagnostiziert wurden, nach Entwurmung Eizahlen von über 10.000 epg aufwiesen. Hierfür könnten unregelmäßige Eiausscheidung oder bei Erstuntersuchung nicht ausreichende Probenmengen verantwortlich sein, die dann zu einem verfälschten Ergebnis führen. Bei solchen Ergebnissen ist es auch denkbar, dass die Folgestudie noch in der Ausscheidungsphase der abgestorbenen Parasitenstadien durchgeführt wurde. Hierfür würde auch das in Mbazi ermittelte Ergebnis von 2015 sprechen. Jedoch zählen Mbazi und Sovu auch zu jenen Schulen, bei denen die FECR

unter Berücksichtigung aller Berechnungen 2014 unterhalb der gewünschten Wirksamkeitsschwelle lagen und diese Eizahlen daher durchaus als Anzeichen beginnender Resistenzen gedeutet werden könnten. Zusätzlich konnten 2015 in Mbazi initial nur weniger als die Hälfte der in 2014 generierten Proben gesammelt werden und von jenen standen uns nur sechs vor und nach der Entwurmung zur Untersuchung und Auswertung zur Verfügung. Die Werte sind also allein durch die geringe Anzahl der auswertbaren Proben nur bedingt vergleichbar. Infektionsintensitäten in diesem Ausmaß fanden sich in den als städtisch einzustufenden Gebieten (Ngoma, Tumba) nicht.

Bei *T. trichiura* und den Hakenwürmern fanden wir ausschließlich Eizahlen, die als niedrig einzustufen sind.

5.3 Wirksamkeiten von Anthelminthika

Die momentan noch am gängigsten angewandte Form der chemotherapeutischen Administration von Anthelminthika beim Menschen ist die einmalige Gabe von Albendazol (400 mg/ Kind) oder Mebendazol (500 mg/ Kind) (Albonico, Bickle et al. 2003, Keiser and Utzinger 2008, Utzinger, Becker et al. 2012, Levecke, Montresor et al. 2014, Speich, Moser et al. 2016).

Die Entwurmungskampagnen sollten in Ruanda seit 2008 regelmäßig zweimal im Jahr stattfinden (Ruxin and Negin 2012). Sieht man in der WHO Datenbank nach, zeichnet sich eine tatsächliche Häufigkeit von ungefähr einer Behandlung im Jahr ab (http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sth/en/). Während unserer Studie in Ruanda konnten wir feststellen, dass Pünktlichkeit und Regelmäßigkeit schwer einhaltbar waren. Es war nicht ungewöhnlich, dass sich Dinge um ein bis zwei Monate nach hinten verzögerten. Zusätzlich gestaltete es sich schwierig herauszufinden, mit welchem Medikament die Kinder in den vorangegangenen Jahren entwurmt worden waren. In unserer Studie 2014 wurden sie mit einer Einmaldosis von 400 mg Albendazol (Zentel™, GlaxoSmithKline) entwurmt. Die Entwurmung wurde von den uns zur Seite gestellten „Community Health Workern“ im Zuge der Entwurmungskampagne durchgeführt und überwacht. Empfohlen wird die Einnahme der Entwurmungstablette mit etwas fetthaltiger Nahrung (Milch), da sie von Kindern so besser vertragen wird. Im Falle, dass ein Kind sich nach Aufnahme der Tablette erbrechen musste, wurde entsprechend nachdosiert.

Albonico et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie auf Pemba Island (Tanzania) Wirksamkeiten der dort seit 1994 regelmäßig stattfindenden Entwurmung durch das „The National Helminth Control Programme“, das in Zanzibar im Juni 1994 gegründet wurde (Albonico, Bickle et al. 2003). Seitdem wurde im Abstand von vier bis sechs Monaten mittels einmaliger Gabe von

500 mg Mebendazol entwurmt. Stuhlproben wurden am Tag der Entwurmung und 21 Tage später von 914 Probanden gewonnen und direkt ins Labor transportiert, wo sie mittels Kato-Katz-Untersuchungsmethode analysiert wurden. Hierbei zeigte sich anhand der ERR, dass Mebendazol und Levamisol sehr gute Wirksamkeiten gegen *A. lumbricoides* aufweisen. Die ERR bei alleiniger Levamisolgabe lag bei 98,5 %, bei Mebendazol bei 99,1 %. Wurde Mebendazol allein (81 % ERR) oder in Kombination mit Levamisol (85 % ERR) verabreicht, erzielte das eine deutlich höhere Effektivität gegen *T. trichiura* als die alleinige Gabe von Levamisol (41,5 % ERR). Die ERR bei den Hakenwürmern betrug 88,7 %, wenn Mebendazol und Levamisol in Kombination gegeben wurden. Sie sank signifikant bei alleiniger Gabe von Levamisol (61,3 %) oder Mebendazol (52,1 %).

Keiser und Utzinger (2008) beobachteten in ihrer Metaanalyse mehrerer Studien folgende Wirksamkeiten der Chemotherapeutika: Die orale Einmaldosierung von Albendazol, Mebendazol und Pyrantelpamoat gegen *A. lumbricoides* erzielte mittlere CRs von 88, 95 und 88 %. Die CRs bei Infektionen mit *T. trichiura*, ebenfalls nach einmaliger Gabe von Albendazol und Mebendazol, lagen im Mittel bei 28 und 36 %. Die Effektivität gegen Hakenwürmer, gemessen an der CR, betrug bei einmaliger oraler Gabe von Albendazol, Mebendazol und Pyrantelpamoat im Mittel 72, 15 und 31 %. Albendazol, einmalig verabreicht, zeigte gute Wirksamkeit gegen *A. lumbricoides* und die Hakenwürmer, jedoch war es wenig effektiv gegen *T. trichiura* (Keiser and Utzinger 2008). Eine dreimalige anthelminthische Behandlung gegen Infektionen erwies sich zwar als etwas wirksamer, allerdings stellt sich hier die Frage der Praktikabilität (Keiser and Utzinger 2010).

In einer Metaanalyse kamen Moser et al. (2017) erneut zu dem Ergebnis, dass alle angewandten Chemotherapeutika, gemessen an der CR, gute Wirksamkeit gegen *A. lumbricoides* aufweisen. Sie fanden für Albendazol gegen Hakenwürmer mit 79,5 % eine etwas höhere CR als Keiser und Utzinger in ihrer Metaanalyse von 2008 und eine FECR von 89,6 %. Wiederum bestätigten sich die kaum ausreichende Effektivität der Chemotherapeutika gegen *T. trichiura*, die CR war hier bei Mebendazol mit 42,1 % am höchsten. In einer Studie in Tanzania lag die Wirksamkeit von Albendazol bzw. Mebendazol gegen *T. trichura* nur bei 2,6 respektive 11,8 % (Moser, Schindler et al. 2017).

Knopp et al. (2010) untersuchten in einer Studie bei 548 Schulkindern in einer Region in Tanzania die Wirksamkeit von Albendazol und Mebendazol allein und in Kombination mit Ivermectin gegen *T. trichiura* (Knopp, Mohammed et al. 2010). Sie verabreichten entweder eine Dosis Albendazol oder Mebendazol mit oder ohne Zugabe von Ivermectin (200 µg/ kg). Die Prävalenz von *T. trichiura* betrug 63 %, Hakenwürmer und *A. lumbricoides* waren bei 20 % bzw. neun Prozent der Studienteilnehmer präsent. Die Proben der Folgestudie wurden 22

bis 39 Tage nach Initialbehandlung mit den Chemotherapeutika eingesammelt. Die höchste CR für *T. trichiura* erzielte mit 55 % die Kombination aus Mebendazol und Ivermectin, gefolgt von der Kombination aus Albendazol und Ivermectin (38 %). Sehr niedrige CRs konnten beobachtet werden, wenn Albendazol oder Mebendazol allein gegen *T. trichiura* verabreicht wurden. Die ERRs spiegelten die Ergebnisse der CRs wider. Mebendazol/ Ivermectin erzielte mit 97 % die höchste ERR, die Behandlung mit der Kombination aus Albendazol und Ivermectin resultierte in einer ERR von 91 %. Die niedrigsten ERRs ergaben die Behandlung mit Mebendazol oder Albendazol allein (67 bzw. 40 %).

Vercruyse, Behnke et al. (2011) untersuchten die Wirksamkeiten unterschiedlicher Chemotherapeutika in sieben Ländern mit unterschiedlichsten Gegebenheiten (Brasilien, Kamerun, Kambodscha, Äthiopien, Indien, Tanzania und Vietnam). In Brasilien wurde in der Region, die beprobt wurde, seit 2007 regelmäßig mit Albendazol entwurmt. In Kambodscha wurden in einer Region, die von 1997 bis 2007 regelmäßig behandelt wurde, Proben gesammelt. In Kamerun wurde in drei unterschiedlichen Regionen beprobt, in einer wurde seit 1999 regelmäßig mit Albendazol und Mebendazol entwurmt, das letzte Mal im Jahr 2008 mit Mebendazol, in einer anderen fand noch nie eine offizielle Massenentwurmung statt. In Äthiopien wurden in einer Region Proben gesammelt, in der vorher noch nie entwurmt worden war. In den zwei beprobten Regionen in Indien wurde in der einen von 2001 bis 2008 mittels Albendazol entwurmt, in der anderen noch nie. In der beprobten Region in Tanzania finden seit 1994 regelmäßig Entwurmungen statt, die letzte im Jahr 2006 mit Praziquantel, Ivermectin und Albendazol. In Vietnam wurde in einer der beprobten Regionen seit 2005 entwurmt, in der anderen noch nie. Alle Ergebnisse sind mittels CR und zusätzlicher FECR angegeben. In allen Studien wurde den Studienteilnehmern im Alter von vier bis 18 Jahren zur Entwurmung einmalig eine 400 mg Dosis Albendazol verabreicht. Alle Proben wurden unkonserviert mittels des McMaster- Zählkammer- Verfahrens untersucht und die Ergebnisse mittels CR und FECR angegeben. CRs waren am höchsten bei *A. lumbricoides* (98,2 %), gefolgt von den Hakenwürmern mit 87,8 % und *T. trichiura* mit 46,6 %. Vergleicht man die CRs der unterschiedlichen Studien, findet man die größte Schwankungsbreite bei *T. trichiura*, die sich hier zwischen 21,0 % (Tanzania) und 88,9 % (Indien) bewegt. Interessant zu beobachten ist, dass die CRs außer bei den Hakenwürmern mit höherem Alter steigen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass mit steigender Infektionsintensität die CRs sinken. Vor allem bei *T. trichiura* zeigte sich das deutlich, hier sank die CR von 53,9 auf 12,5 % (Vercruyse, Behnke et al. 2011). Die FECR war in dieser Studie mit 99,5 % bei *A. lumbricoides* am höchsten, gefolgt von den Hakenwürmern mit 94,8 % und *T. trichiura* mit 50,8 %. Auch hier gab es einige Variationen zwischen den verschiedenen Standorten der Studie, wobei die Reduktionszahlen bei *A. lumbricoides* unabhängig von den Gegebenheiten immer relativ konstant zwischen 97,8

und 100 % lagen. Den Gegensatz dazu bildet *T. trichiura*, hier schwankten die Eizahlreduktionszahlen von 39,2 % in Kamerun bis zu 92,4 % in Äthiopien. Bei den Hakenwürmern gab es wiederum nur eine relativ kleine Schwankungsbreite von 87,1 % in Indien bis zu 100 % in Vietnam (Vercruysse, Albonico et al. 2011, Vercruysse, Behnke et al. 2011).

Vercruysse, Behnke et al. (2011) ziehen daraus den Schluss, dass eine FECR unter 95 % für *A. lumbricoides* und unter 90 % für Hakenwürmer nach einmaliger Gabe von Albendazol in zukünftigen Studien die Grenzen zur Kontrolle einer sich eventuell anbahnenden Resistenz sein sollten. Für *T. trichiura* ist die Etablierung eines solchen Grenzwertes sehr schwierig, da nachweislich die Wirksamkeiten bei diesem Parasiten nach einmaliger Anthelminthikagabe nicht ausreichend sind (Vercruysse, Behnke et al. 2011).

Aus den vorliegenden Studien geht hervor, dass eine Wirksamkeit von nur einmaliger Gabe von Anthelminthika bei Hakenwürmern keine ausreichende Wirksamkeit hat. Bei *A. lumbricoides* wiederum attestieren einige Studien einer einmaligen Gabe von Anthelminthika gegen den Parasiten eine ausreichende Wirksamkeit. Vergleicht man die unterschiedlichen Studien, fällt auf und wird auch in den Diskussionen von den Autoren selbst aufgegriffen, dass es keine standardisierten Protokolle für die Durchführung der Studien zu Wirksamkeiten gibt. Es kommen unterschiedlichste Untersuchungsmethoden und statistische Analysemethoden vor. Die Kinder sind zwar alle im gleichen Alter, jedoch haben sie nicht immer die gleichen Lebensbedingungen. Bei den Untersuchungsmethoden gibt es auch zahlreiche Variationen, je nach Methode wird mit unterschiedlicher Menge an Kot gearbeitet, mit oder ohne Anreicherung und Zählkammer (Ballweber, Beugnet et al. 2014, Barda, Cajal et al. 2014). Das stellt, um einen aussagekräftigen Vergleich zu ziehen, ein Problem dar und wirft einmal mehr die Frage nach standardisierten Protokollen auf (Keiser and Utzinger 2008, Vercruysse, Albonico et al. 2011).

Für *T. trichiura* werden in so gut wie keiner Studie ausreichende Wirksamkeiten, gemessen an der FECR, erzielt. Dennoch scheint es sich nicht durchzusetzen, wie von einigen Autoren vorgeschlagen, Kombinationen der unterschiedlichen Präparate anzuwenden bzw. in anderen Intervallen zu entwurmen (Knopp, Mohammed et al. 2010). *Ascaris lumbricoides* ist in den meisten betroffenen Ländern, wie auch in Ruanda, der vorherrschende Parasit, daher konzentrieren sich viele Studien, wie auch die unsere, auf ihn. Aber auch die Wirksamkeit gegen die Hakenwürmer ist in so gut wie keiner Studie ausreichend. Die FECRs bewegen sich in den meisten Studien, ähnlich wie bei *T. trichiura*, nur zwischen 31 und 88 Prozent, ein Wert, der laut Vercruysse et al. im Hinblick auf die Wirksamkeit (Vercruysse, Behnke et al. 2011) deutlich als Anzeichen einer entstehenden bzw. vorliegenden Resistenz gewertet werden

sollte. Auch in der von uns durchgeführten Studie gab es bei den Hakenwürmern nur drei Schulen, in denen Benzimidazole ausreichende Wirksamkeiten aufwiesen, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Anzahl der positiven Kinder zu niedrig war, um statistisch aussagefähige Schlussfolgerungen zu ziehen.

Vergleicht man die oben angeführten FECRs und CRs für *A. lumbricoides* so findet man außer bei Keiser und Utzinger (Keiser and Utzinger 2008) ausschließlich Werte über 90 %. Wir zogen bei unseren Berechnungen und zur Beurteilung der Ergebnisse mehrere Werte bzw. Blickwinkel heran. Die Eizahlreduktionen wurde einmal unter Einbeziehung aller Individuen, die vor oder nach Entwurmung positiv waren, berechnet, ein anderes Mal nur unter Einbeziehung der Kinder, die vor Entwurmung positiv und nachher reduzierte oder negative Eizahlen aufwiesen. Es scheint unwahrscheinlich, dass ein Kind, das vor Entwurmung negativ auf Parasiteneier untersucht wurde, nach sieben bis zehn Tagen zum Teil beeindruckend hohe Eizahlen aufweist. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Folgeuntersuchung in die Patenz gefallen ist, während die erste Untersuchung noch in der Präpatenz stattfand. Wir fanden in unseren Untersuchungen in fünf von zehn Schulen deutlich verminderte Wirksamkeiten für Albendazol (FECRs zwischen null und 90 %). In den Schulen Githovu und Tumba war vor der Entwurmung nur jeweils ein Kind positiv auf Wurmeier getestet worden. Berechneten wir die mittlere FECR für alle Schulen, fanden wir, sowohl mit als auch ohne die Einbeziehung der vorher negativen Kinder, Hinweise auf verminderte Wirksamkeit. Die mittlere FECR unter Einbeziehung aller Kinder lag bei 75,40 % (95 % KI), wenn man die vorher negativen Individuen wegließ, immer noch nur bei 81,63 % (95 % KI).

Auch wenn wir in der Berechnung die vor Entwurmung negativen und nachher positiven Kinder wegließen, ergaben sich in unserer Studie bei drei Schulen deutliche Hinweise auf verminderte Wirksamkeiten (Mbazi, Kigoma, Gathovu). Andere Schulen lagen knapp unterhalb der in der Literatur vorgeschlagenen Grenze (Rango, Sholi, Sovu, Maraba) und sollten daher als mögliches Reservoir schon resistenzbildender Wurmpopulationen angesehen werden. Die in unserer Studie gefundene verminderte Wirksamkeit der Anthelminthika gibt Hinweise auf das mögliche Vorliegen resistenter Wurmpopulationen, molekularbiologisch waren jedoch keine Resistenzen bzw. die damit verbundenen SNPs am Genom nachvollziehbar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Resistenzen mit anderen, noch nicht identifizierten Mechanismen assoziiert sind.

Tydén et al. (2016) untersuchten im Zuge eines *in ovo* LDT die β -Tubulin Expression der Isotypen 1 und 2 bei *Parascaris* spp. in den unterschiedlichen Lebensstadien. Hierzu wurden das unembryonierte Ei, die Larvenstadien und der adulte Wurm verschiedenen Konzentrationen von Thiabendazol ausgesetzt. Erwiesen ist, dass der Resistenzmechanismus

generell mit β -Tubulin Genen in Zusammenhang steht, bis dato konnte man aber nicht eindeutig aufzeigen, welcher Isotyp bei Ascariden genau dafür verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass bei *Parascaris* spp. vor allem die Expression an Isotyp 1- Genen in allen Lebensstadien hoch ist, wohingegen diese von Isotyp 2 nur in den Eiern hoch war und dann wieder sank. Dies gibt Hinweise darauf, dass unterschiedliche Isotypen in unterschiedlichen Lebensphasen Aufgaben übernehmen. Zusätzlich änderte sich im Verlauf des *in ovo*-LDT die Expression von Isotyp 1 Genen mit steigender Konzentration von Thiabendazol, nicht jedoch die von Isotyp 2. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Isotyp 1 hauptverantwortlich für die Lokalisation von BZ- Resistenzen bei *Parascaris* spp. ist (Tyden, Skarin et al. 2016).

Tarbiat et al. gelang es, den *in ovo*- LDT für die Spezies *A. galli* erfolgreich zu adaptieren und anzuwenden (Tarbiat, Jansson et al. 2017). Bis dato gibt es leider keine *in vitro* Assays für *Ascaris* sp., doch die aktuellen Entwicklungen geben Anlass zur Hoffnung.

Die Angabe der CR zur Einschätzung des Behandlungserfolges innerhalb einer Gruppe ist Standard in der Humanmedizin (Moser, Schindler et al. 2017). Die CR gibt per definitionem den Anteil der ehemals an einer Krankheit leidenden Menschen an, die nach Behandlung vollkommen genesen sind. Sie ist der Vollständigkeit halber nicht wegzudenken, jedoch sollte sie zur Einschätzung von Resistenzen kritisch gewertet werden. In der Humanmedizin bedeutet die erfolgreiche Behandlung einer Krankheit, dass der Patient genesen ist. Daher gibt die Berechnung der CR für eine Population nur an, wie viele Individuen innerhalb der ursprünglich erkrankten Gruppe nach Behandlung vollkommen genesen sind. In der vorliegenden Studie also der Anteil aller mit Wurmeiern positiv diagnostizierten Kinder, der bei Folgeuntersuchung keine Wurmeier mehr ausschied beziehungsweise bei dem keine patente Infektion mehr zu Grunde lag. Zur Einschätzung eventuell vorliegender Resistenzen lässt sich die CR daher nur ungenügend anwenden, da es sich hier um Individuen handelt, die nach Behandlung eine reduzierte Eiausscheidung aufweisen. Die hier durchgeführten Berechnungen unter Einbeziehung von Kindern, bei denen vor Entwurmung keine Eier im Kot gefunden wurden, bei Folgeuntersuchung schon, ergaben zum Teil FECRs von null, bzw. um null herum, was bedeutet, dass in einem oder mehreren Fällen nach Entwurmung mehr Eier im Kot gezählt wurden als vorher. Hier kann man also durchaus von einer nicht erfolgreichen Behandlung sprechen. Generell waren die CRs in unserer Studie außer bei zwei Schulen niedriger als die FECRs und in den Fällen, in denen sie höher waren (Mbazi 68 %, Gathovu 75%), sind das zwei Schulen, in denen die berechneten FECRs deutliche Hinweise auf Resistenzbildung geben. Misst man die Wirksamkeit einer Behandlung ausschließlich an der CR, werden Kinder mit nach Entwurmung positivem Ergebnis erst gar nicht in die Berechnung einbezogen. Dies führt unter Umständen zu einem verfälschten Ergebnis, sicher aber kann man keine Aussage über die Entstehung von Resistenzen treffen. In Fachkreisen wird die CR

als Parameter für die Wirksamkeit schon länger kritisch diskutiert, da man weiß, dass ein aussagekräftiges Ergebnis sehr stark von der Sensitivität der Untersuchungsmethode abhängt und sehr niedrige FECRs unter Umständen gar nicht detektiert werden und zu einer falschen CR führen (Bennett and Guyatt 2000, Vercruysse, Albonico et al. 2011).

Unsere Daten zeigen zwar eindeutig eine verminderte anthelminthische Wirksamkeit von Benzimidazolen gegen *Ascaris sp.* auf, jedoch beweisen sie nicht, dass es in den beprobten Gebieten schon genetisch resistente Wurmpopulationen gibt. Die verminderte Wirksamkeit kann verschiedene Ursachen haben. Der Selektionsdruck steigt durch andauernd ungenügende und zu häufig angewandte Dosierungen über einen längeren Zeitraum. Die überlebenden Würmer werden weiter zu geringen Dosen ausgesetzt und entwickeln Resistenzen (Vercruysse, Albonico et al. 2011, Knapp-Lawitzke, Krücken et al. 2015). Die Qualität der angewandten Medikamente sollte auch als Ursache für vermeintlich verminderte Wirksamkeit in Betracht gezogen werden. Das hier verwendete Albendazol- Präparat Zentel™ von GlaxoSmithKlein wurde dem ruandesischen Gesundheitsministerium von der WHO zur Verfügung gestellt. Die Temperaturen steigen in Ruanda selten über 30°C, aber es gibt keine Angaben zu Transport oder genauer Aufbewahrung. Zusätzlich gab es keine Proben der verwendeten Medikamente und es konnte keine Überprüfung der genauen Zusammensetzung gemacht werden. Da wir aber in bestimmten Schulen auch Ergebnisse generierten, die für die Wirksamkeit des Medikamentes sprechen, scheint die inadäquate Aufbewahrung als grundlegende Ursache eher unwahrscheinlich zu sein. Jedes Kind wurde adäquat dosiert und im Falle, dass es erbrechen musste, nachdosiert. Die Kinder wurden dazu angehalten, 30 Minuten vor Ort zu warten, um sicherzugehen, dass eventuelles Erbrechen nicht übersehen wird. Unserer Erfahrung nach ist es auf Grund der äußeren Umstände der Kampagnen durchaus möglich, dass Erbrechen übersehen wurde oder Kinder den Raum früher verließen. Auch kam es während unserer Zeit in Ruanda (2014- 2015) dazu, dass Entwurmungskampagnen in Ferienzeiten (von den Direktoren bestimmt) gelegt wurden und daher nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, wann und ob diese Schulen nachbehandelt wurden. Dies wirkt sich zwar nicht direkt auf die von uns gesammelten Ergebnisse aus, bedeutet jedoch, dass auch schon 2014 eventuell Kinder mit zum damaligen Zeitpunkt unterschiedlichem Entwurmungsstatus beprobt wurden.

5.3.1 Untersuchungsmethoden

Barda et al. (2014) untersuchten und verglichen in Ihrer Studie in Argentinien die drei Untersuchungsmethoden Mini- FLOTAC, Ausstrich nach Kato- Katz und McMaster-Zählkammer zur Detektion von Infektionen mit *Hymenolepis nana* und *A. lumbricoides*. Jede

Probe wurde mit jeder Untersuchungsmethode untersucht. Mini- FLOTAC erwies sich hier mit 87,1 % Genauigkeit als die sensitivste Methode, um Infektionen mit *A. lumbricoides* zu diagnostizieren. Kato- Katz war mit 84,4 % ähnlich sensitiv. Als nicht so sensitiv erwies sich mit nur 48,3 % die McMaster- Zählkammer Methode. Dieser Unterschied war signifikant. Zusätzlich wurden alle Verfahren auf ihren negativ prädiktiven Wert (NPW) getestet. Er lag zur sicheren Erkennung eines nicht infizierten Individuums bei allen drei Methoden über 90 %. Der NPW hängt sehr stark von der vorliegenden Prävalenz ab. Die Prävalenz für *A. lumbricoides* lag in der untersuchten Region bei 17 %, der höchste epG, der mittels Ausstrich nach Kato- Katz gefunden wurde, lag bei 1315, eine Eiausscheidungsintensität, die als niedrig einzustufen ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Sensitivität der angewandten Untersuchungsmethoden in anderen Studien mit anderen Gegebenheiten und höheren Prävalenzen höher ausfällt (Barda, Cajal et al. 2014).

Mini- FLOTAC, Kato- Katz und McMaster sind quantitative Untersuchungsmethoden, die darauf abzielen, anhand der Eiausscheidung eine Aussage zu Infektionsintensitäten zu treffen. Die vorliegende Studie zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Prävalenz, beziehungsweise vorliegendem epG und Sensitivität der Untersuchungsmethode besteht (Barda, Cajal et al. 2014, Barda, Ianniello et al. 2014). Das Ergebnis der McMaster-Zählkammer scheint insbesondere zur Untersuchung von Infektionen mit *A. lumbricoides* von hohen Infektionsintensitäten abzuhängen (Barda, Cajal et al. 2014).

Es gibt Studien, die behaupten, dass Kato- Katz durchaus nicht so sensitiv sei wie Mini-FLOTAC, da auf Grund der geringeren Menge an verwendetem Untersuchungsmaterial das Risiko steigt, geringe Eiausscheidungen zu übersehen (Barda, Zepherine et al. 2013). Andere Studien zeigen, dass die Sensitivität von Mini-FLOTAC und dem Ausstrich nach Kato-Katz im direkten Vergleich annähernd gleich sind (Barda, Cajal et al. 2014).

Die Untersuchungsmethode hat, je nach Prävalenz und insbesondere Intensität der Infektion, einen Einfluss darauf, wie Ergebnisse einer Studie ausfallen. Daher sollte bei Einführung eines standardisierten Protokolls ein einheitliches Detektionsverfahren ein wichtiges Kriterium sein. Unsere mikroskopischen Untersuchungen wurden von einer Person durchgeführt und die Ergebnisse so dokumentiert. Die Kollegen vor Ort untersuchten jede Probe mittels "wet mount" Technik auf Wurmeier und *Giardia duodenalis*. Hierbei zeigte sich im direkten Vergleich die höhere Sensitivität der Mini FLOTAC- Kammer im Vergleich zur "wet mount" Technik. Die Untersuchung mittels "wet mount" Technik ergab vor Entwurmung eine Prävalenz von *A. lumbricoides* von 25,9 %, mit der Mini- FLOTAC Methode lag sie bei 33,3 %. Nach Entwurmung lagen die Prävalenzen bei 5,6 beziehungsweise 13,4 % (Krücken, Fraundorfer et al. 2017).

5.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Für einige Spezies der Strongyliden wurden in den letzten Jahren Assays zu molekularbiologischen Untersuchungen von Resistenzen entwickelt und angewandt (von Samson-Himmelstjerna, Walsh et al. 2009, Demeler, Kruger et al. 2013). Da wir mikroskopisch eindeutige Hinweise auf das mögliche Vorliegen resistenter Wurmpopulationen fanden, wollten wir versuchen diese am β -Tubulin der Isotypen tbb-1, tbb-2, tbb-4 und tbb-1.2 von *Ascaris* sp. zu finden, da phylogenetische Analysen die engste Verwandtschaft zu den bei den Strongyliden mit Resistenz assoziierten β -Tubulin-Isotypen ergaben (Demeler, Kruger et al. 2013).

In keinem der von uns untersuchten Isotypen konnte einer der bei den Strongyliden mit Benzimidazolresistenz assoziierten SNPs dargestellt werden.

Dies wirft erneut die Frage nach differenten Mechanismen von Resistenzen auf. Unsere Ergebnisse sind eindeutig, jedoch konnten wir molekularbiologisch keinen der bis jetzt mit Resistenz assoziierten SNPs im Genom nachweisen. Eventuell ist als Ursache für unsere Befunde nicht das Vorhandensein von Anthelminthikaresistenz, sondern vielmehr verminderte Wirksamkeiten aufgrund anderer, oben angeführter Gründe, wie zum Beispiel beeinträchtigte Qualität der angewandten Medikamente oder nicht ordnungsgemäße Administration, möglich. Auf der anderen Seite weiß man aus anderen Studien, dass der an Codon-Position 200 des β -Tubulin Isotyp-1 Gens mit Resistenz assoziierte SNP auch bei suszeptiblen Individuen vorkam (Diawara, Drake et al. 2009, Diawara, Halpenny et al. 2013). Demnach ist es durchaus möglich, dass die mit BZ-Resistenz assoziierten SNPs bei den untersuchten Würmern an anderer Stelle des Genoms liegen. Zwar konnten wir auch keine anderen Auffälligkeiten in der Aminosäureabfolge der untersuchten β -Tubulin Gene finden, jedoch konzentrierten sich unsere Analysen nur auf ausgewählte Teilsequenzen.

Es ist ebenso denkbar, dass Resistenzmechanismen gar nichts mit dem Wirkmechanismus des Medikamentes zu tun haben, sondern zum Beispiel mit einer verstärkten Metabolisierung von BZs durch z.B. Cytochrom P450 Monooxygenasen oder verstärkte Ausschleusung durch P-Glykoproteine, wie es zum Beispiel bei *C.elegans* und einigen Strongyliden der Fall ist (Kerboeuf, Blackhall et al. 2003, AlGusbi, Krucken et al. 2014). Thiabendazol muss in *C.elegans* an den Nuclear Hormon Rezeptor NHR-176 binden, um anschließend durch Cytochrom P450 verstoffwechselt zu werden. Obwohl Thiabendazol und Albendazol eng verwandt sind, ruft Albendazol eine andere Genexpression hervor, der pharmakologische Wirkmechanismus beider Stoffe ist aber der gleiche. Auch das könnte ein Hinweis darauf sein,

dass Resistenzmechanismen irgendwo anders in dieser Kaskade eingreifen (Jones, Rayson et al. 2013, Jones, Flemming et al. 2015).

5.5 Zu den Ergebnissen der Schweineproben

Nach heutigem Kenntnisstand können beide Spezies *A. lumbricoides* und *A. suum* sowohl Menschen als auch Schweine infizieren (Bendall, Barlow et al. 2011, Leles, Gardner et al. 2012, Nejsum, Betson et al. 2012). Um weitere Informationen über die Situation in Ruanda zu erhalten, sammelten wir, zusätzlich zu den Humanproben aus jedem Dorf, Proben von dort mit den Dorfbewohnern in engem Kontakt lebenden Schweinen. Es gelang uns nicht von jedem Kind, das an der Studie teilnahm, Kotproben von den dazugehörigen Schweinen zu sammeln, daher beschränkten wir uns auf einen statistischen Prävalenzvergleich der einzelnen Spezies bei Mensch und Schwein. Dieser ergab hinsichtlich der Prävalenzen von *Ascaris* sp. und bei MDS statistisch signifikante Ergebnisse.

Da nicht eindeutig herausgefunden werden konnte, ob und wie oft die Besitzer ihre Schweine mit Anthelminthika behandeln, stellen unsere Ergebnisse für die Schweineproben nur eine Momentaufnahme des Verwurmungsgrades der untersuchten Tiere dar. Einer der ortsansässigen Tierärzte äußerte sich hierzu ebenfalls sehr widersprüchlich.

Die mikroskopische Auswertung der Kotproben ergab Prävalenzen von *Ascaris* sp. zwischen 18,5 und 80,8 % mit einem arithmetischen Mittel von 49,47 %, von *T. suis* zwischen 0 bis 28,8 % mit einem arithmetischen Mittel von 13,81 % und von den MDS zwischen 72,2 und 94,2 % mit einem arithmetischen Mittel von 84,15 %. Hier sieht man deutlich, dass *Ascaris* sp., ähnlich wie beim Menschen, sehr große Schwankungsbreiten aufweist. *Trichuris suis* kommt beim Schwein, wie auch *T. trichiura* beim Menschen mit der geringsten Prävalenz vor. Die MDS kommen mit teilweise höheren Prävalenzen (72,2 % bis 94,2 %) als die Hakenwürmer beim Menschen vor, dennoch waren in Dörfern, in denen die Prävalenzen bei den Kindern hoch waren, auch die der Schweine hoch. Ähnlich wie beim Menschen (1,6 %- 13 %) kommen die MDS nicht mit so großen Schwankungsbreiten vor, wenn auch mit deutlich höherer Prävalenz. Bei *Ascaris* sp. und bei den MDS der Schweine sind die niedrigsten gefundenen Prävalenzen (18,5 %; 72,2 %) deutlich höher als die beim Menschen (1,6 %). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Schweine vermutlich noch nie entwurmt wurden, auf der anderen Seite stellt sich die Frage, warum die Prävalenzen dann nicht grundsätzlich höher sind. Wenn keine hygienischen oder anderweitige medizinische Maßnahmen getroffen werden, muss man von einer gegenseitigen Übertragung der Tiere von *Ascaris* sp. ausgehen. Leider haben wir keine Angabe zum Alter der Tiere, jedoch wissen wir, dass keine homogene Gruppe beprobt

wurde. In einer Studie in Uganda untersuchten Roesel et al. (2017) Kotproben von 932 Schweinen. Sie fanden Prävalenzen von *A. suum* von 5,9 % und von den MDS von 57,1 %. Das durchschnittliche Alter der Tiere lag bei knapp neun Monaten und 40 % der Besitzer gaben an, vor der Studie schon einmal entwurmt zu haben. Die Prävalenz in unserer Studie war bei den Schweinen für *A. suum* beinahe zehnmal so hoch. Das Alter könnte hier eine Rolle spielen, denkbar sind jedoch auch Haltungsbedingungen, Klima oder seltenere Anwendung anthelminthischer Präparate.

Die höchsten Eizahlen lagen bei *Ascaris* sp. zwischen 3380 und 11800 epG, bei den MDS zwischen 4020 und 11760 und bei *T. suis* bei 2350. Sowohl bei *Ascaris* sp. als auch bei den MDS kommen durchaus moderate bis hohe Eiausscheidungs- Intensitäten vor, während sich Infektionen mit *T. suis* durchgehend im niedrigen Bereich abspielen. Die an Intensität am höchsten einzustufenden Eiausscheidungen bewegen sich bei den Schweinen bei *Ascaris* sp. durchaus im Bereich über 10.000 epG, gehen aber nicht deutlich darüber hinaus.

Der Besitz von Schweinen scheint in Ruanda, ähnlich wie in Österreich und Deutschland, eher den Bewohnern der ländlichen Regionen vorbehalten zu sein. In Ngoma und Tumba, die beide als städtische Gebiete gelten, gab es keinen Haushalt, der zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen Schweine hielt. Hier fanden wir auch bei den Kindern fast ausschließlich niedrige Infektionsraten. Die Menschen, die Schweine besitzen, leben fast immer auf sehr engem Lebensraum mit den Tieren zusammen. Eine gegenseitige Infektion scheint denkbar zu sein. Daher wäre es in diesem Zusammenhang eventuell auch von Interesse die stattfindenden Entwurmungskampagnen auf die Tiere auszuweiten, um sicherzugehen, dass sich kein zusätzliches Reservoir für resistente Populationen in den Schweinen als Wirt bilden kann. Betson et al. (2014) beschreiben in ihrer groß angelegten, globalen Studie zur Differenzierung von *A. lumbricoides* und *A. suum*, dass es genetische Unterschiede zwischen den beiden Spezies gibt. Dennoch fanden sie auch Infektionen beim Menschen, die tierischen Ursprungs waren (Betson, Nejsun et al. 2014). Ähnliches beschreiben auch Sparks et al., die auf Zanzibar, einer Insel, auf der es keine Schweine gibt, eine Infektion mit *A. suum* beim Menschen nachweisen konnten (Sparks, Betson et al. 2015).

5.6 Konklusion

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die regelmäßige anthelminthische Behandlung in Entwicklungsländern unumgänglich ist, um Gesundheit, Lebensqualität und längerfristig Lebenserwartung zu steigern. Dazu wird es vor allem immer wichtiger werden, in mehr und mehr einheitlichen Studien Daten zur Einschätzung der Entwicklung potenziell resistenter

Wurmpopulationen zu sammeln, diese frühzeitig zu erkennen und strategisch dagegen vorzugehen (Keiser and Utzinger 2008, Utzinger, Becker et al. 2012, Vercruyse, Levecke et al. 2012, Moser, Schindler et al. 2017).

Wir fanden in unseren parasitologischen Untersuchungen deutliche Hinweise auf das Vorliegen von Wurmpopulationen mit verminderter Wirksamkeit von BZs im Süden Ruandas. Diese Ergebnisse ließen sich molekularbiologisch nicht nachvollziehen, zumindest die bis heute gefundenen, bei Strongyliden mit BZ-Resistenzen assoziierten β -Tubulin-SNPs fanden wir nicht. Da wir nur einen kleinen Abschnitt der β -Tubulin Gene untersuchten, ist es durchaus denkbar, dass die mit BZ-Resistenz assoziierten SNPs an anderer Stelle zu finden wären oder der Resistenzmechanismus nichts mit dem Wirkmechanismus des Medikamentes zu tun hat und daher bei *Ascaris* sp. über andere Wege eingreift.

Interessant für zukünftige Untersuchungen in Ruanda ist sicher die Ausweitung der Beprobung und Auswertung ähnlicher Studien auf das ganze Land. Da Ruanda in sich große geographische Diskrepanzen zwischen Nord und Süd aufweist, wäre ein Vergleich derselben Gruppen innerhalb der Population in unterschiedlichen Regionen des Landes interessant. Ebenso könnten weitere Untersuchungen der potenziellen Resistenzmechanismen hilfreich sein und in Zukunft auch immer notwendiger werden, um drohende ausbleibende Wirkung bestimmter Stoffklassen aufzuhalten bzw. eingreifen zu können und rechtzeitig andere Wege zur Bekämpfung zu erschließen.

6. Zusammenfassung

Untersuchungen zum Vorkommen und zur anthelminthischen Suszeptibilität von gastrointestinalen Nematoden bei Menschen und Schweinen in Ruanda:

Geohelminthen oder „Soil-transmitted Helminths“ (STH), namentlich *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* und die Hakenwürmer *N. americanus* und *A. duodenale* sind weltweit verbreitete, humanpathogene und zum Teil zoonotische Parasiten, die weltweit nahezu 1,2 Milliarden Menschen betreffen und eine große Gefahr für die öffentliche Gesundheit und besonders für Schulkinder darstellen. Ihre strategische Bekämpfung in vielen endemischen Ländern wird immer wichtiger. Am häufigsten betroffen sind Kinder im Vorschul- und Schulalter, was zu Leistungseinbußen bis hin zu Unterernährung und körperlicher Unterentwicklung führen kann. Eine präventive Chemotherapie wird in Ruanda seit 2008 ein- bis zweimal im Jahr an Schulkinder verabreicht und erreicht einen großen Anteil der Zielgruppe.

Ziel dieser Arbeit war es, Stuhlproben von Schulkindern im Alter zwischen sechs und zehn Jahren aus zwölf Schulen und Kotproben von Schweinen der Subdistrikte der südlichen Provinz Ruandas vor Ort mikroskopisch mittels Mini-FLOTAC Verfahren auf das Vorkommen von Wurmeiern einer oder mehrerer der oben genannten STH Spezies zu untersuchen. Die Beurteilung der anthelminthischen Wirksamkeit erfolgte mittels Berechnung der Eizahlreduktion und der „Cure Rate“. Im Rahmen der Studie wurden im Jahre 2014 ca. 2000 Stuhlproben mikroskopisch analysiert, im Folgejahr 2015 weitere 400 aus vier der ursprünglich zwölf untersuchten Schulen. Die an der Studie teilnehmenden Kinder brachten am Tag der Entwurmung eine frische Stuhlprobe in die Schule mit. Nach Abgabe der Stuhlprobe wurde ihnen 2014 nach einer Allgemeinuntersuchung und Blutentnahme unter Aufsicht eine Tablette Albendazol (400 mg) verabreicht und sieben bis zehn Tage nach der Entwurmung wurden erneut frische Stuhlproben in den Schulen eingesammelt. 2015 wurde nach demselben Schema verfahren, allerdings wurden die Kinder nicht erneut klinisch untersucht oder eine Blutprobe genommen. Zusätzlich wurden 2014 aus jedem zugehörigen Dorf Kotproben von Schweinen gesammelt, die mit beprobten Kindern auf engem Lebensraum, meist in einer Umzäunung neben dem Haus, wohnten. Sie wurden ebenfalls via Mini- FLOTAC auf das Vorkommen von Wurmeiern (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*, Magen-Darm-Strongyloiden) untersucht. Für weiterführende Untersuchungen wurden Rückstellproben gesichert, aus denen im Anschluss im Labor in Berlin DNA extrahiert wurde, um auf molekularbiologischer Ebene nach Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) in β -Tubulin Genen von *Ascaris* sp. zu suchen.

Die Gesamtprävalenz für *Ascaris* sp. lag bei Erstuntersuchung bei fast 40 %, sie sank nach der ersten Entwurmung auf knapp 13 %. Die mikroskopischen Ergebnisse in der vorliegenden Studie zeigten in neun von zehn Schulen eine verminderte Wirksamkeit des BZ Albendazol gegen *Ascaris* sp. Die FECR lag hier in allen betroffenen Schulen unter der von Vercruyse et al. (2011) vorgeschlagenen Schwelle, einzig in Mugogwe fanden wir eine FECR über 95% (99,56 %). Insgesamt schwankte die FECR zwischen null und 99,56 %. Die CRs schwankten zwischen 33 und 100 %. Die parasitologischen Befunde ließen sich molekularbiologisch nicht untermauern, es konnten in keiner der untersuchten Proben die bekannten, mit BZ- Resistenz assoziierten β - Tubulin- SNPs gefunden werden.

Bei den Schweinen fanden wir Prävalenzen für *Ascaris* sp. von 18,5 bis 80,8 %, für *T. suis* von 0 bis 28,8 % und von den MDS von 72,2 bis 94,2 %. In den als städtisch geltenden Bezirken Ngoma und Tumba wurden zum Zeitpunkt unserer Untersuchung keine Schweine gehalten.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es in der südlichen Provinz Ruandas durch die jährliche Entwurmung mittels Benzimidazolpräparaten zur Selektion resistenter Wurmpopulationen gekommen sein könnte und in Zukunft an Strategien zur Vermeidung weiteren Selektionsdrucks gearbeitet werden muss. Dies sollte eine Priorität in künftigen Präventionsprogrammen sein.

Zur besseren Einschätzung der Gesamtprävalenz resistenter Populationen ist eine Ausdehnung der Studie auf das gesamte Land in regelmäßigen Abständen erforderlich. Es ist denkbar, dass die Mechanismen für die vorliegenden Resistenzen an anderen Positionen in β - Tubulin Genen oder in weiteren β - Tubulin Isotypen im *Ascaris* sp. Genom zu finden sind. Außerdem wäre es möglich, dass *Ascaris* sp. resistent durch metabolische Stoffwechselwege werden, die zu einer Reduzierung des aktiven Wirkstoffs im Wurm führen. Es bleibt weiteren Forschungen vorbehalten, die Mechanismen aufzudecken, die bei *Ascaris* sp. zu BZ Resistenz führen.

7. Summary

Research into the appearance and anthelmintic susceptibility of gastrointestinal nematodes of humans and pigs in Rwanda:

Soil transmitted helminths (STHs), namely *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and the hookworms *A. duodenale* and *N. americanus* are common parasites in almost two billion humans globally and pose a great threat to human health, especially in schoolchildren. Strategic treatment against STHs becomes increasingly important in many endemic countries. School children are particularly vulnerable and STHs can inhibit school performance or, in more severe cases, lead to malnutrition and growth stunting. In Rwanda, preventive chemotherapy is applied once or twice a year to school children and most members of the target group are regularly treated.

In this present study, stool samples from school children aged six to ten years belonging to twelve schools and stool samples from pigs from the subdistricts of the southern province of Rwanda were examined using Mini-FLOTAC chamber to detect eggs of one or multiple of the STH species mentioned above. Fecal egg count reduction (FECR) and cure rate (CR) were calculated to assess whether worm populations in Rwanda showed any signs for development of resistance against benzimidazoles. In 2014, almost 2000 stool samples were examined. During the follow-up in the next year, additional 400 samples from four out of the twelve schools were collected and examined. Children which had been enrolled in the study brought a fresh stool sample to school, which was then collected. In 2014, the children were also clinically examined. Additionally, a blood sample was taken and finally the children were treated with Albendazol under supervision. A follow-up stool sample was collected seven to ten days after the first treatment. The same procedure was undertaken in 2015 but children were not again clinically examined nor had to provide a blood sample. In 2014, additional stool samples from pigs, living in sheds next to the house as the participating children, were collected and examined for eggs of *Ascaris suum*, *Trichuris suis* or gastrointestinal strongyles. For further investigations, samples were kept from which DNA was extracted in the laboratory in Berlin and molecular analysis of β -tubulin single nucleotide polymorphisms in *Ascaris* sp. was performed.

The overall prevalence for *Ascaris* sp. before the first round of deworming was 40 %, it decreased to 13 % after treatment. The results of microscopy in the present study showed signs of reduced efficacy of the BZ albendazole in nine out of 10 examined schools. The FECR in the affected schools was significantly below the threshold suggested by Vercruyssen et al.

(2011). Overall it ranged from zero to 99.56 %. The CRs ranged from 33 to 100 %. However, the molecular biological results were not in line with the microscopic results since in none of the analyzed samples SNPs associated with BZ resistance were found.

The prevalence of *Ascaris* sp. in pigs ranged from 18,5 - 80,8 %, of *T. suis* from 0 - 28,8 % and prevalences of hookworm ranged from 72,2 – 94,2 %. In the as urban claimed villages of Ngoma and Tumba there were no pigs living at the time our study was conducted.

The results of the study suggest that resistance might have developed in the southern province of Rwanda and treatment has to be adapted accordingly to prevent further selection of resistant worm populations. This should be a priority in future prevention programs.

For better evaluation of the prevalence of resistant population, further research needs to be conducted throughout the entire country. As this study has failed to show any of the suggested SNPs associated with benzimidazole resistance, further investigations into the mechanisms of resistance in *Ascaris* sp. are suggested since it is possible that SNPs are found at other sites of the genome such as in additional β -tubulin isotypes. In addition, it is possible that BZ metabolism leads to resistance by reducing the concentration of active drug with the worms. Future research will be needed to identify the BZ resistance mechanisms in *Ascaris* sp.

8. Literaturverzeichnis

Aktories K., Förstermann U., Hofmann F.B., Starke K. (2013):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, Elsevier GmbH, S. 745-883.

Albonico, M., Q. Bickle, M. Ramsan, A. Montresor, L. Savioli and M. Taylor (2003):

"Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar." Bull World Health Organ 81(5): 343-352.

Albonico, M., D. Engels and L. Savioli (2004):

"Monitoring drug efficacy and early detection of drug resistance in human soil-transmitted nematodes: a pressing public health agenda for helminth control." Int J Parasitol 34(11): 1205-1210.

Albonico, M., B. Levecke, P. T. LoVerde, A. Montresor, R. Prichard, J. Vercruysse and J. P. Webster (2015):

"Monitoring the efficacy of drugs for neglected tropical diseases controlled by preventive chemotherapy." J Glob Antimicrob Resist 3(4): 229-236.

Albonico, M., V. Wright and Q. Bickle (2004):

"Molecular analysis of the beta-tubulin gene of human hookworms as a basis for possible benzimidazole resistance on Pemba Island." Mol Biochem Parasitol 134(2): 281-284.

Alemu, A., Y. Tegegne, D. Damte and M. Melku (2016):

"Schistosoma mansoni and soil-transmitted helminths among preschool-aged children in Chuahit, Dembia district, Northwest Ethiopia: prevalence, intensity of infection and associated risk factors." BMC Public Health 16: 422.

AlGusbi, S., J. Krucken, S. Ramunke, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Demeler (2014):

"Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes." Int J Parasitol 44(9): 647-658.

Anderson, R. M., J. E. Truscott, R. L. Pullan, S. J. Brooker and T. D. Hollingsworth (2013):
"How effective is school-based deworming for the community-wide control of soil-transmitted helminths?" *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e2027.

Assefa, L. M., T. Crellen, S. Kepha, J. H. Kihara, S. M. Njenga, R. L. Pullan and S. J. Brooker (2014):

"Diagnostic accuracy and cost-effectiveness of alternative methods for detection of soil-transmitted helminths in a post-treatment setting in western Kenya." *PLoS Negl Trop Dis* 8(5): e2843.

Ballweber, L. R., F. Beugnet, A. A. Marchiondo and P. A. Payne (2014):

"American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use--is there really one best technique?" *Vet Parasitol* 204(1-2): 73-80.

Barda, B., P. Cajal, E. Villagran, R. Cimino, M. Juarez, A. Krolewiecki, L. Rinaldi, G. Cringoli, R. Burioni and M. Albonico (2014):

"Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina." *Parasit Vectors* 7: 271.

Barda, B., D. Ianniello, F. Salvo, T. Sadutshang, L. Rinaldi, G. Cringoli, R. Burioni and M. Albonico (2013):

"Freezing" parasites in pre-Himalayan region, Himachal Pradesh: Experience with mini-FLOTAC." *Acta Trop* 130C: 11-16.

Barda, B., D. Ianniello, H. Zepheryne, L. Rinaldi, G. Cringoli, R. Burioni and M. Albonico (2014):

"Parasitic infections on the shore of Lake Victoria (East Africa) detected by Mini-FLOTAC and standard techniques." *Acta Trop* 137: 140-146.

Barda, B., H. Zepherine, L. Rinaldi, G. Cringoli, R. Burioni, M. Clementi and M. Albonico (2013):

"Mini-FLOTAC and Kato-Katz: helminth eggs watching on the shore of Lake Victoria." *Parasit Vectors* 6(1): 220.

Barda, B. D., L. Rinaldi, D. Ianniello, H. Zepherine, F. Salvo, T. Sadutshang, G. Cringoli, M. Clementi and M. Albonico (2013):

"Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field." *PLoS Negl Trop Dis* 7(8): e2344.

Beaver, P. C. (1961):

"Control of soil-transmitted helminths." *Public Health Pap* 10: 1-44.

Beech, R., N. Levitt, M. Cambos, S. Zhou and S. G. Forrester (2010):

"Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*." *Mol Biochem Parasitol* 171(2): 74-80.

Bennett, A. and H. Guyatt (2000):

"Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole." *Parasitol Today* 16(2): 71-74.

Bennett, A. B., T. J. Anderson, G. C. Barker, E. Michael and D. A. Bundy (2002):

"Sequence variation in the *Trichuris trichiura* beta-tubulin locus: implications for the development of benzimidazole resistance." *Int J Parasitol* 32(12): 1519-1528.

Bethony, J., S. Brooker, M. Albonico, S. M. Geiger, A. Loukas, D. Diemert and P. J. Hotez (2006):

"Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm." *Lancet* 367(9521): 1521-1532.

Bethony, J., J. Chen, S. Lin, S. Xiao, B. Zhan, S. Li, H. Xue, F. Xing, D. Humphries, W. Yan, G. Chen, V. Foster, J. M. Hawdon and P. J. Hotez (2002):

"Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, People's Republic of China." *Clin Infect Dis* 35(11): 1336-1344.

Betson, M., P. Nejsum, R. P. Bendall, R. M. Deb and J. R. Stothard (2014):

"Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs." *J Infect Dis* 210(6): 932-941.

Brooker, S., P. Singhasivanon, J. Waikagul, S. Supavej, S. Kojima, T. Takeuchi, T. V. Luong and S. Looareesuwan (2003):

"Mapping soil-transmitted helminths in Southeast Asia and implications for parasite control." Southeast Asian J Trop Med Public Health 34(1): 24-36.

Cabaret, J. and B. Berrag (2004):

"Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations." Vet Parasitol 121(1-2): 105-113.

Campbell, S. J., S. V. Nery, J. S. McCarthy, D. J. Gray, R. J. Soares Magalhaes and A. C. Clements (2016):

"A Critical Appraisal of Control Strategies for Soil-Transmitted Helminths." Trends Parasitol 32(2): 97-107.

Charvet, C. L., F. Guegnard, E. Courtot, J. Cortet and C. Neveu (2018):

"Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes." Int J Parasitol Drugs Drug Resist 8(3): 540-549.

Coles, G. C., C. Bauer, F. H. Borgsteede, S. Geerts, T. R. Klei, M. A. Taylor and P. J. Waller (1992):

"World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance." Vet Parasitol 44(1-2): 35-44.

Coles, G. C., F. Jackson, W. E. Pomroy, R. K. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna, A. Silvestre, M. A. Taylor and J. Vercruysse (2006):

"The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance." Vet Parasitol 136(3-4): 167-185.

Comitee, W. E. (2002):

Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-transmitted helminthiasis. Geneva, WHO. 912: 63.

Conway, D. P. (1964):

"Variance in the Effectiveness of Thiabendazole against Haemonchus Contortus in Sheep." Am J Vet Res 25: 844-846.

Cools, P., J. Vlamincx, M. Albonico, S. Ame, M. Ayana, B. P. Jose Antonio, G. Cringoli, D. Dana, J. Keiser, M. P. Maurelli, C. Maya, L. F. Matoso, A. Montresor, Z. Mekonnen, G. Mirams, R. Correa-Oliveira, S. A. Pinto, L. Rinaldi, S. Sayasone, E. Thomas, J. J. Verweij, J. Vercruyse and B. Levecke (2019):

"Diagnostic performance of a single and duplicate Kato-Katz, Mini-FLOTAC, FECPAKG2 and qPCR for the detection and quantification of soil-transmitted helminths in three endemic countries." *PLoS Negl Trop Dis* 13(8): e0007446.

Craven, J., H. Bjorn, E. H. Barnes, S. A. Henriksen and P. Nansen (1999):

"A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles." *Vet Parasitol* 85(1): 49-59.

Cringoli, G., L. Rinaldi, M. Albonico, R. Bergquist and J. Utzinger (2013):

"Geospatial (s)tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics." *Geospat Health* 7(2): 399-404.

Daniel, R., J. van Dijk and D. Williams (2010):

"Faecal egg count reduction test to detect lack of efficacy of triclabendazole." *Vet Rec* 167(19): 759.

Davis, S. M., C. M. Worrell, R. E. Wiegand, K. O. Odero, P. S. Suchdev, L. J. Ruth, G. Lopez, L. Cosmas, J. Neatherlin, S. M. Njenga, J. M. Montgomery and L. M. Fox (2014):

"Soil-transmitted helminths in pre-school-aged and school-aged children in an urban slum: a cross-sectional study of prevalence, distribution, and associated exposures." *Am J Trop Med Hyg* 91(5): 1002-1010.

De Clercq, D., M. Sacko, J. Behnke, F. Gilbert, P. Dorny and J. Vercruyse (1997):

"Failure of mebendazole in treatment of human hookworm infections in the southern region of Mali." *Am J Trop Med Hyg* 57(1): 25-30.

De Graef, J., C. Sarre, B. J. Mills, S. Mahabir, S. Casaert, N. De Wilde, M. Van Weyenberg, P. Geldhof, A. Marchiondo, J. Vercruyse, P. Meeus and E. Claerebout (2012):

"Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count reduction test and the controlled efficacy test." *Vet Parasitol* 189(2-4): 378-382.

de Silva, N. R., S. Brooker, P. J. Hotez, A. Montresor, D. Engels and L. Savioli (2003):

"Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture." *Trends Parasitol* 19(12): 547-551.

Demeler, J., N. Kruger, J. Krucken, V. C. von der Heyden, S. Ramunke, U. Kuttler, S. Miltsch, M. L. Cepeda, M. Knox, J. Vercruysse, P. Geldhof, A. Harder and G. von Samson-Himmelstjerna (2013):

"Phylogenetic Characterization of beta-Tubulins and Development of Pyrosequencing Assays for Benzimidazole Resistance in Cattle Nematodes." *Plos One* 8(8).

Demeler, J., A. M. Van Zeveren, N. Kleinschmidt, J. Vercruysse, J. Hoglund, R. Koopmann, J. Cabaret, E. Claerebout, M. Areskog and G. von Samson-Himmelstjerna (2009):

"Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe." *Vet Parasitol* 160(1-2): 109-115.

Deplazes P., Eckert J., V. Samson-Himmelstjerna G., Zahner H. (2013):

Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Stuttgart, Enke Verlag, S. 369-399.

Diawara, A., L. J. Drake, R. R. Suswillo, J. Kihara, D. A. Bundy, M. E. Scott, C. Halpenny, J. R. Stothard and R. K. Prichard (2009):

"Assays to detect beta-tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*." *PLoS Negl Trop Dis* 3(3): e397.

Diawara, A., C. M. Halpenny, T. S. Churcher, C. Mwandawiro, J. Kihara, R. M. Kaplan, T. G. Streit, Y. Idaghdour, M. E. Scott, M. G. Basanez and R. K. Prichard (2013):

"Association between response to albendazole treatment and beta-tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths." *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2247.

Drakulovski, P., S. Bertout, S. Locatelli, C. Butel, S. Pion, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, M. Peeters and M. Mallie (2014):

"Assessment of gastrointestinal parasites in wild chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in southeast Cameroon." *Parasitol Res* 113(7): 2541-2550.

Dunn, J. C., H. C. Turner, A. Tun and R. M. Anderson (2016):

"Epidemiological surveys of, and research on, soil-transmitted helminths in Southeast Asia: a systematic review." *Parasit Vectors* 9: 31.

Elard, L. and J. F. Humbert (1999):

"Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*." *Parasitol Res* 85(6): 452-456.

Eng, J. K., W. J. Blackhall, M. Y. Osei-Atweneboana, C. Bourguinat, D. Galazzo, R. N. Beech, T. R. Unnasch, K. Awadzi, G. W. Lubega and R. K. Prichard (2006):

"Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*." *Mol Biochem Parasitol* 150(2): 229-235.

Feasey, N., M. Wansbrough-Jones, D. C. Mabey and A. W. Solomon (2010):

"Neglected tropical diseases." *Br Med Bull* 93: 179-200.

Fincham, J. E., M. B. Markus and V. J. Adams (2003):

"Could control of soil-transmitted helminthic infection influence the HIV/AIDS pandemic." *Acta Trop* 86(2-3): 315-333.

Furtado, L. F., A. C. de Paiva Bello and E. M. Rabelo (2016):

"Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis." *Acta Trop* 162: 95-102.

Galvani, A. P. (2005):

"Age-dependent epidemiological patterns and strain diversity in helminth parasites." *J Parasitol* 91(1): 24-30.

Geerts, S. and B. Gryseels (2000):

"Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock." *Clin Microbiol Rev* 13(2): 207-222.

Ghisi, M., R. Kaminsky and P. Maser (2007):

"Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes." *Vet Parasitol* 144(3-4): 313-320.

Gillespie, T. R., E. V. Lonsdorf, E. P. Canfield, D. J. Meyer, Y. Nadler, J. Raphael, A. E. Pusey, J. Pond, J. Pauley, T. Mlengeya and D. A. Travis (2010):

"Demographic and ecological effects on patterns of parasitism in eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Gombe National Park, Tanzania." *Am J Phys Anthropol* 143(4): 534-544.

Grimshaw, W. T., K. R. Hunt, C. Hong and G. C. Coles (1994):

"Detection of anthelmintic resistant nematodes in sheep in southern England by a faecal egg count reduction test." *Vet Rec* 135(16): 372-374.

Guidotti, R. J. (2000):

"Anaemia in pregnancy in developing countries." *BJOG* 107(4): 437-438.

Horton, J. (2000):

"Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans." *Parasitology* 121 Suppl: S113-132.

Hotez, P. J. (2009):

"Mass drug administration and integrated control for the world's high-prevalence neglected tropical diseases." *Clin Pharmacol Ther* 85(6): 659-664.

Hotez, P. J., D. H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. E. Sachs, J. D. Sachs and L. Savioli (2007):

"Control of neglected tropical diseases." *N Engl J Med* 357(10): 1018-1027.

Imhoff-Kunsch, B. and V. Briggs (2012):

"Anthelmintics in pregnancy and maternal, newborn and child health." *Paediatr Perinat Epidemiol* 26 Suppl 1: 223-238.

Jackson, F. and R. L. Coop (2000):

"The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes." *Parasitology* 120 Suppl: S95-107.

Jex, A. R., Y. A. Lim, J. M. Bethony, P. J. Hotez, N. D. Young and R. B. Gasser (2011):

"Soil-transmitted helminths of humans in Southeast Asia--towards integrated control." *Adv Parasitol* 74: 231-265.

Jia, T. W., S. Melville, J. Utzinger, C. H. King and X. N. Zhou (2012):

"Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis." *PLoS Negl Trop Dis* 6(5): e1621.

Jones, L. M., A. J. Flemming and P. E. Urwin (2015):

"NHR-176 regulates *cyp-35d1* to control hydroxylation-dependent metabolism of thiabendazole in *Caenorhabditis elegans*." *Biochemical Journal* 466: 37-44.

Jones, L. M., S. J. Rayson, A. J. Flemming and P. E. Urwin (2013):

"Adaptive and specialised transcriptional responses to xenobiotic stress in *Caenorhabditis elegans* are regulated by nuclear hormone receptors." *PLoS One* 8(7): e69956.

Kabatereine, N. B., F. M. Fleming, U. Nyandindi, J. C. Mwanza and L. Blair (2006):

"The control of schistosomiasis and soil-transmitted helminths in East Africa." *Trends Parasitol* 22(7): 332-339.

Kalema-Zikusoka, G., J. M. Rothman and M. T. Fox (2005):

"Intestinal parasites and bacteria of mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda." *Primates* 46(1): 59-63.

Kaminsky, R. G., S. K. Ault, P. Castillo, K. Serrano and G. Troya (2014). "High prevalence of soil-transmitted helminths in Southern Belize-highlighting opportunity for control interventions." *Asian Pac J Trop Biomed* 4(5): 345-353.

Kaplan, R. M. (2004):

"Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report." *Trends Parasitol* 20(10): 477-481.

Kaplan, R. M. and A. N. Vidyashankar (2012):

"An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance." *Veterinary Parasitology* 186(1-2): 70-78.

Keiser, J. and J. Utzinger (2008):

"Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis." *JAMA* 299(16): 1937-1948.

Keiser, J. and J. Utzinger (2010):

"The Drugs We Have and the Drugs We Need Against Major Helminth Infections." *Advances in Parasitology*, Vol 73 73: 197-230.

Kerboeuf, D., W. Blackhall, R. Kaminsky and G. von Samson-Himmelstjerna (2003):

"P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance." *Int J Antimicrob Agents* 22(3): 332-346.

Knapp-Lawitzke, F., J. Krücken, S. Ramunke, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Demeler (2015).

"Rapid selection for beta-tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an *Ostertagia ostertagi* isolate on pasture." *Vet Parasitol* 209(1-2): 84-92.

Knopp, S., K. A. Mohammed, B. Speich, J. Hattendorf, I. S. Khamis, A. N. Khamis, J. R. Stothard, D. Rollinson, H. Marti and J. Utzinger (2010):

"Albendazole and mebendazole administered alone or in combination with ivermectin against *Trichuris trichiura*: a randomized controlled trial." *Clin Infect Dis* 51(12): 1420-1428.

Konigova, A., M. Varady and J. Corba (2003):

"Comparison of in vitro methods and faecal egg count reduction test for the detection of benzimidazole resistance in small strongyles of horses." *Vet Res Commun* 27(4): 281-288.

Kotze, A. C., P. W. Hunt, P. Skuce, G. von Samson-Himmelstjerna, R. J. Martin, H. Sager, J. Krucken, J. Hodgkinson, A. Lespine, A. R. Jex, J. S. Gilleard, R. N. Beech, A. J. Wolstenholme, J. Demeler, A. P. Robertson, C. L. Charvet, C. Neveu, R. Kaminsky, L. Rufener, M. Alberich, C. Menez and R. K. Prichard (2014):

"Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4(3): 164-184.

Krücken, J., K. Fraundorfer, J. C. Mugisha, S. Ramunke, K. C. Sifft, D. Geus, F. Habarugira, J. Ndoli, A. Sendegeya, C. Mukampunga, C. Bayingana, T. Aebischer, J. Demeler, J. B. Gahutu, F. P. Mockenhaupt and G. von Samson-Himmelstjerna (2017):

"Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7(3): 262-271.

Kwa, M. S., J. G. Veenstra and M. H. Roos (1993):

"Molecular characterisation of beta-tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*." *Mol Biochem Parasitol* 60(1): 133-143.

Kwa, M. S., J. G. Veenstra and M. H. Roos (1994):

"Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1." *Mol Biochem Parasitol* 63(2): 299-303.

Lacey, E. (1990):

"Mode of action of benzimidazoles." *Parasitol Today* 6(4): 112-115.

Lacey, E. and J. H. Gill (1994):

"Biochemistry of benzimidazole resistance." *Acta Trop* 56(2-3): 245-262.

Lacey, E. and R. K. Prichard (1986):

"Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*." *Mol Biochem Parasitol* 19(2): 171-181.

Le Hesran, J. Y., J. Akiana, H. M. Ndiaye el, M. Dia, P. Senghor and L. Konate (2004):

"Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98(7): 397-399.

Leathwick, D. M. and D. Luo (2017):

"Managing anthelmintic resistance-Variability in the dose of drug reaching the target worms influences selection for resistance?" *Vet Parasitol* 243: 29-35.

Leles, D., S. L. Gardner, K. Reinhard, A. Iniguez and A. Araujo (2012):

"Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?" *Parasit Vectors* 5: 42.

Levecke, B., R. J. Dobson, N. Speybroeck, J. Vercruysse and J. Charlier (2012):

"Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance." *Vet Parasitol* 188(3-4): 391-396.

Levecke, B., R. M. Kaplan, S. M. Thamsborg, P. R. Torgerson, J. Vercruysse and R. J. Dobson (2018):

"How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test?" *Vet Parasitol* 253: 71-78.

Levecke, B., A. Montresor, M. Albonico, S. M. Ame, J. M. Behnke, J. M. Bethony, C. D. Noumedem, D. Engels, B. Guillard, A. C. Kotze, A. J. Krolewiecki, J. S. McCarthy, Z. Mekonnen, M. V. Periago, H. Sopheak, L. A. Tchuem-Tchuente, T. T. Duong, N. T. Huong, A. Zeynudin and J. Vercruysse (2014):

"Assessment of anthelmintic efficacy of mebendazole in school children in six countries where soil-transmitted helminths are endemic." *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3204.

Liu, G. H., C. Y. Wu, H. Q. Song, S. J. Wei, M. J. Xu, R. Q. Lin, G. H. Zhao, S. Y. Huang and X. Q. Zhu (2012):

"Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs." *Gene* 492(1): 110-116.

Lubega, G. W. and R. K. Prichard (1991):

"Interaction of Benzimidazole Anthelmintics with *Haemonchus-Contortus* Tubulin - Binding-Affinity and Anthelmintic Efficacy." *Experimental Parasitology* 73(2): 203-213.

Lüllmann H., Mohr K., Wehling M., Hein L. (2016):

Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Thieme Verlag, S. 575-576.

M'Bondoukwe N, P., E. Kendjo, D. P. Mawili-Mboumba, J. V. Koumba Lengongo, C. Offouga Mbouoronde, D. Nkoghe, F. Toure and M. K. Bouyou-Akotet (2018):

"Prevalence of and risk factors for malaria, filariasis, and intestinal parasites as single infections or co-infections in different settlements of Gabon, Central Africa." *Infect Dis Poverty* 7(1): 6.

Martin, R. J., S. Verma, M. Levandoski, C. L. Clark, H. Qian, M. Stewart and A. P. Robertson (2005):

"Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole." *Parasitology* 131 Suppl: S71-84.

Martins-Melo, F. R., A. N. Ramos, C. H. Alencar, M. S. Lima and J. Heukelbach (2017):

"Epidemiology of soil-transmitted helminthiases-related mortality in Brazil." *Parasitology* 144(5): 669-679.

May, K., K. Brugemann, S. König and C. Strube (2017):

"Patent gastrointestinal nematode infections in organically and conventionally pastured dairy cows and their impact on individual milk and fertility parameters." *Vet Parasitol* 245: 119-127.

McKenna, P. B. (1990):

"The detection of resistance to ivermectin by the faecal egg count reduction test." *N Z Vet J* 38(4): 169-170.

Montresor, A., A. P. N., M. Albonico, A. F. Gabrielli, D. Jankovic, C. Fitzpatrick, J. Vercruysse and B. Levecke (2014):

"Soil-transmitted helminthiasis: the relationship between prevalence and classes of intensity of infection." *Trans R Soc Trop Med Hyg*.

Morrison, A. A., S. Mitchell, R. Mearns, I. Richards, J. B. Matthews and D. J. Bartley (2014):

"Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*." *Vet Res* 45: 116.

Moser, W., C. Schindler and J. Keiser (2017):

"Efficacy of recommended drugs against soil transmitted helminths: systematic review and network meta-analysis." *BMJ* 358: j4307.

Mpairwe, H., R. Tweyongyere and A. Elliott (2014):

"Pregnancy and helminth infections." *Parasite Immunol* 36(8): 328-337.

Murray, C. J., A. D. Lopez and D. T. Jamison (1994):

"The global burden of disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions." *Bull World Health Organ* 72(3): 495-509.

Murray, C. J., T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A. D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J. A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, J. Abraham, I. Ackerman, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. K. Ali, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, A. N. Bahalim, S. Barker-Collo, L. H. Barrero, D. H. Bartels, M. G. Basanez, A. Baxter, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, E. Bernabe, K. Bhalla, B. Bhandari, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, J. A. Black, H. Blencowe, J. D. Blore, F. Blyth, I. Bolliger, A. Bonaventure, S. Boufous, R. Bourne, M. Boussinesq, T. Braithwaite, C. Brayne, L. Bridgett, S. Brooker, P. Brooks, T. S. Brugha, C. Bryan-Hancock, C. Bucello, R. Buchbinder, G. Buckle, C. M. Budke, M. Burch, P. Burney, R. Burstein, B. Calabria, B. Campbell, C. E. Canter, H. Carabin, J. Carapetis, L. Carmona, C. Cella, F. Charlson, H. Chen, A. T. Cheng, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vaccaro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, M. Dahiya, N. Dahodwala, J. Damsere-Derry, G. Danaei, A. Davis, D. De Leo, L. Degenhardt, R. Dellavalle, A. Delossantos, J. Denenberg, S. Derrett, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, M. Dherani, C. Diaz-Torne, H. Dolk, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, K. Edmond, A. Elbaz, S. E. Ali, H. Erskine, P. J. Erwin, P. Espindola, S. E. Ewoigbokhan, F. Farzadfar, V. Feigin, D. T. Felson, A. Ferrari, C. P. Ferri, E. M. Fevre, M. M. Finucane, S. Flaxman, L. Flood, K. Foreman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, M. Fransen, M. K. Freeman, B. J. Gabbe, S. E. Gabriel, E. Gakidou, H. A. Ganatra, B. Garcia, F. Gaspari, R. F. Gillum, G. Gmel, D. Gonzalez-Medina, R. Gosselin, R. Grainger, B. Grant, J. Groeger, F. Guillemin, D. Gunnell, R. Gupta, J. Haagsma, H. Hagan, Y. A. Halasa, W. Hall, D. Haring, J. M. Haro, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, H. Higashi, C. Hill, B. Hoen, H. Hoffman, P. J. Hotez, D. Hoy, J. J. Huang, S. E. Ibeanusi, K. H. Jacobsen, S. L. James, D. Jarvis, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, J. B. Jonas, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, N. Kawakami, A. Keren, J. P. Khoo, C. H. King, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, F. Laden, R. Lalloo, L. L. Laslett, T. Lathlean, J. L. Leasher, Y. Y. Lee, J. Leigh, D. Levinson, S. S. Lim, E. Limb, J. K. Lin, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, W. Liu, M. Loane, S. L. Ohno, R. Lyons, J. Mabweijano, M. F. MacIntyre, R. Malekzadeh, L. Mallinger, S. Manivannan, W. Marcenes, L. March, D. J. Margolis, G. B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B. M. Mayosi, J. H. McAnulty, M. M. McDermott, N. McGill, J. McGrath, M. E. Medina-Mora, M. Meltzer, G. A. Mensah, T. R. Merriman, A. C. Meyer, V. Miglioli, M. Miller, T. R. Miller, P. B. Mitchell, C. Mock, A. O. Mocumbi, T. E. Moffitt, A. A. Mokdad, L. Monasta, M. Montico, M. Moradi-Lakeh, A. Moran, L. Morawska, R. Mori, M. E. Murdoch, M. K. Mwaniki, K. Naidoo, M. N. Nair, L. Naldi, K. M. Narayan, P. K. Nelson, R. G. Nelson, M. C. Nevitt, C. R. Newton, S. Nolte, P. Norman, R. Norman, M. O'Donnell, S. O'Hanlon, C. Olives, S. B. Omer, K.

Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, A. Page, B. Pahari, J. D. Pandian, A. P. Rivero, S. B. Patten, N. Pearce, R. P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, K. Pesudovs, D. Phillips, M. R. Phillips, K. Pierce, S. Pion, G. V. Polanczyk, S. Polinder, C. A. Pope, 3rd, S. Popova, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Prince, R. L. Pullan, K. D. Ramaiah, D. Ranganathan, H. Razavi, M. Regan, J. T. Rehm, D. B. Rein, G. Remuzzi, K. Richardson, F. P. Rivara, T. Roberts, C. Robinson, F. R. De Leon, L. Ronfani, R. Room, L. C. Rosenfeld, L. Rushton, R. L. Sacco, S. Saha, U. Sampson, L. Sanchez-Riera, E. Sanman, D. C. Schwebel, J. G. Scott, M. Segui-Gomez, S. Shahraz, D. S. Shepard, H. Shin, R. Shivakoti, D. Singh, G. M. Singh, J. A. Singh, J. Singleton, D. A. Sleet, K. Sliwa, E. Smith, J. L. Smith, N. J. Stapelberg, A. Steer, T. Steiner, W. A. Stolk, L. J. Stovner, C. Sudfeld, S. Syed, G. Tamburlini, M. Tavakkoli, H. R. Taylor, J. A. Taylor, W. J. Taylor, B. Thomas, W. M. Thomson, G. D. Thurston, I. M. Tleyjeh, M. Tonelli, J. A. Towbin, T. Truelsen, M. K. Tsilimbaris, C. Ubeda, E. A. Undurraga, M. J. van der Werf, J. van Os, M. S. Vavilala, N. Venketasubramanian, M. Wang, W. Wang, K. Watt, D. J. Weatherall, M. A. Weinstock, R. Weintraub, M. G. Weisskopf, M. M. Weissman, R. A. White, H. Whiteford, N. Wiebe, S. T. Wiersma, J. D. Wilkinson, H. C. Williams, S. R. Williams, E. Witt, F. Wolfe, A. D. Woolf, S. Wulf, P. H. Yeh, A. K. Zaidi, Z. J. Zheng, D. Zonies, A. D. Lopez, M. A. AlMazroa and Z. A. Memish (2012):

"Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* 380(9859): 2197-2223.

Mwanthi, M. A., M. K. Kinoti, A. W. Wamae, M. Ndonga and P. S. Migiro (2008):

"Prevalence of intestinal worm infections among primary school children in Nairobi City, Kenya." *East Afr J Public Health* 5(2): 86-89.

Nejsum, P., M. F. Bertelsen, M. Betson, J. R. Stothard and K. D. Murrell (2010):

"Molecular evidence for sustained transmission of zoonotic *Ascaris suum* among zoo chimpanzees (*Pan troglodytes*)." *Vet Parasitol* 171(3-4): 273-276.

Nejsum, P., M. Betson, R. P. Bendall, S. M. Thamsborg and J. R. Stothard (2012):

"Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past." *J Helminthol* 86(2): 148-155.

Nejsum, P., C. Grondahl and K. D. Murrell (2006):

"Molecular evidence for the infection of zoo chimpanzees by pig *Ascaris*." *Vet Parasitol* 139(1-3): 203-210.

Ngonjo, T., C. Okoyo, J. Andove, E. Simiyu, A. E. Lelo, E. Kabiru, J. Kihara and C. Mwandawiro (2016):

"Current Status of Soil-Transmitted Helminths among School Children in Kakamega County, Western Kenya." *J Parasitol Res* 2016: 7680124.

Okulewicz, A., E. Lonc and F. H. Borgsteede (2002):

"Ascarid nematodes in domestic and wild terrestrial mammals." *Pol J Vet Sci* 5(4): 277-281.

Parker, M. and T. Allen (2011):

"Does mass drug administration for the integrated treatment of neglected tropical diseases really work? Assessing evidence for the control of schistosomiasis and soil-transmitted helminths in Uganda." *Health Res Policy Syst* 9: 3.

Peng, W., K. Yuan, M. Hu, G. Peng, X. Zhou, N. Hu and R. B. Gasser (2006):

"Experimental infections of pigs and mice with selected genotypes of *Ascaris*." *Parasitology* 133(Pt 5): 651-657.

Prichard, R. (2001):

"Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics." *Trends Parasitol* 17(9): 445-453.

Prichard, R. K. (2007):

"Ivermectin resistance and overview of the Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs." *Expert Opin Drug Discov* 2(s1): S41-52.

Prichard, R. K. (2007):

"Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes?" *Parasitology* 134(Pt 8): 1087-1092.

Prichard, R. K., G. von Samson-Himmelstjerna, W. J. Blackhall and T. G. Geary (2007):

"Foreword: Towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health." *Parasitology* 134: 1073-1076.

Rees, C. A., P. J. Hotez, M. C. Monuteaux, M. Niescierenko and F. T. Bourgeois (2019):

"Neglected tropical diseases in children: An assessment of gaps in research prioritization." *PLoS Negl Trop Dis* 13(1): e0007111.

Ruxin, J. and J. Negin (2012):

"Removing the neglect from neglected tropical diseases: the Rwandan experience 2008-2010." *Glob Public Health* 7(8): 812-822.

Rwanda, N. D. o. S. o. (2011):

"EICV 3 Huye." 3: 100.

Santos, J., J. F. Vasconcelos, G. A. Frota, E. P. Freitas, M. Teixeira, L. D. S. Vieira, C. M. L. Bevilaqua and J. P. Monteiro (2019):

"Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus*." *Exp Parasitol* 205: 107734.

Saunders, G. I., J. D. Wasmuth, R. Beech, R. Laing, M. Hunt, H. Naghra, J. A. Cotton, M. Berriman, C. Britton and J. S. Gilleard (2013):

"Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* beta-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes." *Int J Parasitol* 43(6): 465-475.

Schwab, A. E., D. A. Boakye, D. Kyelem and R. K. Prichard (2005):

"Detection of benzimidazole resistance-associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment." *Am J Trop Med Hyg* 73(2): 234-238.

Scott, I., W. E. Pomroy, P. R. Kenyon, G. Smith, B. Adlington and A. Moss (2013):

"Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*." *Vet Parasitol* 198(1-2): 166-171.

Shumbej, T., T. Belay, Z. Mekonnen, T. Tefera and E. Zemene (2015):

"Soil-Transmitted Helminths and Associated Factors among Pre-School Children in Butajira Town, South-Central Ethiopia: A Community-Based Cross-Sectional Study." *PLoS One* 10(8): e0136342.

Sifft, K. C., D. Geus, C. Mukampunga, J. C. Mugisha, F. Habarugira, K. Fraundorfer, C. Bayingana, J. Ndoli, I. Umulisa, C. Karema, G. von Samson-Himmelstjerna, T. Aebischer, P. Martus, A. Sendegeya, J. B. Gahutu and F. P. Mockenhaupt (2016):

"Asymptomatic only at first sight: malaria infection among schoolchildren in highland Rwanda." *Malar J* 15(1): 553.

Silvestre, A. and J. Cabaret (2002):

"Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance?" *Mol Biochem Parasitol* 120(2): 297-300.

Siza, J. E., G. M. Kaatano, J. Y. Chai, K. S. Eom, H. J. Rim, T. S. Yong, D. Y. Min, S. Y. Chang, Y. Ko and J. M. Chagalucha (2015):

"Prevalence of Schistosomes and Soil-Transmitted Helminths among Schoolchildren in Lake Victoria Basin, Tanzania." *Korean J Parasitol* 53(5): 515-524.

Sparks, A. M., M. Betson, G. Oviedo, C. Sandoval, P. J. Cooper and J. R. Stothard (2015):

"Characterization of ascaris from ecuador and zanzibar." *J Helminthol* 89(4): 512-515.

Speich, B., W. Moser, S. M. Ali, S. M. Ame, M. Albonico, J. Hattendorf and J. Keiser (2016):

"Efficacy and reinfection with soil-transmitted helminths 18-weeks post-treatment with albendazole-ivermectin, albendazole-mebendazole, albendazole-oxantel pamoate and mebendazole." *Parasit Vectors* 9(1): 123.

Squire, S. A., I. D. Robertson, R. Yang, I. Ayi and U. Ryan (2019):

"Prevalence and risk factors associated with gastrointestinal parasites in ruminant livestock in the Coastal Savannah zone of Ghana." *Acta Trop* 199: 105126.

Staudacher, O., J. Heimer, F. Steiner, Y. Kayonga, J. M. Havugimana, R. Ignatius, A. Musemakweri, F. Ngabo, G. Harms, J. B. Gahutu and F. P. Mockenhaupt (2014).

"Soil-transmitted helminths in southern highland Rwanda: associated factors and effectiveness of school-based preventive chemotherapy." *Trop Med Int Health* 19(7): 812-824.

Sunish, I. P., R. Rajendran, A. Munirathinam, M. Kalimuthu, V. A. Kumar, J. Nagaraj and B. K. Tyagi (2015):

"Impact on prevalence of intestinal helminth infection in school children administered with seven annual rounds of diethyl carbamazine (DEC) with albendazole." *Indian J Med Res* 141(3): 330-339.

Tarbiat, B., D. S. Jansson, E. Tyden and J. Hoglund (2017):

"Evaluation of benzimidazole resistance status in *Ascaridia galli*." *Parasitology* 144(10): 1338-1345.

Tchuem Tchuente, L. A. (2011):

"Control of soil-transmitted helminths in sub-Saharan Africa: diagnosis, drug efficacy concerns and challenges." *Acta Trop* 120 Suppl 1: S4-11.

Tefera, E., T. Belay, S. K. Mekonnen, A. Zeynudin and T. Belachew (2017):

"Prevalence and intensity of soil transmitted helminths among school children of Mendera Elementary School, Jimma, Southwest Ethiopia." *Pan Afr Med J* 27: 88.

Torlesse, H. and M. Hodges (2000):

"Anthelmintic treatment and haemoglobin concentrations during pregnancy." *Lancet* 356(9235): 1083.

Tyden, E., M. Skarin, M. Andersson-Franko, M. Sjoblom and J. Hoglund (2016):

"Differential expression of beta-tubulin isotypes in different life stages of *Parascaris* spp after exposure to thiabendazole." *Mol Biochem Parasitol* 205(1-2): 22-28.

Utzinger, J., S. L. Becker, S. Knopp, J. Blum, A. L. Neumayr, J. Keiser and C. F. Hatz (2012):

"Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control." *Swiss Med Wkly* 142: w13727.

van den Broek, N. (1996):

"The aetiology of anaemia in pregnancy in West Africa." *Trop Doct* 26(1): 5-7.

van den Broek, N. (1998):

"Anaemia in pregnancy in developing countries." *Br J Obstet Gynaecol* 105(4): 385-390.

Vande Velde, F., J. Charlier and E. Claerebout (2018):

"Farmer Behavior and Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock-Uptake of Sustainable Control Approaches." *Front Vet Sci* 5: 255.

Vercruysse, J., M. Albonico, J. M. Behnke, A. C. Kotze, R. K. Prichard, J. S. McCarthy, A. Montresor and B. Levecke (2011):

"Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths?" *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 1(1): 14-27.

Vercruysse, J., J. M. Behnke, M. Albonico, S. M. Ame, C. Angebault, J. M. Bethony, D. Engels, B. Guillard, T. V. Nguyen, G. Kang, D. Kattula, A. C. Kotze, J. S. McCarthy, Z. Mekonnen, A. Montresor, M. V. Periago, L. Sumo, L. A. Tchunte, T. C. Dang, A. Zeynudin and B. Levecke (2011):

"Assessment of the anthelmintic efficacy of albendazole in school children in seven countries where soil-transmitted helminths are endemic." *PLoS Negl Trop Dis* 5(3): e948.

Vercruysse, J., B. Levecke and R. Prichard (2012):

"Human soil-transmitted helminths: implications of mass drug administration." *Curr Opin Infect Dis* 25(6): 703-708.

von Samson-Himmelstjerna, G., T. K. Walsh, A. A. Donnan, S. Carriere, F. Jackson, P. J. Skuce, K. Rohn and A. J. Wolstenholme (2009):

"Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing." *Parasitology* 136(3): 349-358.

Wenk P., Renz A. (2003):

Parasitologie- Biologie der Humanparasiten. Stuttgart, Thieme Verlag Stuttgart, S.177-189.

Whittaker, J. H., S. A. Carlson, D. E. Jones and M. T. Brewer (2016):

"Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance." *J Vet Pharmacol Ther*.

Wolstenholme, A. J., I. Fairweather, R. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna and N. C. Sangster (2004):

"Drug resistance in veterinary helminths." *Trends Parasitol* 20(10): 469-476.

Wood, I. B., N. K. Amaral, K. Bairden, J. L. Duncan, T. Kassai, J. B. Malone, J. A. Pankavich, R. K. Reinecke, O. Slocombe, S. M. Taylor and J. Vercruysse (1995):

"World-Association-for-the-Advancement-of-Veterinary-Parasitology (Waavp) 2nd Edition of Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelmintics in Ruminants (Bovine, Ovine, Caprine)." *Veterinary Parasitology* 58(3): 181-213.

Zhou, C., S. Jian, W. Peng and M. Li (2018):

"Genetic Diversity of *Ascaris* in China Assessed Using Simple Sequence Repeat Markers." *Korean J Parasitol* 56(2): 175-181.

Anhang

Tabelle 18: Auflistung aller auf SNPs von *Ascaris s.p.*- β -Tubulin-Isotyp 1 untersuchten Proben

Probe	Codon 167	AS	Codon 198	AS	Codon 200	AS
MBA 6	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 24	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 31	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 41	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 50						
MBA 59						
MBA 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 68	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 101	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 102	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
MBA 105	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR MBA 88.1	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR MBA 88.2	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 11	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 18	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 30	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 49	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 84	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 92	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 99	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
GAT 122						
GAT 140	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR GAT 72	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR GAT 79	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR GAT 130	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR GAT 297	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
KIG 103	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
KIG 147	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
KIG 149	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
KIG 194	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR KIG 68	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR KIG 691	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR KIG 692	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR KIG 80	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SR KIG 102	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe

Anhang

SR KIG 184	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
NGO 17	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
NGO 23	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
NGO 73	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
NGO 98						
NGO 123						
SR NGO 14	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe
SHO 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTT	Phe

Tabelle 19: Proben, die auf SNPs des *Ascaris* sp.- β -Tubulin-Isotyp 2 untersucht wurden

Probe	Codon 167	AS	Codon 198	AS	Codon 200	AS
MBA 6	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 24	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 31	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 41	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 50	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 59	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 64	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 68	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 101	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 102	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
MBA 105	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR MBA 88.1	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR MBA 88.2						
GAT 11	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 18	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 30	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 49	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 84	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 92	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 99	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 122	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
GAT 140	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR GAT 72	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR GAT 79	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR GAT 130	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR GAT 297	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
KIG 103						
KIG 147	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe

KIG 149						
KIG 194	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 68	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 691	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 692	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 80	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 102	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR KIG 184	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
NGO 17	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
NGO 23	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
NGO 73	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
NGO 98						
NGO 123	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SR NGO 14	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe
SHO 64	TTC	Phe	GAA	Glu	TTT/C	Phe

Tabelle 20: Auflistung aller Proben, die auf SNPs des *Ascaris* sp.- β -Tubulin-Isotyp 4 untersucht wurden

Probe	Codon 167	AS	Codon 198	AS	Codon 200	AS
MBA 6	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 24	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 31	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 41	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 50	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 59	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 68	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 101	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 102	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 105	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR MBA 88.1						
SR MBA 88.2						
GAT 11	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 18	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 30	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 49	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 84	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 92	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 99	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 122	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe

Anhang

GAT 140	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR GAT 72	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR GAT 79	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR GAT 130	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR GAT 297	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
KIG 103	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
KIG 147	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
KIG 149						
KIG 194	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 68	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 691	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 692	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 80	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 102	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 184	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 17	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 23	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 73	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 98						
NGO 123	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR NGO 14	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SHO 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe

Tabelle 21: Proben, die auf SNPs des *Ascaris* s.p.- β -Tubulin-Typs 1.2 untersucht wurden

Probe	Codon 167	AS	Codon 198	AS	Codon 200	AS
MBA 6	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 24	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
MBA 31	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 41	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 50	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 59	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 68	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
MBA 101	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
MBA 102						
MBA 105	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR MBA 88.1	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR MBA 88.2						
GAT 11	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe

Anhang

GAT 18	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 30	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
GAT 49	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
GAT 84	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 92	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 99	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 122	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
GAT 140	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
SR GAT 72	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
SR GAT 79	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
SR GAT 130	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR GAT 297	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
KIG 103						
KIG 147	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
KIG 149	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
KIG 194	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 68	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 691	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 692	TTC	Phe	GAA	Glu	TTC	Phe
SR KIG 80	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 102	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR KIG 184	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 17	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 23	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 73	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 98	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
NGO 123	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SR NGO 14	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe
SHO 64	TTC	Phe	GAG	Glu	TTC	Phe

Publikationen

Krücken J., Fraundorfer K., Mugisha J.C., Ramünke S., Sift K.C., Geus D., Habarugira F., Ndoli J., Sendegeya A., Mukampunga C., Bayingana C., Aebischer T., Demeler J., Gahutu J.B., Mockenhaupt F.P., von Samson- Himmelstjerna G.:

„Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren”

International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance 7 (2017), S. 262-271

Krücken J., Fraundorfer K., Mugisha J.C., Ramünke S., Sift K.C., Geus D., Habarugira F., Ndoli J., Sendegeya A., Mukampunga C., Aebischer T., Mc Kay- Demeler J., Gahutu J.B., Mockenhaupt F.P., von Samson- Himmelstjerna G.:

“Comment on “The optimal timing of post- treatment sampling for the assessment of anthelmintic drug efficacy against *Ascaris* infections in humans”

International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance 8 (2018), S. 329-330

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Georg von Samson- Himmelstjerna vom Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin für die Möglichkeit, dieses wunderbare und spannende Projekt bearbeitet haben zu dürfen und für die gemeinsame Zeit am Institut.

Lieber Jürgen, vielen Dank für Rat und Tat und deine unendliche Geduld in Berlin, von Berlin nach Ruanda, von Berlin nach Gmunden und zum Schluss nach Wien. Ich werde R zwar trotzdem nie verstehen, aber danke, dass du mich an deinem Verstehen teilhaben ließest.

Ich danke allen Mitdoktoranden und Mitarbeitern des Instituts, vor allem Nelé Loock, Antje Hoppenheit und Rieke Knapp- Lawitzke. Ich werde die Zeit mit Euch nie vergessen! Liebe Sabrina, ohne Dich hätte ich die Laborarbeit nie geschafft.

Ich danke meinen ehemaligen Chefs Hansjörg Trenkwald, Michael und Melanie sowie Charles Leitner und allen Mitarbeitern der Tierklinik Vöcklabruck, ihr habt immer an mich geglaubt.

Vielen Dank an meine Burschen von pezzlife, Max und Markus, die mir den Laptop, an dem ich diese letzten Sätze schreibe, als Leihgabe über mein Angestelltenverhältnis hinaus überlassen haben. Ihr seid grande amore!

Last but not least gilt mein unendlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden. Ohne Eure Geduld, Ausdauer und viel Motivation und Ansporn hätte das hier niemals hingehaut. Vor allem gilt mein großer Dank meinem Bruder Linus, der im Endspurt dieser Arbeit dafür gesorgt hat, dass ich ein funktionierendes Word und Endnote habe. Und meiner lieben Oma, die, seit ich angefangen habe an diesem Projekt zu arbeiten, das „Gaudeamus igitur“ für die akademische Feier übt.

Liebe Eltern, ich danke Euch für Eure grenzenlose Unterstützung bei der Verwirklichung aller meiner Träume und in jeder Lebenslage! Ohne Eure bedingungslose Liebe wäre ich heute nicht der Mensch, der ich bin, selbstbewusst, stolz und in vollem Bewusstsein, was ich alles leisten kann. Und natürlich Doktor, endlich Doktor Kira Fraundorfer.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bei der technischen Umsetzung der PCRs von Isotyp 2, 4 und 1.2 in großem Umfang technische Hilfe von der Laborassistentin des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Frau Sabrina Ramünke, in Anspruch genommen habe.

Wien, 30.07.2020

Kira Marie-Christine Fraundorfer



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-058-5